

析」第 94 回日本食品衛生学会 (2007.10 : 静岡)

17) 堀江正一, 大坂郁恵, 石井里枝「LC/MS/MS 及び微生物学的試験法を用いた  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の分析」第 44 回全国衛生化学技術協議会 (2007.10 ; 三重)

18) 石井里枝, 堀江正一「LC/MS/MS を用いた アミノグリコシド系抗生物質の一斉分析」第 94 回日本食品衛生学会 (2007.10 : 静岡)

19) 堀江正一, 田原弥生, 石井里枝「LC/MS/MS による畜水産食品中に含まれるヒドロコルチゾンの分析」第 128 回日本薬学会 (2008.3 ; 横浜)

20) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan, James D. MacNeil “Multi-residue Confirmation of Aminoglycoside Antibiotics in Kidney and Meat by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry”

Saskatoon International Validation Workshop for Regulatory Analysis of Residues in Foods (2007,5): Saskatoon, Canada

21) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椋沢 圭介, 岡山 明子, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之; 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; 第 51 回日本薬学会関東支部大会(2007 年 10 月・星薬大)

22) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椋沢 圭介, 岡山 明子, 加藤 美穂子, 小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之; アフィニティークロマトグラフィーを用いた食肉中残留抗菌性物質の試料精製; 日本薬学会第 128 年会(2008 年 3 月・横浜)

## G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 供試抗生物質

分類	抗生物質	メーカー	
β-ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	関東化学(株)
	アンピシリン	Ampicillin	Dr.Ehrenstorfer
	アスポキシシリン	Aspoxicillin	大日本住友製薬(株)
	ベンジルペニシリン	Benzylpenicillin	SIGMA
	クロキサシリン	Cloxacillin	Dr.Ehrenstorfer
	ジクロキサシリン	Dicloxacillin	SIGMA
	メシリナム	Mecillinum	シェリング(株)
	ナフシリン	Nafcillin	関東化学(株)
	オキサシリン	Oxacillin	Dr.Ehrenstorfer
	ペニシリンV	Penicillin V	Riedel-deHa e n
	セフォペラゾン	Cefoperazone	関東化学(株)
	セフロキシム	Cefuroxime	関東化学(株)
	セファピリン	Cephapirin	関東化学(株)
	セファロニウム	Cephalonium	供与品
	セファレキシン	Cephalexin	Dr.Ehrenstorfer
	セフキノム	Cefquinome	(株) インターベット
	セフチオフル	Ceftiofur	Dr.Ehrenstorfer
セファゾリン	Cephazolin	関東化学(株)	
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	Dr.Ehrenstorfer
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	SIGMA
	キタサマイシン	Kitasamycin	和光純薬工業(株)
	ジョサマイシン	Josamycin	山之内製薬(株)
	スピラマイシン	Spiramycin	協和発酵(株)
	ネオスピラマイシン I	Neospiramycin I	MERIAI
	タイロシン	Tylosin	Dr.Ehrenstorfer
	チルミコシン	Tilmicosin	Dr.Ehrenstorfer
	ツラスロマイシン	Tulathromycin	ファイザー(株)
	ミロサマイシン	Mirosamicin	東洋醸造(株)
	セデカマイシン	Sedecamycin	供与品
	テルデカマイシン	Terdecamycin	武田薬品工業(株)
	アブラマイシン	Apramycin	関東化学(株)
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomycin	Dr.Ehrenstorfer
パロモマイシン	Paromomycin	Dr.Ehrenstorfer	
ネオマイシン	Neomycin	Dr.Ehrenstorfer	
ゲンタマイシン	Gentamycin	和光純薬工業(株)	
ハイグロマイシンB	Hygromycin B	武田薬品工業(株)	
カナマイシン	Kanamycin	Dr.Ehrenstorfer	
スペクチノマイシン	Spectinomycin	SIGMA	
ストレプトマイシン	Streptomycin	Dr.Ehrenstorfer	
カスガマイシン	Kasugamycin	東京肥飼料検査所	

分類	抗生物質	メーカー	
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	SIGMA
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	SIGMA
	テトラサイクリン	Tetracycline	SIGMA
	ドキシサイクリン	Doxycycline	Dr.Ehrenstorfer
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	武田薬品工業(株)
	コリスチン	Colistin	Dr.Ehrenstorfer
	チオペプチン	Thiopeptin	供与品
	ノシヘプタイド	Nosiheptide	供与品
	バージニアマイシン	Virginiamycin	日本全薬工業(株)
	バシトラシン	Bacitracin	Dr.Ehrenstorfer
	ポリミキシンB	Polymyxin B	Dr.Ehrenstorfer
	アボパルシン	Avoparcin	Cynamid
ポリエーテル系	フラボフォスフォリポール	Flavophospholipol	Dr.Ehrenstorfer
	ラサロシド	Lasalocid	SIGMA
	モネンシン	Monensin	Dr.Ehrenstorfer
	サリノマイシン	Salinomycin	科研製薬(株)
	マジュラマイシン	Maduramicin	Riedel-deHaen
	ナラシン	Narasin	日本イーライリリー(株)
その他	センジュラマイシン	Semduramicin	コーキン化学(株)
	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	供与品
	アピラマイシン	Avilamycin	日本イーライリリー(株)
	チアムリン	Tiamulin fumerate	Dr.Ehrenstorfer
	リンコマイシン	Lincomycin	MP Biomedicals
	ビコザマイシン	Bicozamycin	セラケム(株)
	ノボビオシン	Novobiocin	関東化学(株)
	エフロトマイシン	Efrotomycin	旭化成N&P(株)
	ナナフロシン	Nanafrocin	協和発酵工業(株)
	ピルリマイシン	Pirlimycin	ファイザー(株)
バルネムリン	Valnemulin	SIGMA	

表2 供試合成抗菌剤

分類	合成抗菌剤	メーカー	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	SIGMA
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	SIGMA
	スルファジミジン	Sulfadimazine	関東化学(株)
	スルファドキシ	Sulfadoxine	関東化学(株)
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	SIGMA
	スルファメトキシピリダジン	Sulfamethoxy pyridazine	SIGMA
	スルファメラジン	Sulfamerazine	関東化学(株)
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	関東化学(株)
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	関東化学(株)
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	SIGMA
	スルファニトラン	Sulfanitran	Dr.Ehrenstorfer
	スルファブプロメタジン	Sulfabromomethazine	林純薬工業(株)
	スルファエトキシピリダジン	Sulfaethoxy pyridiazine	林純薬工業(株)
	スルファニルアミド	Sulfanilamide	Dr.Ehrenstorfer
	スルファモイルダプソン	Sulfamoyldapsone	大日本住友製薬(株)
	スルフィソゾール	Sulfisozole	林純薬工業(株)
	スルファトロキサゾール	Sulfatroxazole	林純薬工業(株)
	スルファグアニジン	Sulfaguanidine	Dr.Ehrenstorfer
	スルファクロロピリダジン	Sulfachlorpyridazine	関東化学(株)
	スルファジミジン	Sulfadimidine	関東化学(株)
スルファセタミド	Sulfacetamide	Dr.Ehrenstorfer	
スルファピリジン	Sulfapyridine	関東化学(株)	
スルファベンズアミド	Sulfabenzamide	関東化学(株)	
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	関東化学(株)
	ジフロキサシン	Difloxacin	Dr.Ehrenstorfer
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	関東化学(株)
	エノキサシン	Enoxacin	SIGMA
	フルメキン	Flumequine	関東化学(株)
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	SIGMA
	ミロキサシン	Miloxacin	住友製薬(株)
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	関東化学(株)
	ノルフロキサシン	Norfloxacine	関東化学(株)
	オフロキサシン	Ofloxacin	関東化学(株)
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	林純薬工業(株)
	オキシリン酸	Oxolinic acid	関東化学(株)

分類	合成抗菌剤	メーカー
	サラフロキサシン	Sarafloxacin Dr.Ehrenstorfer
	スパフロキサシン	Sparfloxacin SIGMA
	ベブフロキサシン (別名：ベノフロキサシン)	Vebufloxacin 供与品
	ピロミド酸	Piromidic acid 大日本製薬(株)
	シプロフロキサシン	Ciprofloxacin 供与品
その他	オラキンドックス	Olaquinox 和光純薬工業(株)
	ナイカルバジン	Nicarbazin 和光純薬工業(株)
	チアンフェニコール	Thiamphenicol 関東化学(株)
	フロルフエニコール	Florfenicol Dr.Ehrenstorfer
	アンプロリウム	Amprolium 関東化学(株)
	エトパベート	Ethopabate 関東化学(株)
	オルメトプリム	Ormethoprim 関東化学(株)
	クロピドール	Clopidol 関東化学(株)
	トリメトプリム	Trimethoprim 関東化学(株)
	ピリメタミン	Pyrimethamine 関東化学(株)
	デコキネート	Decoquate 協和発酵工業(株)
	ジアバリジン	Diaveridine SIGMA
	ジニトルミド	Dinitolmide SIGMA
	マラカイトグリーンシュウ酸塩	Malachite green oxalate 林純薬(株)

表3 抗生物質の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G. stearother-</i> <i>mophilus</i>	
$\beta$ -ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	0.001
	アンピシリン	Ampicillin	0.05	0.05	0.01	0.001
	アスポキシシリン	Aspoxicillin	1	2.5	0.5	0.001
	ベンジルペニシリン	Benzylopenicillin	0.05	0.1	0.01	0.001
	クロキサシリン	Cloxacillin	0.25	2.5	2.5	0.001
	ジクロキサシリン	Dicloxacillin	0.25	1	1	0.002
	メシリナム	Mecillinum	>5	>5	>5	0.1
	ナフシリン	Nafcillin	0.5	2.5	0.05	0.01
	オキサシリン	Oxacillin	0.1	2.5	0.25	0.01
	ペニシリン V	Penicillin V	0.01	0.1	0.05	0.001
	セフォペラゾン	Cefoperazone	2	>50	0.5	0.001
	セフロキシム	Cefuroxime	0.25	>50	0.5	0.001
	セファピリン	Cephapirin	0.01	0.5	0.1	0.001
	セファロニウム	Cephalonium	0.25	5	1	0.005
	セファレキシム	Cephalexin	0.5	5	0.5	0.01
	セフキノム	Cefquinome	1	2.5	0.25	0.1
	セフトイフル	Ceftiofur	0.05	2.5	0.1	0.0005
	セファゾリン	Cephazolin	5	10	10	0.002
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	0.5	0.1	0.05	1
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	5	0.5	0.25	25
	キササマイシン	Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	2.5
	ジョサマイシン	Josamycin	2.5	1	0.25	2.5
	スピラマイシン	Spiramycin	10	1	0.5	5
	ネオスピラマイシン I	Neospiramucin I	10	2.5	0.5	5
	タイロシン	Tylosin	2.5	0.5	0.5	0.25
	チルミコシン	Tilmicosin	2.5	0.5	0.5	0.5
	ツラスロマイシン	Tulathromycin	>50	0.5	0.5	25
	ミロサマイシン	Mirosamicin	2.5	2.5	0.5	0.1
	セデカマイシン	Sedecamycin	>50	>50	2.5	5
	テルデカマイシン	Terdecamycin	>50	>50	1	50
アミノグリコシド系	アプラマイシン	Apramycin	10	2.5	10	5
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomyc	10	0.5	2.5	2.5
	パロモマイシン	Paromomycin	10	0.5	10	5
	ネオマイシン (フラジオマイシン)	Neomycin (Fradiomycin)	2.5	2.5	2.5	1
	ゲンタマイシン	Gentamycin	1	0.5	5	0.5
	ハイグロマイシン B	Hygromycin B	>50	25	10	50
	カナマイシン	Kanamycin	2	1	5	5
	スペクチノマイシン	Spectinomycin	>10	12.5	10	5
	ストレプトマイシン	Streptomycin	5	0.5	2.5	5
	カスガマイシン	Kasugamycin	>50	>50	>50	>50

分類	抗生物質	検出感度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G.stearother-</i> <i>mophilus</i>	
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	0.25	5	10	0.1
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	0.05	0.5	10	0.5
	テトラサイクリン	Tetracycline	0.25	5	10	0.1
	ドキシサイクリン	Doxycycline	0.05	0.1	1	0.1
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	2.5	2.5	5	0.1
	コリスチン	Colistin	>50	>50	>50	25
	チオペプチン	Thiopeptin	0.5	1	0.5	0.1
	ノシヘプタイド	Nosiheptide	5	2.5	0.1	0.05
	バージニアマイシン	Virginiamycin	2.5	5	0.1	0.1
	バシトラシン	Bacitracin	>10	>10	0.4	0.5
	ポリミキシン B	Polymyxin B	>50	>50	>50	10
	アボパルシン	Avoparcin	2.5	2.5	10	1
フラボフォスホリポール	Flavophospholipol	2.5	>50	>50	1	
ポリエーテル系	ラサロシド	Lasalocid	2.5	10	50	1
	モネンシン	Monensin	10	10	50	1
	サリノマイシン	Salinomycin	1	10	50	0.25
	マデュラムマイシン	Maduramicin	2.5	25	>50	1
	ナラシン	Narasin	1	10	>50	0.1
	センデュラムマイシン	Semduramicin	25	>50	>50	5
	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	10	10	5	5
その他	アピラマイシン	Avilamycin	1	10	10	2.5
	チアムリン(フマル酸チアムリン)	Tiamulin fumarate	>50	50	0.25	0.5
	リンコマイシン	Lincomycin	>50	10	0.5	0.25
	ビコザマイシン	Bicozamycin	>50	>50	>50	50
	ノボビオシン	Novobiocin	0.5	10	10	0.1
	エフトマイシン	Efrotomycin	50	>50	>50	0.5
	ナナフロシン	Nanafrocin	2.5	10	50	0.25
	ピルリマイシン	Pirlimycin	0.5	0.1	0.1	0.25
	バルネムリン	Valnemulin	50	10	2.5	0.05

表4 合成抗菌剤の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G.stearother</i> - <i>mophilus</i>	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	>50	>50	>50	>50
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimidine	>50	>50	>50	>50
	スルファドキシ	Sulfadoxine	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキシピリダジ	Sulfamethoxypridazi	>50	>50	>50	>50
	スルファメラジン	Sulfamerazine	>50	>50	>50	>50
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	>50	50	>50	>50
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	>50	>50	>50	>50
	スルファニトラン	Sulfanitran	>50	50	>50	>50
	スルファブプロメタジン	Sulfabromomethazine	>50	50	>50	>50
	スルファニルアミド	Sulfanilamide	>50	50	>50	>50
	スルファモイルダブソン	Sulfamoyldapsone	>50	50	>50	>50
	スルフィソゾール	Sulfisozole	>50	50	>50	>50
	スルファトロキサゾール	Sulfatroxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファグアニジン	Sulfaguanidine	>50	50	>50	>50
	スルファクロピリダジン	Sulfachlorpyridazine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimidine	>50	50	>50	>50
	スルファセタミド	Sulfacetamide	>50	50	>50	>50
スルファピリジン	Sulfapyridine	>50	50	>50	>50	
スルファベンズアミド	Sulfabenzamide	>50	50	>50	>50	
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	1	0.1	2	2
	ジフロキサシン	Difloxacin	0.5	0.05	>50	2.5
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	エノキサシン	Enoxacin	2.5	2.5	>10	1
	フルメキン	Flumequine	1	2.5	>50	>50
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	1	0.1	5	1
	ミロキサシン	Miloxacin	0.5	2.5	>50	50
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	1	10	>50	>50
	ノルフロキサシン	Norfloxacin	1	0.5	>50	1
	オフロキサシン	Ofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	0.5	0.25	25	2.5
	オキソリン酸	Oxolinic acid	0.5	1	>50	5
	サラフロキサシン	Sarafloxacin	0.5	0.25	50	0.5



分類	抗生物質	検出感度 (μg/mL)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G.stearother</i> - <i>mophilus</i>	
キノロン剤	スパフロキサシン	Sparfloxacin	0.5	0.1	5	1
	ベブフロキサシン	Vebufloxacin	2.5	0.5	25	2.5
	ピロミド酸	Piromidic acid	1	10	>50	>50
	シプロフロキサシン	Ciprofloxacin	0.5	0.25	5	1
その他	オラキンドックス	Olaquinox	>50	>50	>50	>50
	ナイカルバジン	Nicarbazin	>50	>50	>50	>50
	チアンフェニコール	Thiamphenicol	10	25	25	2.5
	フロルフエニコール	Florfenicol	2.5	2.5	5	1
	アンプロリウム	Amprolium	>50	>50	>50	>50
	エトパベート	Ethopabate	>50	>50	>50	>50
	オルメトプリム	Ormethoprim	50	10	50	50
	クロピドール	Clopidol	>50	>50	>50	>50
	トリメトプリム	Trimethoprim	25	2.5	25	50
	ピリメタミン	Pyrimethamine	>50	50	>50	>50
	デコキネート	Decoquate	>50	>50	>50	>50
	ジアベリジン	Diaveridine	>50	10	10	5
	ジニトルミド	Dinitolmide	>50	>50	>50	>50
	マラカイトグリーン シュウ酸塩	Malachite green oxala	5	1	25	1

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
石井里枝ら	LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のクロラムフェニコールの分析	食品衛生学雑誌	47	58-65	2006
竹上晴美ら	高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による乳中のマクロライド系抗生物質の定量	分析化学	55	651-659	2006
岩崎雄介ら	酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキノロン系抗菌剤の分析	分析化学	55	943-948	2006
石井里枝ら	LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のテトラサイクリン系抗生物質の分析	食品衛生学雑誌	47	277-283	2006
堀江正一ら	微生物学的試験法による畜産物中に残留する抗菌性物質の高感度測定法	分析化学	56	1097-1103	2007
神田真軌ら	微生物学的スクリーニング, HPLCおよびLC/MS/MSによる食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質4薬剤の迅速分析	食品衛生学雑誌	49	37-44	2008

## 報 文

LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中の  
テトラサイクリン系抗生物質の分析

(平成 18 年 7 月 24 日受理)

石井里枝\*<sup>1,†</sup> 堀江正一\*<sup>1</sup> 村山三徳\*<sup>2</sup> 米谷民雄\*<sup>2</sup>

## Analysis of Tetracyclines in Honey and Royal Jelly by LC/MS/MS

Rie ISHII\*<sup>1,†</sup>, Masakazu HORIE\*<sup>1</sup>, Mitsunori MURAYAMA\*<sup>2</sup>  
and Tamio MAITANI\*<sup>2</sup>(\*<sup>1</sup> Saitama Prefectural Institute of Public Health: 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku,  
Saitama 338-0824, Japan; \*<sup>2</sup> National Institute of Health Sciences:  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;  
†Corresponding author)

A simple and accurate method using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) was developed for the determination of tetracyclines (TCs), *i.e.*, oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC) and tetracycline (TC), in honey and royal jelly. Mass spectral acquisition was performed in the positive mode. In LC separation, L-column ODS and 0.01% formic acid-acetonitrile were used as the column and mobile phase, respectively. TCs in a honey sample were diluted with water, while TCs in royal jelly were extracted with 2% metaphosphoric acid-methanol (6:4). They were cleaned up with Oasis HLB and Sep Pak C18 cartridges, respectively. The quantification limits of TC, OTC, and CTC were 5, 5, and 10 ng/g, respectively, while those in royal jelly were 25, 25, and 50 ng/g, respectively. The recoveries of TCs from both honey and royal jelly were 75-120%.

(Received July 24, 2006)

**Key words:** テトラサイクリン系抗生物質 tetracyclines; オキシテトラサイクリン oxytetracycline; テトラサイクリン tetracycline; クロルテトラサイクリン chlortetracycline; 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 LC/MS/MS; ハチミツ honey; ローヤルゼリー royal jelly

## 緒 言

畜水産動物の疾病予防, 治療に用いられる抗生物質および合成抗菌剤は, 畜水産食品の生産性向上に大きく寄与している。これらのうちテトラサイクリン系抗生物質 (TCs) は放線菌が産生する抗菌性物質でグラム陽性菌, 陰性菌, リケッチアおよびクラミジアなど, 広範囲の抗菌スペクトルを有することから, 動物用医薬品および飼料添加物として汎用されてきた。また, TCs はみつばちの家畜伝染病であるアメリカ腐蛆病およびヨーロッパ腐蛆病の予防, 治療に極めて有効であることから, 養蜂の過程で使用される可能性が高く, ハチミツをはじめとする養蜂関連の食品に残留することが懸念されている。近年の検疫所における輸入食品のモニタリング検査などでもハチミツ加工品や花粉

加工品から高頻度に検出されている。

TCs のはちみつを対象とした分析法はこれまでにエンザイムイムノアッセイ法<sup>1)</sup>, 薄層クロマトグラフィー<sup>2)</sup>, UV 検出 HPLC 法<sup>3), 4)</sup>, 蛍光検出 HPLC 法<sup>5), 6)</sup> など数多く報告されている。UV 検出 HPLC 法では特異性や感度の面で問題があり, また, 蛍光検出 HPLC 法では検出感度の面では UV 法に比べ優れているが, 百花蜜やソバ蜜などを対象とした場合, 起源植物由来のきょう雑成分により測定が困難であり, 精製操作を追加するなどの工夫をしなければならないことがある。近年, LC/MS/MS を用いた方法が複雑な食品マトリックス中に残留するごく微量な化学物質の分析法として汎用されてきている。ハチミツを対象とした LC/MS/MS を用いた TCs の分析方法についても報告されているが<sup>7), 8)</sup>, これらはいずれもソバ蜜など, きょう雑成分が多いと考えられるハチミツを分析対象としていない。一方, ローヤルゼリー中の TCs の分析法については藤田ら<sup>9)</sup> によるバイオアッセイ法が報告されているだけで機器分析による方法はいまだ報告されていない。そ

† 連絡先

\*<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所: 〒338-0824 さいたま市桜区上大久保 639-1\*<sup>2</sup> 国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区 上用買 1-18-1

Table 1. MS Conditions for TCs

Ionization	ESI, Positive				
Analysis mode	MRM				
Capillary voltage	3.0 kV				
Desolvation gas flow	N <sub>2</sub> , 900 L/hr				
Cone gas flow	N <sub>2</sub> , 50 L/hr				
Source temp.	120°C				
Desolvation temp.	400°C				
	Transition reactions ( <i>m/z</i> )	Product ions	Cone (V)	Collision energy (eV)	
CTC	479→462	[M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	30	20	*2
	479→444	[M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	30	20	*1
OTC	461→444	[M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	30	15	*2
	461→426	[M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	30	20	*1
TC	445→428	[M+H-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	25	15	*2
	445→410	[M+H-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	25	20	*1

\*1 Used for quantitation

\*2 Used for confirmation

ここで今回、ハチミツおよびローヤルゼリー中のLC/MS/MSを用いたTCsの簡便で精度の高い分析法を検討した。わが国におけるハチミツ中のテトラサイクリン系抗生物質の基準はオキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)およびテトラサイクリン(TC)の総和として0.3 ppmという暫定基準が設定されていることから、これら3種を対象とした。

## 実験方法

### 1. 試料および試薬

試料は埼玉県内で市販されているハチミツ(ソバ蜜、百花蜜、アカシヤ蜜、レンゲ蜜、クリ蜜、ミカン蜜、トチ蜜)およびローヤルゼリー(クリームタイプ、錠剤、顆粒剤)を用いた。

標準品: CTC塩酸塩およびOTC塩酸塩は関東化学(株)製を、TC塩酸塩はAcros Organics社製を使用した。

標準溶液: 各標準品100 mgを精ひょうし、OTCはアセトニトリルに、TCおよびCTCはメタノールにそれぞれ溶解して100 mLとしたものを標準原液とした。3種の標準原液をそれぞれ10 mL採取し、アセトニトリルで50 mLとし標準混合原液とした。適宜10%メタノールで希釈して標準混合溶液とした。

除タンパク・抽出溶媒: 2%メタリン酸-メタノール(6:4)を10~15°Cに冷却して用いた(用時調製)。

Oasis HLB(60 mg)カートリッジおよびSep-Pak plus C18(360 mg)カートリッジ: Waters社製、カートリッジはあらかじめメタノールおよび精製水で、コンディショニングした後、使用した。

メタノールおよびアセトニトリルは液体クロマトグラフィー用を、ギ酸はLC/MS用を、その他の試薬は特級を使用した。

### 2. 装置

高速液体クロマトグラフ: Waters社製Alliance 2695

質量分析装置: Waters社製Quattro premier

### 3. 測定条件

分析カラム: (財)化学物質評価研究機構製L-column ODS(2.1 mm i.d.×100 mm, 粒子径3 μm), カラム温度: 40°C, 移動相: A液 水, B液アセトニトリル, C液0.1%ギ酸, グラジエント条件: 0~1分(A:B:C=85:5:10)→15分(10:80:10), 流速: 0.2 mL/min, 注入量: 10 μL

質量分析装置の条件はTable 1に示した。

### 4. 試験溶液の調製

#### 4.1 ハチミツ試験溶液の調製

試料5 gを採り精製水20 mLを加え、超音波により溶解した。その液をOasis HLB(60 mg)カートリッジに負荷し、精製水10 mLで洗浄後、メタノール5 mLで溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残さを10%メタノール5 mLに溶解し、試験溶液とした。

#### 4.2 ローヤルゼリー試験溶液の調製

試料1 gを採り、除タンパク・抽出溶媒100 mLを加えて2分間ホモジナイズした後、吸引ろ過した。ろ液を約20 mLまで減圧濃縮し、Sep-Pak plus C18(360 mg)カートリッジに負荷した。精製水10 mLで洗浄後、30%メタノール5 mLで溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残さを10%メタノール5 mLに溶解し、試験溶液とした。

### 5. 定量

各試験溶液10 μLをLC/MS/MSに注入し、絶対検量線法でTCsを定量した。

## 結果および考察

### 1. LC/MS/MS条件の検討

#### 1.1 LC条件の検討

Fig. 1に分析対象とした3種のTCsの構造式を示した。

TCsはC<sub>11</sub>~C<sub>12</sub>のβ-ジケトン構造部位<sup>10)</sup>あるいはC<sub>2</sub>

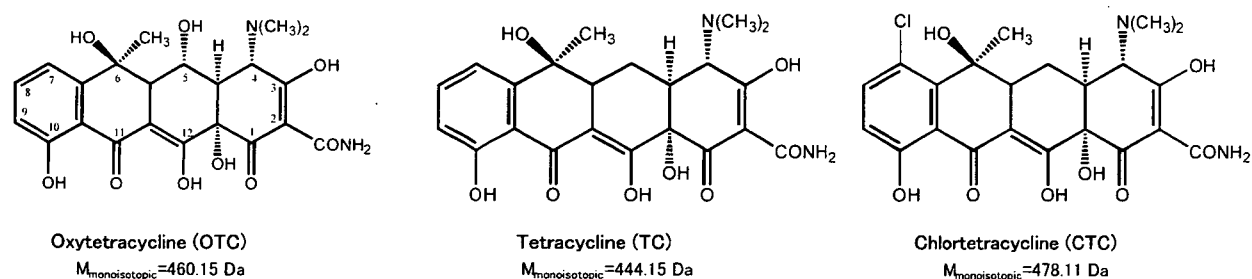


Fig. 1. Chemical structures of three TCs studied in this study

のカルボキシアミド基<sup>11), 12)</sup>で金属イオンと配位結合することが報告されており、精製工程で用いられる固相カートリッジや分析カラム中の金属不純物などと結合するため分析を困難にしている。そこで分析カラムについて数種のODS系カラム (L-column ODS, Cadenza CD-C18, Symmetry C18, Mightysil RP-18 GP) を検討したところ、感度面およびピーク形状、特にリーディングする傾向にあるCTCのピーク形状においてL-column ODSが極めて優れていた。MS部におけるイオン化の促進および安定化のために移動相へ加える添加剤について、ギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウムを検討したところ、ギ酸が最も効率的にプロトン化分子を生成した。移動相の有機溶媒はメタノールおよびアセトニトリルを検討したところ、感度面では両者にほとんど差は認められなかったが、ピーク形状、カラム圧からアセトニトリルを採用した。きょう雑ピークとの分離のため、アセトニトリル濃度5%から80%までのグラジエント溶出にて行った。

### 1.2 MS/MS条件の検討

TCsは比較的極性に富む化合物であることから、インターフェイスには極性化合物のイオン化に適したエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を選択し、Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法で測定した。イオン化モードは感度良く測定できたポジティブモードで行った。3種の化合物ともにプロトン化分子をプリカーサーイオンとして衝突遊離解離により生ずるプロダクトイオンをモニターした。CTCは  $m/z$  479 → 444, 462 を、OTCは  $m/z$  461 → 426, 444 を、TCは  $m/z$  445 → 410, 428 の特徴的なフラグメントイオンを生成したため、より感度の良いイオンを定量用に、もう一方を確認用イオンとして設定した。各モニターイオンとも最も効率的に生成するコーン電圧、コリジョンエネルギーを検討した結果、Table 1 に示す条件が最適であった。

### 2. MRMの分析精度

各定量用イオンのピーク面積比を用いて、絶対検量線を作成した。5~100 ng/mL (0.05~1 ng) の範囲で良好な直線性 ( $r = 0.9993 \sim 0.9999$ ) が得られた。また、2濃度 (10, 50 ng/mL) における測定を5回行い、ピーク面積の変動係数を求めたところ、いずれの濃度においても6%以内であり、良好な再現性が得られた。本法を用いた標準品の定量下限値はOTC, TCで5 ng/mL, CTCで10

ng/mL ( $S/N \geq 10$ ) であった。

### 3. 前処理法の検討

#### 3.1 ハチミツの前処理法の検討

ハチミツ中のTCsの前処理法としてEDTA-MacIlvaine緩衝液<sup>3), 4), 6)</sup>、塩酸<sup>5), 8)</sup>、しゅう酸緩衝液<sup>7)</sup>で抽出後、SPEカートリッジカラム (C18<sup>2), 3), 5)</sup>、フェニル<sup>4)</sup>、陽イオン交換樹脂<sup>2)</sup>、Oasis HLB<sup>6)~8)</sup>などで精製する方法が報告されている。本法では水で希釈後、固相カートリッジで精製する簡便な方法を検討した。精製カートリッジには残存シラノール基や金属不純物などの影響が少ないと考えられるポリマー系ゲルが充填されたOasis HLBカートリッジカラムを採用した。ハチミツ (百花蜜) を精製水に溶解した後、Oasis HLB (60 mg) カートリッジに負荷し、水-メタノール混液で溶出した。TCsの溶出画分について0, 10, 30, 60, 100%メタノールを検討した。水画分ではTCsは3種ともに溶出せず、OTCとTCは30%画分にその約65%が、60%画分に約35%が溶出した。CTCは10%画分から一部が溶出し始め、100%画分においても約10%程度溶出することから、水で洗浄、メタノールで溶出することとした。本法では検出器にMS/MSを用いていることから選択性が高く、Oasis HLBカートリッジカラムの精製のみで妨害のない良好なクロマトグラムが得られた (Fig. 2(B))。

ハチミツはその起源植物により成分、性状が異なり、特に色の濃いハチミツ (そば蜜、百花蜜など) では検出器にUV検出器や蛍光検出器、あるいはシングルMSを用いた場合、妨害ピークが観測され、分析が困難な場合がある。しかし本法は、ソバ蜜、百花蜜、クリ蜜、トチ蜜、ミカン蜜、アカシヤ蜜およびレンゲ蜜などの多種類のハチミツに適用しても、いずれも妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。

#### 3.2 ローヤルゼリーの前処理法の検討

ローヤルゼリーはクリームタイプ、カプセル剤、錠剤、ドリンク剤、粉末などさまざまな剤型があるが、賦形剤を含有していないローヤルゼリー100%のクリームタイプの製品の分析が最も困難であると考え、これを用いて各検討条件における回収率を検討した。また、抽出、精製した試験溶液にTCs標準品を添加し、標準品のピーク面積値と比較することによって、イオン化抑制および増強作用に

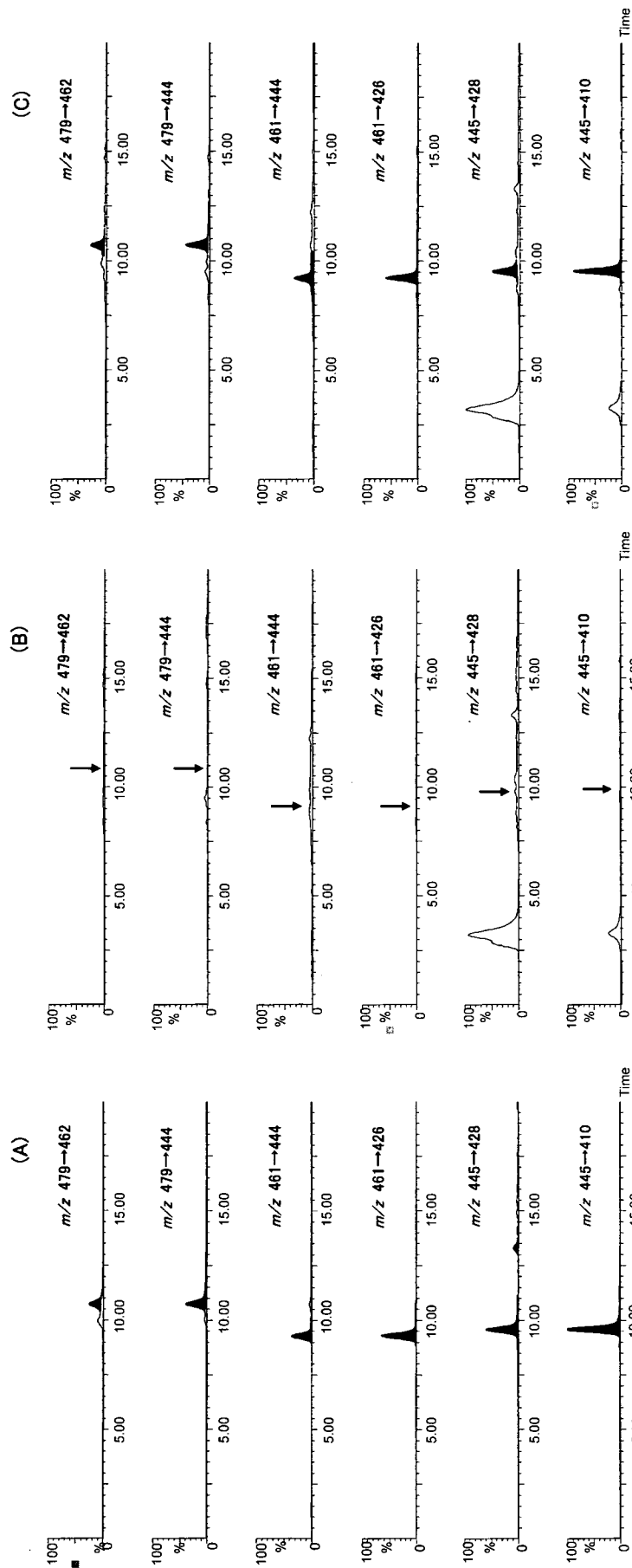


Fig. 2. MRM chromatograms of standard TCs (50 ng/mL) (A), blank honey sample from many flowers (B), blank honey sample from many flowers fortified with TCs (50 ng/g) (C)

Arrow indicates the retention time of TCs.

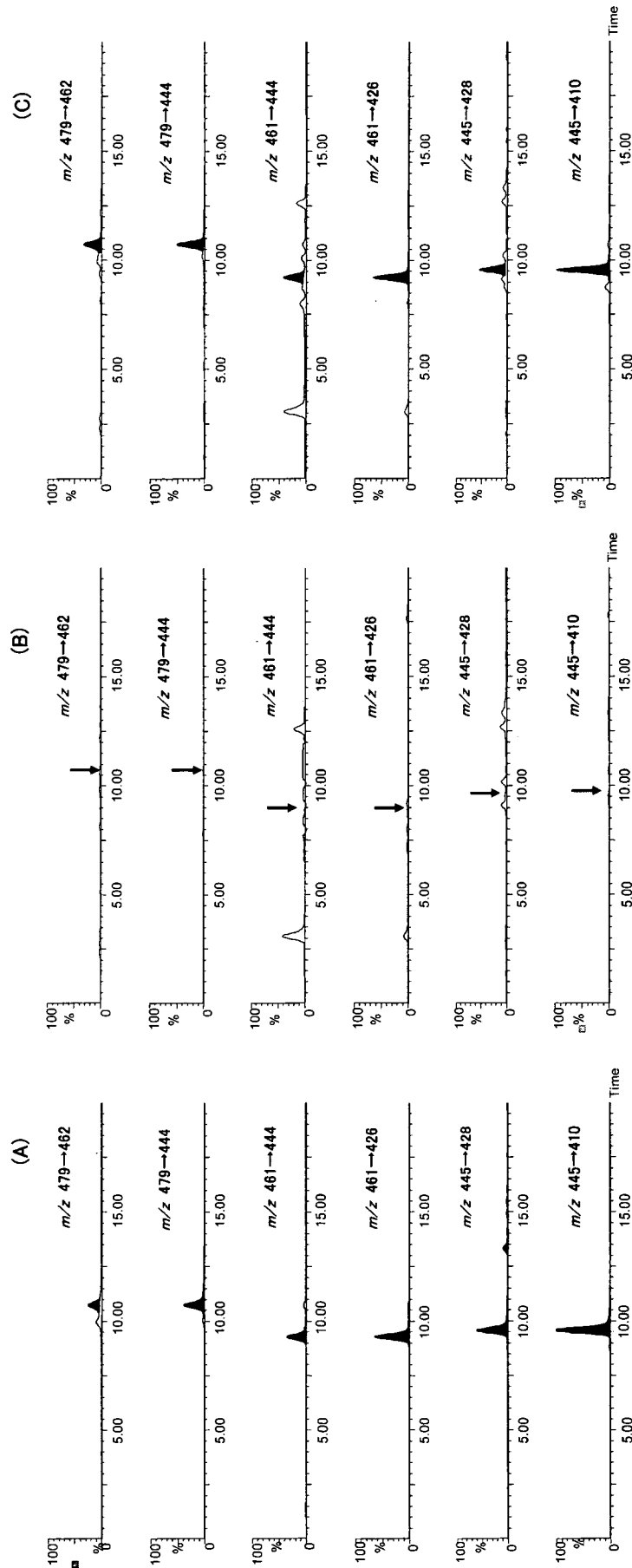


Fig. 3. MRM chromatograms of standard TCs (50 ng/mL) (A), blank royal jelly sample (B), blank royal jelly sample fortified with TCs (250 ng/g) (C)

Arrow indicates the retention time of TCs.

について検討し、最適な条件を決定した。3.1で検討したハチミツの前処理法を適用したところ、カートリッジカラムが目詰まりする等の問題が生じた。そこで、ローヤルゼリーはタンパク質を多く含む食品であることから、畜産食品中の残留抗生物質分析の前処理法で用いられているメタリン酸-メタノール混液<sup>13)</sup>で、除タンパク、抽出操作を行った。2%メタリン酸-メタノール混液の組成比を8:2, 6:4, 4:6としたときのTCsのイオン化抑制、増強作用について検討した。OTCおよびTCではイオン化抑制、増強作用は認められなかったが、CTCは4:6および6:4の組成比では約10%、8:2の組成比では約30%のイオン化増強作用が認められた。8:2の抽出溶媒ではろ過後のろ液が白濁しており、タンパク質の除去が不十分であった。除タンパク効果としてメタリン酸だけでなくメタノールによるタンパク質の変性、沈殿生成が有効であると考えられた。回収率については4:6の組成のときにTCの回収率が約75%と若干低い傾向であった。以上のことから抽出溶媒には6:4の組成比を採用した。また、メタリン酸の濃度を0, 0.5, 1, 2, 4%と変化させて調製したそれぞれのローヤルゼリー試験溶液にTCs標準液を添加し、イオン化抑制および促進作用に及ぼす影響を調べることで、最も除タンパク効果が高く、かつイオン化に対する影響の少ないメタリン酸濃度を決定した。0%溶液ではろ過時に目詰まりするなど、除タンパク効果は低く、0.5%溶液ではOTCで32%、TCで35%のイオン化抑制作用が、1%でもOTCで14%、TCで17%のイオン化抑制作用が観測された。2%および4%濃度メタリン酸では顕著なイオン化抑制および増強作用は認められなかった。そこでメタリン酸濃度は2%とした。精製カートリッジカラムについてはハチミツで用いたOasis HLB (60 mg)カートリッジではローヤルゼリー由来の成分によりTCsが十分に保持されなかったため、充てん量の多いOasis HLB (200 mg, 500 mg)を検討したが同様の結果であった。また、これらTCsはジメチルアミノ基を有することから陽イオン交換樹脂(Oasis MCX 150 mg)を用い、2%ギ酸、メタノールで洗浄後、アンモニア-メタノール混液

で溶出する精製方法も試みたが、同様の結果であった。そこで、シリカゲルベースのSep Pak plus C18 (360 mg)について検討したところ、良好な結果が得られた。TCsは分析上の特徴として、分析カラムや精製カラム中の残存シラノール基<sup>14), 15)</sup>や金属不純物<sup>10)~12)</sup>に強く結合するため、それらを考慮する必要があることが一般的に言われている。しかし、ローヤルゼリー成分由来の特殊なマトリックス下においては、シリカゲルベースのカートリッジが検討した中で最も良好な回収率が得られた。TCsの溶出画分についてメタノール濃度を0, 10, 30, 60, 100%と変化させ検討したところ、水の画分では溶出が認められず、30%メタノール溶液5 mLで3種のTCsともほぼ100%溶出したことから精製水10 mLで洗浄後、30%メタノール5 mLで溶出することとした。また、試験溶液のメタノール濃度について10, 20, 30%でのイオン化抑制および促進作用を検討したところ、30%メタノール濃度では約24~30%の抑制作用が認められた。これは、水に難溶性、あるいは比較的脂溶性の高い成分の溶解が促進され、それらマトリックスの影響によりイオン化抑制作用が観測されたものと考えられた。そこで、試験溶液の組成はピーク形状も勘案して、10%メタノールとした。試験溶液量については、濃縮操作により定量下限値の低下を試みたが、1, 2 mLの溶液量ではTCで約50%程度の著しいイオン化抑制作用が認められたため、試験溶液は5 mLとした。本法により分析したローヤルゼリー(クリームタイプ)のクロマトグラムをFig. 3(B)に示した。妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。

#### 4. 添加回収実験

あらかじめTCsを含有していないことを確認したハチミツ(百花蜜およびそば蜜)およびローヤルゼリー(クリームタイプ、錠剤タイプおよび顆粒タイプ)にTCsを添加し、回収率を求めた。Table 2に示すように、いずれも回収率は75~120%、標準偏差は10%以内であり、残留分析法として満足できる値が得られた。TCsを添加したハチミツおよびローヤルゼリーのMRMクロマトグラムをFig. 2(C)およびFig. 3(C)に示した。

Table 2. Recoveries of TCs from Honey and Royal Jelly

Sample	Origin plant or dosage form	Fortification level (ng/g)	Recovery (%) <sup>*1</sup>		
			CTC	OTC	TC
Honey	Many flowers	50	118.1±8.9	89.6±4.8	95.8±8.8
		10	112.3±5.2	87.6±6.8	97.6±4.6
	Soba	50	91.3±5.7	84.6±2.1	75.4±8.1
		10	105.7±7.1	89.7±4.6	89.8±6.2
Royal jelly	Cream	250	117.1±8.1	89.7±5.1	80.4±5.1
		50	114.0±6.7	85.4±6.7	85.1±2.1
	Tablet	250	111.4±5.4	93.8±4.5	96.8±4.7
		50	107.2±2.1	97.5±5.4	92.4±3.9
	Granule	250	102.1±2.3	105.7±6.1	98.7±2.6
		50	99.8±2.4	97.5±3.7	97.1±4.8

\*1 Values are the mean±S.D. (n=3)



## 5. 実態調査

埼玉県内で市販されていたハチミツ 12 検体 (ソバ蜜, 百花蜜, アカシヤ蜜, レンゲ蜜, クリ蜜, ミカン蜜, トチ蜜) およびローヤルゼリー 6 検体 (クリームタイプ, 錠剤, カプセル剤, 顆粒剤, 散剤) について, 本法を用いて残留実態調査を行ったところ, いずれの検体からも TCs は検出されなかった。

## まとめ

LC/MS/MS を用いたハチミツおよびローヤルゼリー中の TCs の簡便で精度の高い分析法を検討した。

1. 前処理法はハチミツについては精製水で希釈後, ローヤルゼリーについてはメタリン酸-メタノール混液で除タンパク後, それぞれ Oasis HLB, Sep Pak C 18 で精製した。
2. LC/MS/MS 条件は ESI, ポジティブモードを採用した。移動相には 0.01% ギ酸-アセトニトリルを, カラムには L-column ODS を用いた。
3. 本法による定量下限値 ( $S/N \geq 10$ ) はハチミツで TC, OTC が 5 ng/g, CTC が 10 ng/g, ローヤルゼリーでは TC, OTC が 25 ng/g, CTC が 50 ng/g であった。定量下限値レベルでの 3 種の TCs の添加回収率はハチミツおよびローヤルゼリーとも 75~120% であった。
4. 本法を適用してハチミツ 12 検体, ローヤルゼリー 6 検体について実態調査を行ったところ, いずれの検体からも TCs は検出されなかった。
5. 今回構築した TCs の分析法は, ハチミツ中の TCs の暫定基準値 (0.3  $\mu\text{g/g}$ ) を十分クリアでき, 簡便で精度の高い分析法であると考えられる。

## 文献

- 1) Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R., Martlbauer, E., Immunochemical screening for antimicrobial drugs residues in commercial honey. *Analyst*, **123**, 2,759-2,762 (1998).
- 2) Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Harada, K., Suzuki, M., Improvement of chemical analysis of antibiotics. XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J. Chromatogr.*, **400**, 253-261 (1987).
- 3) Oka, H., Ikai, Y., Kawamura, N., Uno, K., Yamada, M., Improvement of chemical analysis of antibiotics IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system. *J. Chromatogr.*, **389**, 417-426 (1987).
- 4) Vinas, P., Balsalobre, N., Lopez-Erroz, C., Hernandez-Cordoba, M., Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J. Chromatogr. A*, **1022**, 125-129 (2004).
- 5) Nakaya, K., Kobayashi, Y., Tanahashi, N., Fluorometric determination of tetracyclines in honey by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **32**, 43-47 (1991).
- 6) Pena, A., Pelantova, N., Lino, C. M., Silveira, M. I. N., Solich, P., Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3,784-3,788 (2005).
- 7) Khong, S.-P., Hammel, Y.-A., Guy, P. A., Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 493-502 (2005).
- 8) Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B., Widmer, M., Quantitative LC/MS/MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *J. AOAC Int.*, **85**, 853-860 (2002).
- 9) Fujita, K., Ito, H., Yamaguchi, T., Yoneyama, S., Sengoku, K., Sumiya, Y., Watanabe, M., Mizutani, Y., Hirose, T., Inter-laboratory validation studies of biological method for determination of tetracyclines in royal jelly. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **46**, 286-289 (2005).
- 10) Ishidate, M., Sakaguchi, T., Metal chelate compounds of tetracycline derivatives. I. Aureomycin. *Chem. Pharm. Bull.*, **2**, 147-155 (1955).
- 11) Doluisio, J. M., Martin, A. N., Metal complexation of the tetracycline hydrochlorides. *J. Med. Chem.*, **41**, 16-20 (1963).
- 12) Ishino, M., Sakaguchi, T., Morimoto, I., Okitsu, T., Coordination of tetracycline to  $\text{Cu}^{2+}$  in acidic solution. *Yakugaku Zasshi*, **101**, 118-124 (1981).
- 13) Horie, M., Takegami, H., Toya, K., Kikuchi, Y., Nakazawa, H., Determination of spiramycin and tilmicosin in meat and fish by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **44**, 150-154 (2003).
- 14) Bogert, C., Kroon, A. M., Fluorometric determination of tetracyclines in small blood and tissue samples. *J. Pharm. Sci.*, **70**, 186-189 (1981).
- 15) Zia, H., Price, J. C., Binding study of tetracyclines to human serum albumin using difference spectrophotometry. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 226-230 (1976).

報 文

## 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる 食肉中のキノロン系抗菌剤の分析

岩崎 雄介<sup>1</sup>, 伊東 岳<sup>1</sup>, 北村 渉<sup>1</sup>, 加藤美穂子<sup>2</sup>, 小平 司<sup>2</sup>,  
堀江 正一<sup>3</sup>, 伊藤 里恵<sup>1</sup>, 斉藤 貢一<sup>1</sup>, 中澤 裕之<sup>®1</sup>

キノロン系抗菌剤は人や動物に対して治療を目的に幅広く使用されている。しかし、畜水産食品においてキノロン系抗菌剤の残留が数多く検出されていることから、薬物残留を評価するのに簡便且つ迅速に分析可能な市販 ELISA キットによるスクリーニングが期待される。酵素免疫測定法 (ELISA) 法は多数の検体を一度に処理できるが、交差反応性に起因する同定能力等に課題を有する。そこで、ELISA 法として開発された New Quinolone Kit の有用性を検証するために、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) を用いた高精度な機器分析法を構築し、比較検討した。HPLC/FL による検出限界及び定量限界はエンロフロキサシンにおいて 2 ng/g 及び 10 ng/g であった。エンロフロキサシン 50 ng/g を添加したところ、回収率は 107.8% と良好な結果を得ることができた。ELISA 法との相関性を検討するため、同一食肉を試料として HPLC/FL 及び ELISA 法をそれぞれ適用したところ、両者の値に相関性が認められた。HPLC/FL では煩雑な前処理及び約 120 分の分析所要時間を必要とするため、ELISA 法は 1 次スクリーニング法として有用であると考えられる。

### 1 緒 言

近年、粉卵やハチミツなどの輸入食品を中心に抗菌性物質の残留が数多く検出されている<sup>1)2)</sup>。これらの薬剤は、主に疾病の治療を目的とした動物用医薬品を目的として使用されており、法的に規制された用法用量、休薬期間等が遵守されずに使用された場合、畜水産食品中に残留するといわれている。更に、キノロン系に代表される抗菌剤の一部は生体内においても代謝されにくく、未変化体として土壤や環境水に流出されている<sup>3)4)</sup>。そして、環境中に残留した抗菌剤による、生態系への影響や、抗生物質が効かない薬剤耐性菌を引き起こすことが懸念されている。

抗菌性物質の定量には液体クロマトグラフィー等の機器分析が主に使用されており、キノロン系抗菌剤の分析法も数多く報告されている<sup>5)~7)</sup>。しかし、測定対象薬剤や試料によって前処理方法を変えなければならず、更に測定時間が長いことを考慮すると、多数の検体を簡便に測定するためには適当でないと考えられる。

一方、多数の検体を対象に医薬品の残留を評価するには簡便且つ迅速に分析可能な Enzyme-linked immunosor-

bent assay (ELISA) 法が有用であると考えられる。ELISA 法は抗原抗体反応を利用した免疫化学的な測定法の一つで、特定の物質に対して特異的に検出することが可能なため、比較的簡単な前処理操作で、短時間に多数の検体を分析することができる。しかし、ELISA 法は十分な免疫原性と酵素活性を保持した標識抗原の作製が難しいことや、固相化の作業などが煩雑であるため、残留分析の領域では普及が進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、市販 ELISA キットの 1 次スクリーニング法としての有用性を検証することを目的として、畜産食品に残留するキノロン系抗菌性物質を対象とした高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) と ELISA 法による分析を実施し、その値の相関性を評価した。

### 2 実 験

市販 ELISA キットの有用性を検証するため、畜産食肉中キノロン系抗菌剤に関して HPLC/FL による残留分析法を構築して検証を行った。

#### 2.1 試 薬

キノロン系抗菌剤である、ノルフロキサシンは和光純薬製を用い、エノキサシン、オフロキサシン及びロメフロキサシンは Sigma 製を使用した。シプロフロキサシンは MP Biomedicals 製を使用した。ダノフロキサシン及びエンロフ

<sup>1</sup> 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

<sup>2</sup> 株式会社フロンティア研究所: 061-3241 北海道石狩市新港西 1-777-12

<sup>3</sup> 埼玉県衛生研究所: 338-0824 埼玉県さいたま市桜区上大久保 639-1

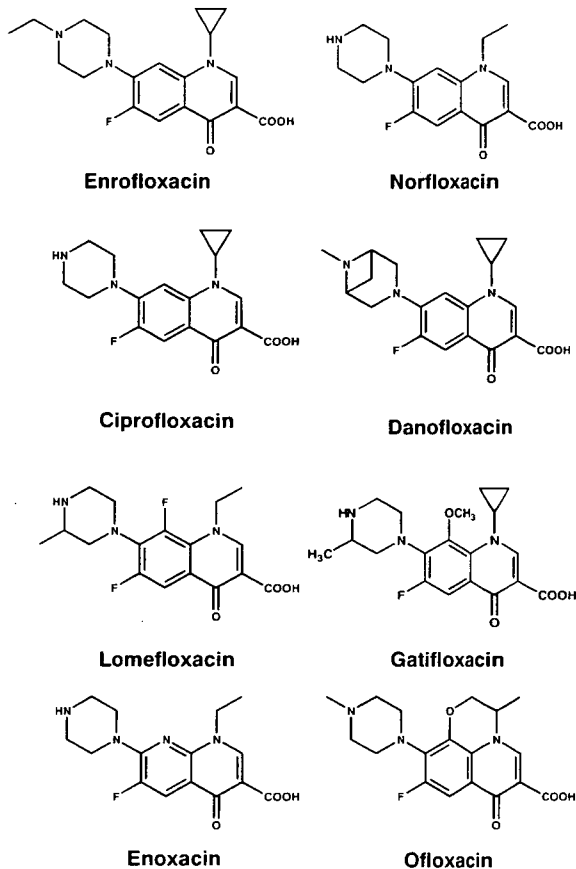


Fig. 1 Structures of fluoroquinolone

ロキサシンは関東化学製を用いた。ガチフロキサシンはLKT Laboratories 製を使用した。アセトニトリルは和光純薬製 (HPLC 用) を用いた。超純水は日本ミリポア製 Milli-Q の超純水装置で調製したものをを用いた。

## 2.2 ELISA キット

フロンティア研究所製 New Quinolone Kit を用い、キノロン系抗菌剤の測定を行った。定量値は反応率が 100% であるエンロフロキサシン量に換算することで求めた。

## 2.3 HPLC 条件

機器分析によるキノロン系抗菌剤の測定には、HPLC/FL を使用した。分析用ポンプとして島津製作所製 LC-10AS 及び蛍光検出器には RF-10A<sub>NL</sub> を用いた。移動相は 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH = 3.0) : アセトニトリル = 83 : 17 (v : v) を調製し、イオンペアー試薬として Nonafluoropentanoic acid (NFPA) を 0.2% になるように加え、流量 0.2 ml/min で送液した。分析カラムには Waters 製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長は励起波長 270 nm, 蛍光波長 447 nm に設定して測定を行った。

Table 1 Cross-reactivity of fluoroquinolones by ELISA

	Cross-reactivity, %
Enoxacin	20
Norfloxacin	100
Ofloxacin	1.4
Ciprofloxacin	100
Danofloxacin	80
Lomefloxacin	30
Enrofloxacin	100
Gatifloxacin	0.9

## 2.4 前処理方法

細切した食肉約 5 g を精密に量り取り、アセトニトリル 15 ml を加えた後に、ホモジナイズした。その後、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) により得られた上清を回収し、残渣にアセトニトリル 15 ml を加え、遠心分離操作 (3000 rpm, 10 min) を再度行った、アセトニトリル層を 40°C, 減圧下で乾固させ、得られた残渣に 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) を加えて再溶解させた。その後、Oasis MCX<sup>®</sup> (30 mg) を用いた固相抽出法を適用した。固相抽出条件は、洗浄溶媒にメタノール (1 ml) と 50 mM 炭酸アンモニウム (2 ml) を使用し、5% アンモニア含有メタノール (3 ml) で固相カートリッジからキノロン系抗菌剤の溶出を行った。溶出液を 40°C, 減圧下で乾固し、得られた残渣に 50 mM PBS (phosphate buffered saline) を加えて再溶解させ、HPLC/FL 及び ELISA の測定に供した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 ELISA における交差反応性の評価

キノロン系抗菌剤の構造式を Fig. 1 に示す。New Quinolone Kit における交差反応性について、キノロン系抗菌剤標準品を用いて求めたところ、エンロフロキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンは抗体と 100% 反応する結果を得ることができた。また、ダノフロキサシンは 80%、ロメフロキサシンは 30% 前後で交差反応性を示した (Table 1)。また、ELISA キットによるエンロフロキサシンの定量限界値は 8 ng/g であった。

### 3.2 蛍光波長の最適化

測定対象キノロン系抗菌剤の移動相中における励起及び蛍光スペクトルを測定したところ、Fig. 2 に示すように発蛍光性が確認された。そこで、本分析法においては動物用医薬品として主に使用されているエンロフロキサシンに着目し、キノロン系抗菌剤が検出できる波長 270 nm 及び 447 nm に設定し、以後の実験を行った。キノロン系抗菌剤の蛍光強度は移動相の pH 及び塩濃度に依存して変化することから、それぞれの最適条件を検討した。その結果、

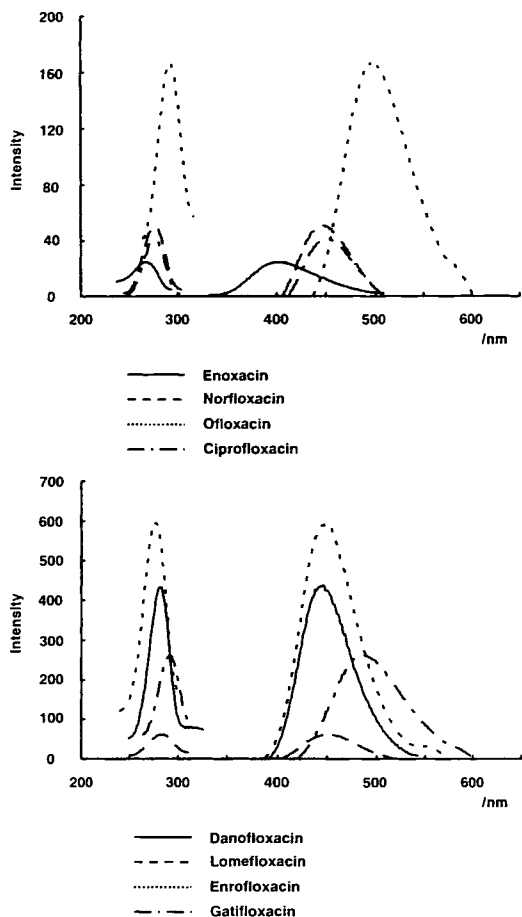


Fig. 2 Optimal excitation and emission wavelengths for detection of fluoroquinolones

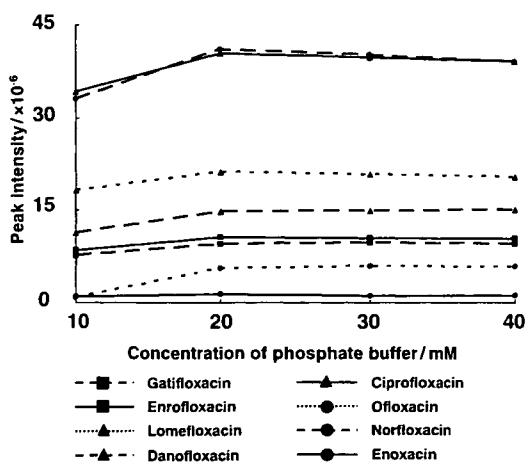


Fig. 3 Optimal concentration of formate buffer in the mobile phase

キノロン系抗菌剤は pH 7 以上で蛍光を示さず, 中性から酸性条件化で一定の蛍光強度が得られたことから, キノロン系抗菌剤の測定には液性を pH 3.0 に調整した. 同様に, 最大の強度を示した, 塩濃度 20 mM を最適条件とした (Fig. 3).

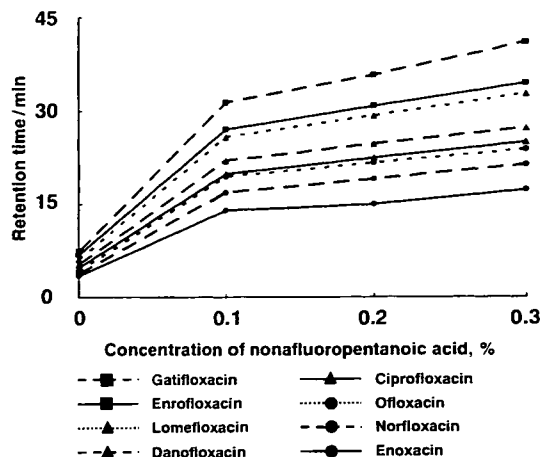


Fig. 4 Optimal concentration of nonafluoropentanoic acid and

Table 2 Recoveries of fluoroquinolones in meat sample using MCX cartridge

Analytical compound	Amount spiked/ ng g <sup>-1</sup>	Recovery, % (mean ± S.D., n = 6)
Enoxacin	1000	105.7 ± 5.7
Norfloxacin	50	105.6 ± 4.3
Ofloxacin	500	106.3 ± 4.0
Ciprofloxacin	50	107.7 ± 6.1
Danofloxacin	50	109.2 ± 4.0
Lomefloxacin	125	105.0 ± 4.9
Enrofloxacin	50	107.8 ± 4.2
Gatifloxacin	500	104.2 ± 4.5

### 3.3 キノロン系抗菌剤の分離検討

キノロン系抗菌剤標準品を用い, HPLC/FL における分離条件をリン酸塩緩衝液で検討したところ, すべてのキノロン系抗菌剤の相互分離が不十分であった. そこで, NFPA をイオンペアー試薬として添加し, 分離条件を検討したところ, NFPA が 0.2% で良好な相互分離が達成された (Fig. 4). これらの結果より, イオンペアー試薬を用いたことで, 構造が類似している 8 種類のキノロン系抗菌剤を一斉分析することが可能となった.

### 3.4 試料の前処理方法

試料に含まれる他の共存物質の影響を取り除くため, Oasis HLB<sup>®</sup> 及び Oasis MCX<sup>®</sup> を使用した前処理方法を検討した. Oasis HLB<sup>®</sup> を使用した場合, 平均回収率が 50% と低く, HPLC/FL においても共存物質の影響を完全に除去することができなかった. しかし, 陽イオン交換系カートリッジである Oasis MCX<sup>®</sup> を用いた場合, 標準品添加における平均回収率は 106% と良好な結果を得ることができた (Table 2).