

Table 3 Validation of the HPLC/FL method

	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
Limit of detection	20	2	20	2	1	5	2	20
Limit of quantification	200	10	100	10	5	25	10	100
Resolution	1.38	1.39	1.08	1.49	1.90	1.71	4.97	
Correlation coefficient	0.998 (200~20000)	0.999 (10~1000)	0.999 (100~10000)	0.999 (10~1000)	0.999 (5~500)	0.999 (25~2500)	0.999 (10~1000)	0.999 (100~10000)

(ng g⁻¹)

Table 4 Intraday and interday precision of quantifying fluoroquinolones using HPLC/FL

Intraday			
Analytical compound	Actual concentration/ ng g ⁻¹	Detected concentration/ng g ⁻¹ (mean ± S.D., n = 5)	Precision (R.S.D.), %
Enoxacin	200	205 ± 13.1	6.6
	20000	20043 ± 1364	6.8
Norfloxacin	10	11.0 ± 1.1	10.9
	1000	1053 ± 116	11.6
Ofloxacin	100	88.9 ± 8.2	8.2
	10000	10364 ± 714	7.1
Ciprofloxacin	10	10.4 ± 1.1	10.7
	1000	1033 ± 99.4	9.9
Danofloxacin	10	9.7 ± 1.2	12.3
	1000	1026 ± 19.5	2.0
Lomefloxacin	25	23.7 ± 1.7	6.8
	2500	2558 ± 196	7.9
Enrofloxacin	10	9.8 ± 1.2	12.0
	100	1007 ± 69.0	6.9
Gatifloxacin	100	82.6 ± 8.1	8.1
	10000	10574 ± 833	8.3
Interday			
Analytical compound	Actual concentration/ ng g ⁻¹	Detected concentration/ng g ⁻¹ (mean ± S.D., n = 5)	Precision (R.S.D.), %
Enoxacin	200	209 ± 1.6	0.8
	20000	18931 ± 919	4.6
Norfloxacin	10	11.2 ± 1.1	10.9
	1000	984 ± 61	6.1
Ofloxacin	100	97.4 ± 11.9	11.9
	10000	9636 ± 599	6.0
Ciprofloxacin	10	9.1 ± 1.3	13.0
	1000	972 ± 60.9	6.1
Danofloxacin	10	9.5 ± 1.2	12.2
	1000	1019 ± 13.5	1.3
Lomefloxacin	25	25.4 ± 3.2	12.9
	2500	2367 ± 209	8.4
Enrofloxacin	10	12.3 ± 1.2	12.2
	100	938 ± 68.3	6.8
Gatifloxacin	100	85.2 ± 6.2	6.2
	10000	9980 ± 953	9.5

3・5 HPLC/FL の分析法バリデーション

本分析法の、食肉中における検出限界、定量限界及び分離度を求めた⁸⁾。検出限界は1~20 ng/g、定量限界は5~200 ng/gであり、各キノロン系抗菌剤の相互分離が達成

された (Table 3)。本分析法の日内及び日間変動を求めたところ、定量限界付近にてバラツキと回収率の低下が見られたものの、13% 以下と良好な結果が得られた (Table 4)。これらの結果より、本分析法は食肉中キノロン系抗菌

Table 5 Concentration of fluoroquinolones in meat samples by ELISA and HPLC/FL

	ELISA	HPLC/FL							
	Enrofloxacin equivalent	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
Round	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Liver-1	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Liver-2	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sirloin	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Sasami	(<8 ng g ⁻¹)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Norfloxacin (50 ng g ⁻¹)	44.2	N.D.	53.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Ciprofloxacin (50 ng g ⁻¹)	50.2	N.D.	N.D.	N.D.	59.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Danofloxacin (50 ng g ⁻¹)	43.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	49.5	N.D.	N.D.	N.D.
Breast meat + Enrofloxacin (50 ng g ⁻¹)	53.6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	58.4	N.D.

(ng g⁻¹), N.D.: Not detection

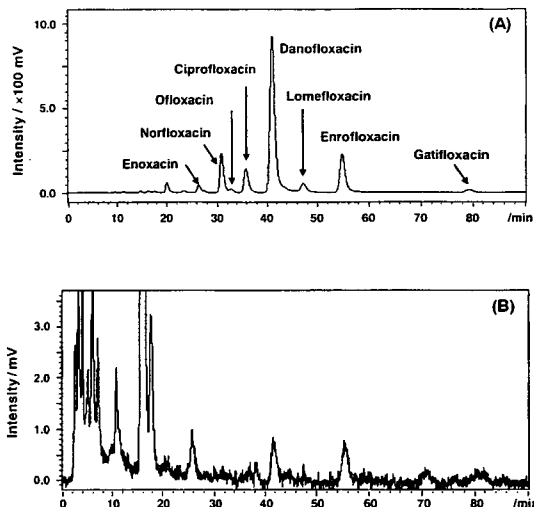


Fig. 5 Chromatograms of (A) fluoroquinolone standard and (B) meat sample

The mobile phase was 20 mM phosphate buffer (pH = 3.0)/acetonitrile (83 : 17, v/v) containing 0.2% nonafluoropentanoic acid. Flow rate was 0.2 ml/min.

剤の分析に適用可能であると考えられる。

3・6 実試料の測定結果

キノロン系抗菌剤標準品及び実試料のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。キノロン系抗菌剤は他の共存物質の影響を受けることなく良好に分離された。本分析法を用いて、食肉中キノロン系抗菌剤を測定した。その結果、HPLC/FL において、すべての食肉からは検出限界未満であった。また、同一の試料を ELISA で測定したところ、同様に定量限界値 (8 ng/g) 未満となった。更に、食肉に既知の濃度のキノロン系抗菌剤を添加し、HPLC/FL 及び ELISA で測

定したところ、両者の間に有意な相関性が得られた (Table 5)。

4 結 言

ELISA 法は簡便な方法で、多検体を測定できる利点を有している。しかしながら、交差反応性などの問題から、定性能力に欠け、はん用性に乏しかった。そこで、キノロン系抗菌剤を対象薬剤として、HPLC/FL と ELISA 法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料へと適用したところ、両者の値に相関性が認められた。

HPLC/FL における前処理等煩雑な操作及び約 120 分の分析所要時間を考慮すると、ELISA キットは 1 次スクリーニング法としての有用性を示唆することができ、今後、更なる研究を進めていく必要があると思われる。

文 献

- 1) J. Roybal, C. C. Walker, A. P. Pfenning, S. B. Turnipseed, J. M. Storey, S. A. Gonzales, J. A. Hurlbut: *J. AOAC Int.*, **85**, 1293 (2002).
- 2) J. H. Shim, J. Y. Shen, M. R. Kim, C. J. Lee, I. S. Kim: *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7528 (2003).
- 3) I. Steffenak, V. Hormazabal, M. Yndestad: *Food Addit. Contam.*, **8**, 777 (1991).
- 4) G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, A. R. Rodriguez: *J. Chromatogr. A*, **952**, 121 (2002).
- 5) C. K. Holtzappple, E. J. Pishko, L. H. Stanker: *Anal. Chem.*, **72**, 4148 (2000).
- 6) V. F. Samanidou, C. E. Demetriou, I. N. Papadoyannis: *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 623 (2003).
- 7) J. E. Renew, C. H. Huang: *J. Chromatogr. A*, **1042**, 113 (2004).
- 8) E. Verdon, P. Couedor, B. Roudaut, P. Sanders: *J. AOAC Int.*, **88**, 1179 (2005).

Analysis of Fluoroquinolones in Meat Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and HPLC

Yusuke IWASAKI¹, Takeshi ITO¹, Wataru KITAMURA¹, Mihoko KATO², Tsukasa KODAIRA²,
Masakazu HORIE³, Rie ITO¹, Koichi SAITO¹ and Hiroyuki NAKAZAWA¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

² Frontier science cooperation, Ltd., 1-777-12, Shinko-nishi, Ishikari-shi, Hokkaido 061-3241

³ Saitama Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

(Received 21 July 2006, Accepted 20 October 2006)

Fluoroquinolones (FQs) are an important group of synthetic antibacterial, which are widely used to treat human and veterinary diseases. In recent years, FQs residues were detected in several samples. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is useful to determine many samples simultaneously. However, there is a problem of not having qualification because of cross-reactivity. In the present study, we developed an analytical method using HPLC/FL for a comparative study with ELISA. Moreover, an HPLC/FL system was applied to the determination of FQs residues in meat samples. The LOD and LOQ of HPLC/FL were 2 ng/g and 10 ng/g for enrofloxacin, respectively. The extraction recovery of enrofloxacin spiked concentration of 50 ng/g was 107.8%. The HPLC method and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of fluoroquinolones in meat samples were compared. FQs were detectable in meat samples added FQs standard by HPLC/FL and ELISA. Moreover, there was a correlation between HPLC/FL and ELISA. In conclusion, ELISA may be useful to rapid monitoring of residues for FQs instead of HPLC/FL, which requires analytical times of 120 min in meat samples.

Keywords : fluoroquinolones; enzyme-linked immunosorbent assay; HPLC/FL.

報 文

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

竹上 晴美^{®1}, 堀江 正一¹, 中澤 裕之²

高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) を用いた簡易かつ感度の高い乳中のマクロライド系抗生物質, 具体的にはエリスロマイシン, オレアンドマイシン, キタサマイシン, ジョサマイシン, ミロサマイシン, ネオスピラマイシン, スピラマイシン, チルミコシン及びタイロシンの同時分析法を検討した. 試料の前処理には抽出にアセトニトリルを採用し, ヘキサンによる液液抽出によりクリーンアップを行った. 高速液体クロマトグラフ測定条件は, TSK-gel Super ODS カラム (10 mm × 2 mm i.d.), 移動相には 0.2% 酢酸-アセトニトリル系グラジェント溶出法を用いた. 質量分析測定条件のイオン化モードは positive モードが適しており, 測定イオンは $(M + 2H)^{2+}$ 又は MH^+ を用いた. 本法における添加回収率は 0.1 µg/g の添加で 63.8~95.9%, 検出限界は 0.01 µg/g であった.

1 緒 言

14 及び 16 員環のラク톤環を基本骨格とするマクロライド系抗生物質 (MLs) は, グラム陽性菌, マイコプラズマ, 連鎖球菌などに対して有効であることから, 畜産動物や養殖魚の感染症治療薬としてはん用されている¹⁾.

しかし, 一方ではこれら医薬品の畜水産物への移行及び残留が食品衛生上懸念されており²⁾, 畜水産食品の安全性を確保するために残留規制が行われている.

従来, マクロライド系を含む抗生物質の残留分析には一般に微生物学的試験法がはん用されてきた. 微生物学的試験法は抗菌性物質の残留の有無をチェックするスクリーニング法としては優れた手法であるが, 選択性に欠ける面があり, 検出された抗菌性物質を特定することは困難である. これに代わる方法として, 紫外吸収 (UV) 検出器を用いた高速液体クロマトグラフ (HPLC) が抗生物質の微量分析にはん用されている³⁾⁴⁾. 先に著者らはクリーンアップに陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた MLs の分析法を報告した⁵⁾⁶⁾. 陽イオン交換樹脂充填カートリッジを用いた試料前処理方法は, 夾雑成分の除去に優れた手法であるが, 操作がやや煩雑な面がある.

最近, 選択性に優れた高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS) が残留 MLs の分析に用いられており⁷⁾¹¹⁾, 著者らも LC/MS による食肉中の MLs の同時分析法を報告した¹²⁾. しかし, 先に報告した分析法¹²⁾を乳試料に適用

した場合, 前処理中にエリスロマイシン (EM), スピラマイシン (SPM) の分解が見られ, 特に EM はそのほとんどが分解された. EM は MLs の中で最も抗菌活性が強いことから, 最もはん用されている薬剤であり, 特に乳房炎治療薬としていちばん多く使用されている. また, SPM も使用量の多い MLs である¹³⁾. したがって, 乳中の EM, SPM を感度よく検出・定量することは, 乳の安全性を確保する上で有用と考えられる. そこで, 今回, LC/MS を用いた簡易かつ感度の高い乳中の MLs の同時分析法を検討した.

2 実験方法

2.1 試料及び試薬

試料は埼玉県内で生産された生乳及び牛乳を用いた.

標準品: ネオスピラマイシン (NSPM) 及びスピラマイシン (SPM) は林純薬工業製, チルミコシン (TLM) は日本イーライリリー製, オレアンドマイシン (OM) は, 日本ファイザー製, ミロサマイシン (MRM) 及びキタサマイシン (KT) は朝日化学工業製, エリスロマイシン (EM) は大日本製薬 (現大日本住友製薬) 製, タイロシン (TS) は武田薬品工業製, ジョサマイシン (JM) は山之内製薬 (現アステラス製薬) 製を使用した.

標準溶液: 標準品 10 mg を精ひょうし, メタノール 10 ml に溶解して標準原液を調製し, 適宜 40% アセトニトリルで希釈して標準溶液とした. なお, 標準原液は 5℃ 以下で保存した.

¹ 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

² 星薬科大学: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Operating conditions of LC-MS for analysis of macrolide antibiotics

MS Conditions		HPLC Conditions	
Ionization	ESI, Positive	Column	TSK-gel Super ODS (100 × 2 mm)
Fragmentor	Time program	Eluent	Gradient
Nebulizer	N ₂ (40 psi)	Flow rate	0.2 ml/min
Drying gas	N ₂ (10 l/min, 350°C)	Oven temp.	40°C
V-cap	4500 V	Injection size	5 µl
SIM ion	m/z (M + H) ⁺ , (M + 2H) ²⁺		

Time/min	Fragmentor voltage/V
5.0	60
11.5	100
15.5	150

Time/min	A, %	B, %
0	85	15
20	50	50
25	50	50

A = 0.2% Acetic acid, B = Acetonitrile (containing 0.2% Acetic acid)

Table 2 Typical ions detected for macrolide antibiotics using LC/ESI-MS

Compound	Mw	Base peak ions	Main other ions
Neospiramycin (NSPM)	698.8	350.2 (M + 2H) ²⁺	721.5, 699.5, 540.3
Spiramycin (SPM)	843.1	422.3 (M + 2H) ²⁺	843.5, 699.5, 540.3
Tilmicosin (TLM)	869.2	435.3 (M + 2H) ²⁺	869.5, 695.5
Oleandomycin (OM)	688.9	688.4 (M + H) ⁺	670.4, 544.3
Mirosamicin (MRM)	727.9	728.4 (M + H) ⁺	554.3
Erythromycin (EM)	733.9	734.5 (M + H) ⁺	716.4, 576.3
Tylosin (TS)	916.1	916.5 (M + H) ⁺	742.3, 582.3
Kitasamycin (KT)	771.9	772.5 (M + H) ⁺	702.5, 558.3
Josamycin (JM)	828.0	828.5 (M + H) ⁺	860.4, 786.4

2.2 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析計: Agilent 製 1100 シリーズ LC/MSD を使用し, Table 1 に示した条件で測定した。

2.3 検量線の作成

0.025, 0.1, 0.25, 0.5 及び 1.0 µg/ml の混合標準添加溶液を調製し, その 5 µl を LC/MS 装置に注入した。検出には選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) を採用し, Table 2 に示すモニターイオンより得られたクロマトグラムからピーク面積を求め, マトリックス検量線 (標準添加法) により検量線を作成した。

2.4 試験溶液の調製

試料 5 g を採取し, アセトニトリル 30 ml 及び無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて 1 分間ホモジナイズした後, 3500 rpm で 10 分間遠心分離した。次に上澄みを綿栓汙過後, 減圧乾固し, 40% アセトニトリル 2 ml と *n*-ヘキサン 1 ml を加えて混合した後, 再度 3500 rpm で 10 分間遠心

分離した。*n*-ヘキサン相を除去した 40% アセトニトリル相を試験溶液とし, この 5 µl を LC/MS 装置に供した。

2.5 微生物学的試験法

日常検査において公定法としては用いられている「畜産食品中の残留抗生物質簡易検査法 (改訂)」¹⁴⁾ に準拠し, 試験菌には *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis* ATCC 6633), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus* ATCC 9341) 及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides* ATCC 11778) を用いた。試験菌液及び検査用平板培地の調製及び抗菌活性の測定も前記検査法に準拠し, 簡便なペーパーディスク法を用いた。

3 結果及び考察

3.1 前処理法の検討

著者らは前報¹²⁾において除タンパク・抽出溶液として 0.2% メタリン酸とメタノール (6:4) 混液を用いた。しかし, 食肉と異なり試料が乳の場合では, 濃縮前の抽出溶液の pH が 3.8, 約 30 ml に濃縮時では 2.9 となった。

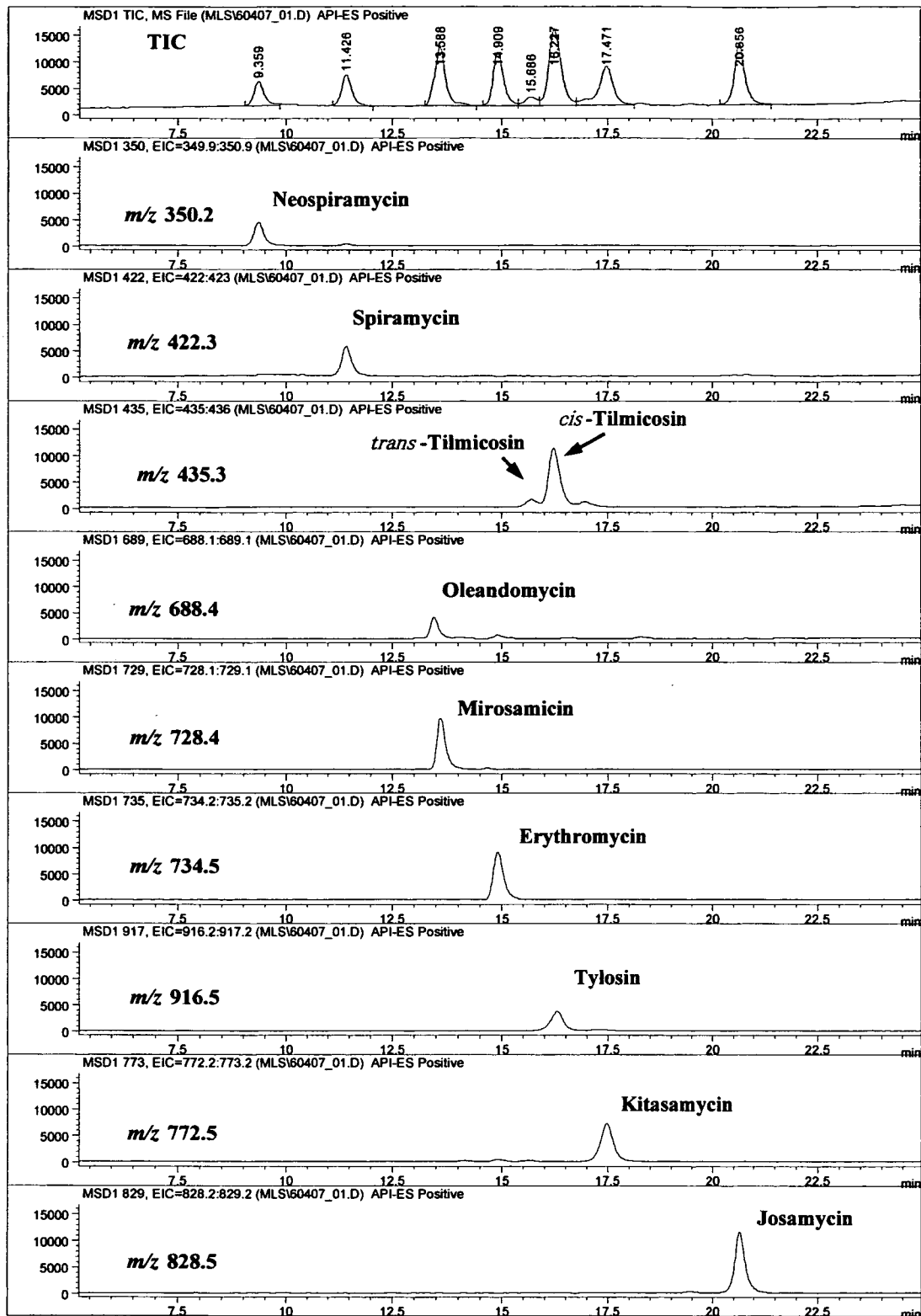


Fig. 1 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of standard mixture ($0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$)

MLsは一般的に酸に対して不安定とされており、特にEMはpHが4以下であると分解が早いと報告されている¹⁵⁾。乳試料に $0.1 \mu\text{g/g}$ の濃度で9種のMLsを添加した場合、EMは約95%とそのほとんどが、SPMにあっても約50%

に分解が見られた。そこで、除タンパク剤としてメタリン酸を用いない前処理法の検討を試みた。

残留薬物の分析において、メタノール、アセトニトリル及びエタノール等は、除タンパク効果が優れていることが

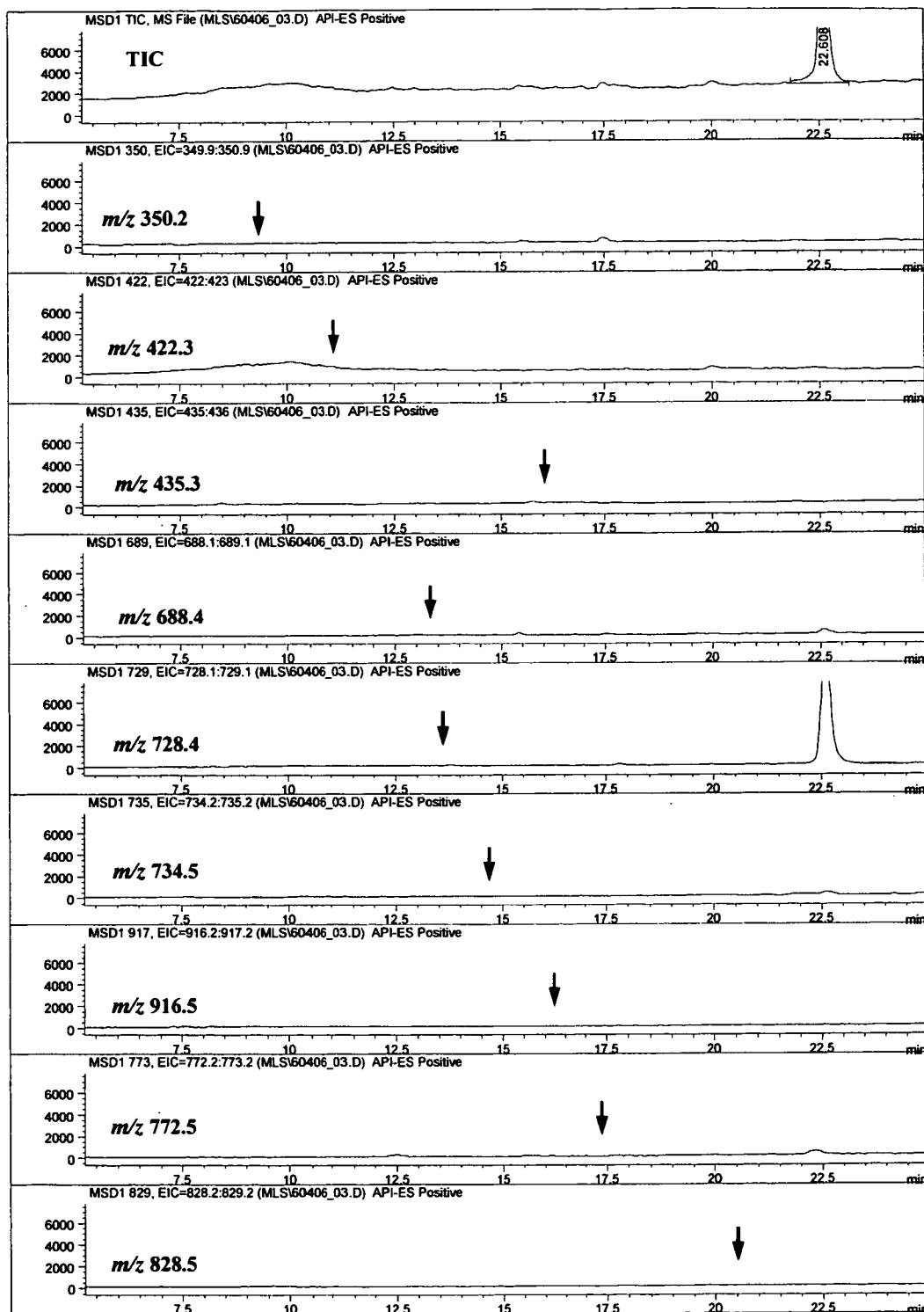


Fig. 2 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract

ら、血液など生体試料の除タンパク剤としては用いられている。しかし、メタノール、アセトニトリル等の有機溶媒で抽出した場合、乳は脂肪も多く含んでいることから、脂質の除去も必要となる。アセトニトリルはヘキサンとの組み合わせにより脱脂操作が容易であり、脂質の除去には用いられている。このような理由からアセトニトリルによる

抽出法を検討した。乳をアセトニトリル 30 ml で抽出した溶液の pH は 6.5 であり、酸性下で最も不安定であると思われる EM の抽出にも本法は適用可能であった。アセトニトリル抽出液を減圧乾固し、40% アセトニトリル 2 ml / ヘキサン 1 ml に溶解させて十分混合することにより、脂溶性の高い脂質や色素成分はヘキサン相に分配される。本

Table 3 Recoveries of macrolide antibiotics from milk

Sample	Added/ µg g ⁻¹	Recovery (mean ± RSD, n = 5), %								
		NSPM	SPM	TLM	OM	MRM	EM	TS	KT	JM
Raw milk	0.02	70.9 ± 5.9	90.6 ± 5.2	97.9 ± 8.2	76.9 ± 5.4	74.5 ± 5.0	76.3 ± 2.1	84.7 ± 6.7	78.4 ± 10.8	99.9 ± 4.1
	0.1	63.9 ± 6.9	94.5 ± 1.6	71.9 ± 3.2	93.4 ± 3.6	95.9 ± 3.4	94.1 ± 7.8	75.0 ± 4.3	72.5 ± 4.9	81.9 ± 2.1
Pasteurised milk	0.02	79.6 ± 7.7	94.8 ± 7.0	105.2 ± 7.8	99.4 ± 10.4	89.7 ± 5.1	86.5 ± 2.7	73.4 ± 5.7	89.1 ± 4.8	87.8 ± 4.2
	0.1	63.8 ± 9.3	95.2 ± 7.7	69.1 ± 7.5	89.8 ± 7.0	92.4 ± 3.6	86.5 ± 2.5	74.4 ± 3.5	74.1 ± 9.2	80.0 ± 2.8

法により得られた試験溶液及び混合標準溶液の代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。Fig. 2 に示すように、夾雑物の影響を受けることなく、9 種の MLs を分析することが可能であった。

3.2 添加回収実験

検量線は 0.025 から 1.0 µg/ml (絶対量として 0.05 ~ 2 ng) の範囲で良好な直線性 ($r^2 = 0.995$) を示した。生乳及び牛乳 (130°C で 2 秒殺菌) に 9 種の MLs を 0.02 及び 0.1 µg/g の濃度に添加し、回収率を求めた。その結果を Table 3 に示す。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分離分析法であるが、イオン化がマトリックスの影響を受けやすいことが短所とされている。そこで、マトリックスの影響の少ない試験溶液の調製が望まれている。

生乳に 0.1 µg/g 添加したとき、OM, MRM, EM, TS, KT 及び JM のイオン化は、マトリックスの影響が少なく、絶対検量線による回収率は平均 75% 以上、相対標準偏差 (RSD) も 10% 以内と良好な値であった。しかし、NSPM, SPM 及び TLM はイオン化促進が見られ、見掛け上の回収率は 150% 前後であった。前述したように、LC/MS の分析では、しばしば試料成分の影響で目的成分のイオン化抑制やイオン化促進が見られる場合がある。そこで、マトリックスの影響を補正する目的で、安定同位体標識内標準物質やマトリックス検量線 (標準添加法) が用いられている。本法においても、比較的早く溶出する NSPM, SPM 及び TLM のイオン化がマトリックスの影響を受けることから、マトリックス検量線を用いて回収率を算出することにした。本法による各薬物の回収率は 0.02 及び 0.1 µg/g 添加時共に、おおむね 70% 以上、RSD も 15% 以内であり、残留分析法として満足できる値が得られた¹⁶⁾。なお、本法による検出限界は、いずれの薬物も 0.01 µg/g ($S/N = 3$) であった。ポジティブリスト制における乳の MLs 基準値は一律基準も含めると 0.01 ~ 2 µg/g¹⁷⁾ であり、残留分析法として満足すべき感度が得られた。生乳に MLs を 0.1 µg/g 及び 0.01 µg/g 添加して得られた代表的な LC/MS-SIM クロマトグラムを Fig. 3 及び Fig. 4 に示す。

本法を用いて、埼玉県内で生産された生乳 3 検体、県内流通品である牛乳 7 検体 (65°C 低温殺菌 3 検体, 130°C

高温殺菌 4 検体)、計 10 検体について残留調査を実施した結果、すべての試料から 9 種の MLs は検出されなかった。なお、10 検体すべてについて、本法の検出限界とした 0.01 µg/g 濃度で 9 種の MLs を添加し、9 種の MLs が良好に回収されているか並行検査を実施した。いずれの検体においても 9 種の MLs は、おおむね 60% 以上が回収され、抗生物質ごとの回収率はほぼ同程度であり、異なる乳試料間での相違はほとんど見られなかった。

3.3 微生物学的試験法による MLs の検出限界

従来、MLs の残留分析には一般に微生物学的試験法がはん用されてきた。そこで、試験菌 *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341 及び *B. mycoides* ATCC 11778 に対する抗菌活性を調べた。MLs の検出限界を Table 4 に示す。MLs は *M. luteus* ATCC 9341 に最も強い抗菌活性を示した。LC/MS は高感度かつ選択性に優れた分析手法であるが、LC/MS により MLs が検出された場合、抗生物質が本来持っている抗菌活性を用いた微生物学的試験法とクロスチェックすることにより、より信頼性の高い結果を得ることが可能である。MLs の抗菌活性は比較的強いことから、微生物学的試験法を用いたクロスチェックは有用と考える。

3.4 LC/MS 法と微生物学的試験法との相関

9 種の MLs を個別に添加した試料について、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性を調べた。再現性を考慮し、微生物学的試験法では各試料につき 3 回測定を行い、その平均値を用いた。いずれの抗生物質についても、LC/MS により定量した値と微生物学的試験法により定量した値との相関性は、 $r^2 > 0.9$ と良好であった。代表例としてジオサマイシン及びエリスロマイシンの結果を Fig. 5 に示す。

現在、動物用医薬品の残留分析に HPLC-UV 法がはん用されているが、短波長領域にしか UV 吸収のない MLs の分析には微生物学的試験法が適用されている。しかし、微生物学的試験法は前述のように選択性に欠ける面があり、検出された抗菌性物質を特定することは困難である。LC/MS は比較的簡易な前処理で同時に多くの薬物を定量

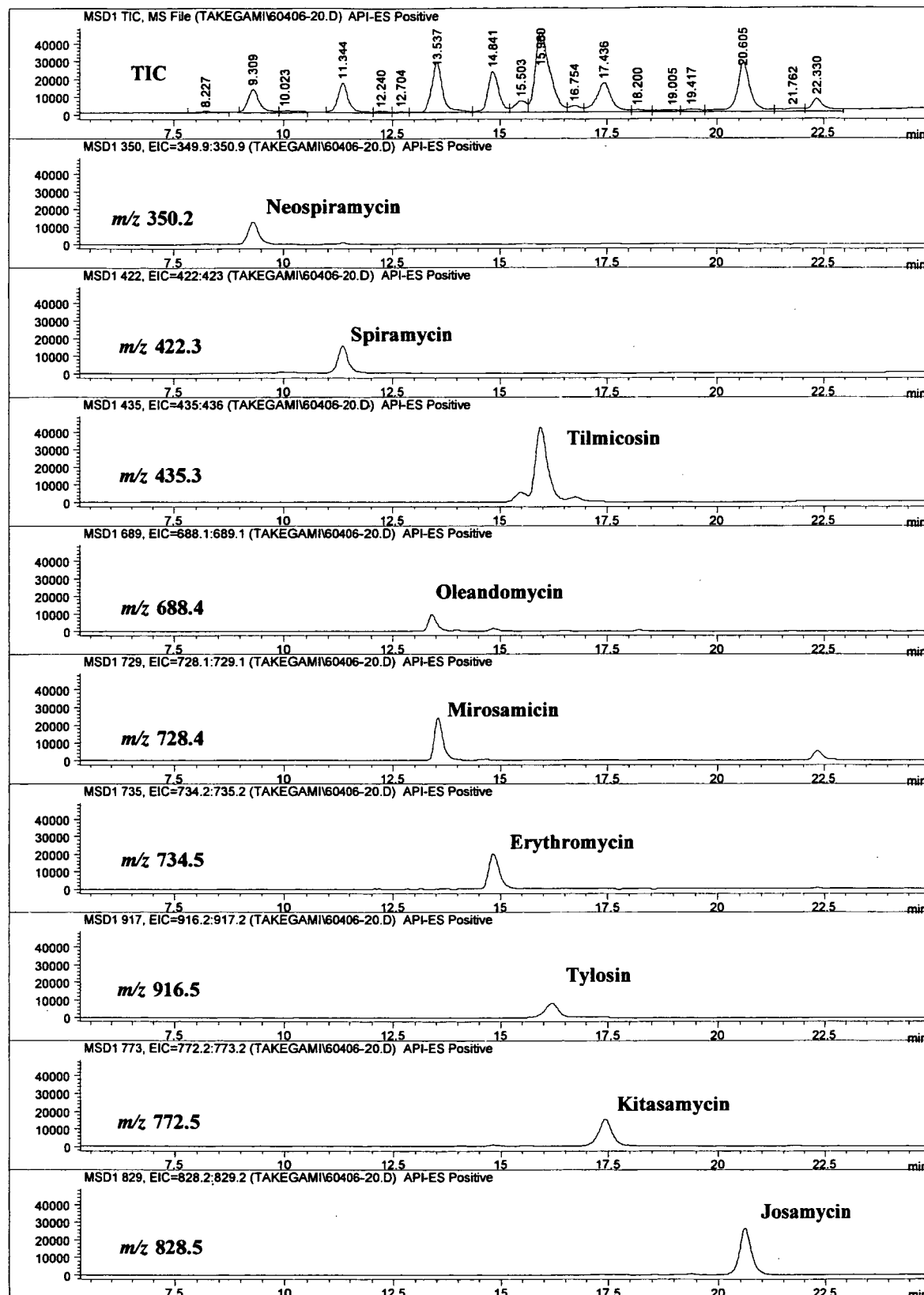


Fig. 3 Typical LC/ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ of each drug

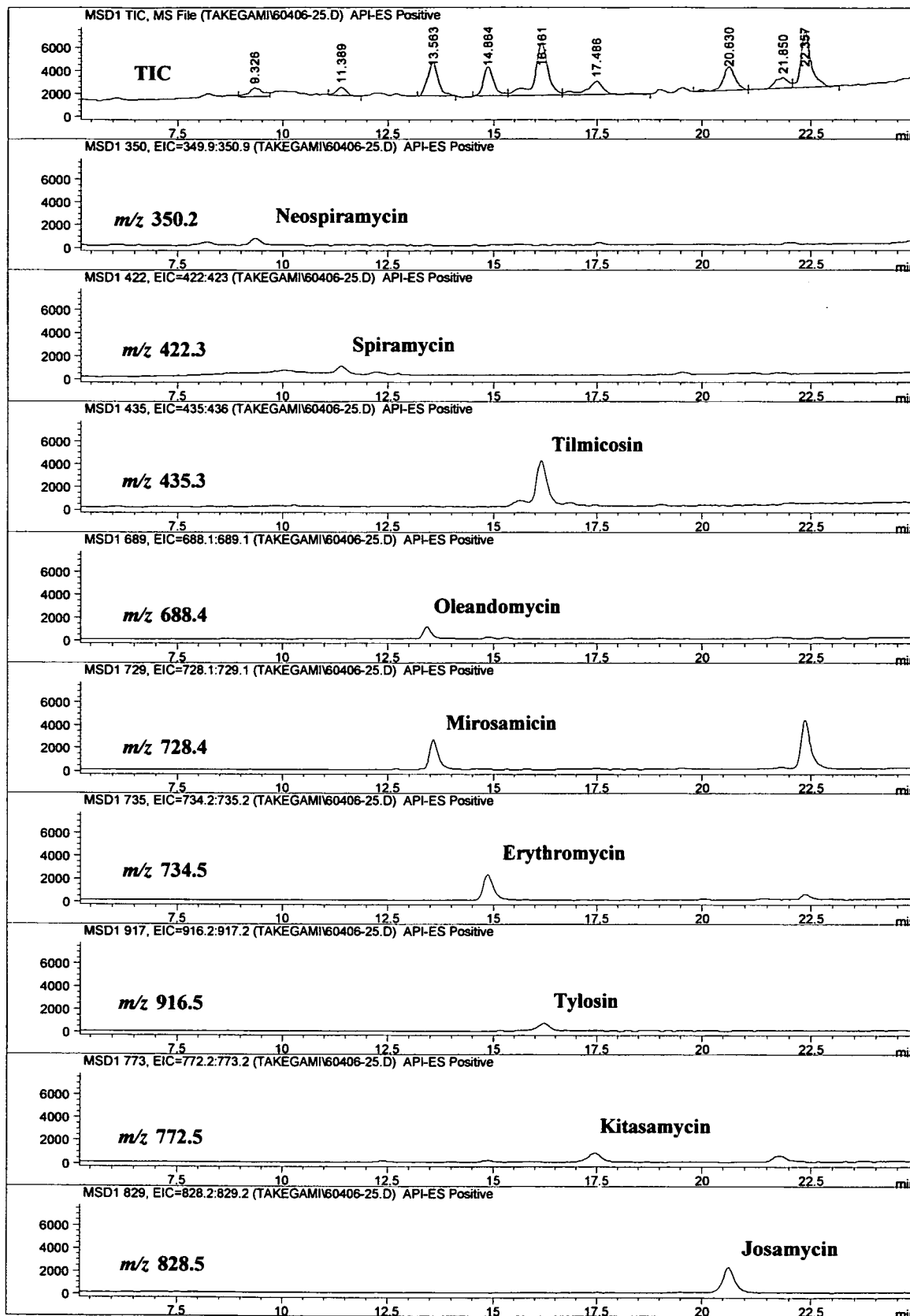


Fig. 4 Typical LC-ESI-MS-SIM chromatograms of milk extract fortified at $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ of each drug

Table 4 Antibacterial activities of macrolide antibiotics

Compound	Detection limit/ppm		
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>B. mycoides</i> ATCC 11778
NSPM	2.5	1.0	10.0
SPM	1.0	0.5	10.0
TLM	0.5	0.5	2.5
OM	0.5	0.25	5.0
MRM	2.5	0.5	2.5
EM	0.1	0.1	0.5
TS	0.5	0.5	2.5
KT	0.5	0.25	2.5
JM	1.0	0.25	2.5

Each drug was dissolved in 40% acetonitrile.

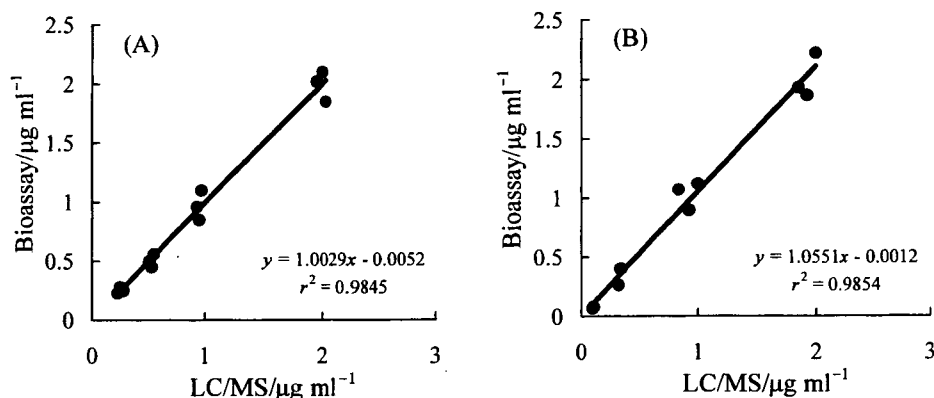


Fig. 5 Correlation between LC/MS and bioassay methods for (A) josamycin ($y = 1.00x - 0.005$; $r^2 = 0.985$; $n = 12$) and (B) erythromycin ($y = 1.05x - 0.001$; $r^2 = 0.985$; $n = 12$) in milk

することが可能であることから、今後ますます有効な分析手法になるものと考えられる。

文 献

- 1) 二ノ宮幾代治: “動物の抗生物質”, p. 307 (1987), (養賢堂).
- 2) 堀江正一, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **36**, 329 (1995).
- 3) Kanfer, I, Skinner, M, F. Walker, R. B.: *J. Chromatogr. A*, **812**, 255 (1998).
- 4) J. M. Gaugain, B. Anger, M. Laurentie: *J. AOAC Int.*, **82**, 1046 (1999).
- 5) M. Horie, K. Saito, T. Yoshida, R. Ishii, H. Nakazawa: *J. Chromatogr. A*, **812**, 295 (1998).
- 6) 堀江正一, 城戸靖雅, 村山三徳, 豊田正武, 中澤裕之: 食品衛生学雑誌, **40**, 401 (1999).
- 7) B. Delepine, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders: *J. AOAC Int.*, **79**, 397 (1996).
- 8) W. M. A. Niessen: *J. Chromatogr. A*, **812**, 53 (1998).
- 9) 岡 尚男, 伊藤裕子, 猪飼誉友: 食品衛生学雑誌, **42**, 159 (2001).
- 10) R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L. Achene, A. Cacilia: *J. Chromatogr. A*, **926**, 97 (2001).
- 11) M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Dlahaut: *J. Chromatogr. B*, **753**, 189 (2001).
- 12) M. Horie, H. Takegami, K. Toya, H. Nakazawa: *Analytica Chimica Acta*, **492**, 187 (2003).
- 13) 農林水産省動物医薬品検査所年報, No. 30 (1993).
- 14) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: 衛乳第 107 号 (1994).
- 15) D. A. Volmer, J. P. M. Hui: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 123 (1998).
- 16) Joint FAO/WHO Food Standards Programme CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION: “CODEX ALIMENTARIUS VOLUME THREE Residues of veterinary drugs in foods”, p. 67 (1996), (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS WORLD HEALTH ORGANIZATION, Rome).
- 17) 厚生労働省告示: 第 497 号, 498 号 (2005).

Determination of Macrolide Antibiotics in Milk by High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

Harumi TAKEGAMI¹, Masakazu HORIE¹ and Hiroyuki NAKAZAWA²

¹ Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-0824

² Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 25 April 2006, Accepted 30 June 2006)

A simple and reliable method using liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC/ESI-MS) has been developed as an analytical method of macrolide antibiotics, such as erythromycin, oleandomycin, kitasamycin, josamycin, mirosamicin, neospiramycin, spiramycin, tilmicosin and tylosin in milk. The drugs were extracted with acetonitrile, and the extracts were cleaned up by partition with hexane. The extracts were analyzed using LC/MS. The LC separation was performed on a TSK-gel Super ODS column (100 mm × 2 mm i.d.) with a gradient system of 0.2% acetic acid-acetonitrile as the mobile phase. MS acquisitions parameters were established in the positive ESI mode, and the related molecular ions were $(M + 2H)^{2+}$ or $(M + H)^+$. The recoveries of the drugs from milk fortified at a level 0.1 µg/g were 63.8~95.9% with high precision. The limits of detection of the drugs in milk were 0.01 µg/g.

Keywords : macrolide antibiotics ; erythromycin ; oleandomycin ; kitasamycin ; josamycin ; mirosamicin ; neospiramycin ; spiramycin ; tilmicosin ; tylosin ; milk ; LC/MS.

報 文

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

(平成17年10月5日受理)

石井里枝*^{1,†} 堀江正一*¹ 村山三徳*² 米谷民雄*²

Analysis of Chloramphenicol in Honey and Royal Jelly by LC/MS/MS

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

A sensitive and selective method using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was developed for the determination of chloramphenicol (CAP) in honey and royal jelly. Mass spectral acquisition was performed in the negative mode by applying multiple reaction monitoring. In LC separation, Mightyl RP-18GP and 10 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile were used as the column and mobile phase, respectively. CAP in honey samples was diluted with water, while CAP in royal jelly was extracted with 1% metaphosphoric acid-methanol (4:6). The solutions were cleaned up with an Oasis HLB cartridge. The quantification limits of CAP in honey and royal jelly were 0.3 ng/g and 1.5 ng/g, respectively. The recoveries of CAP from both honey and royal jelly at the quantification limits were over 92%. Twenty honey products and seven royal jelly products were analyzed by the developed method. CAP was detected in one honey product at 0.6 ng/g and in six royal jelly products at the level of 1.5-17.8 ng/g. These results show that the developed method has satisfactory sensitivity selectivity and is useful for the determination of CAP residues in honey and royal jelly.

(Received October 5, 2005)

Key words: クロラムフェニコール chloramphenicol; 液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS; 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

動物用医薬品として用いられている抗生物質および合成抗菌剤は、畜水産動物の疾病予防、治療に大きく寄与している。これらのうちクロラムフェニコール(CAP)はグラム陽性菌、陰性菌、リケッチア、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、1950年代から種々の感染症に威力を発揮してきた。しかし、CAPは骨髄細胞増殖抑制、用量非依存的な再生不良性貧血^{1),2)}などの重篤な副作用や遺伝毒性を示すこと³⁾が報告されている。国際ガン研究機関(IARC)は1990年に「ヒトに対して発ガン性のある可能性が高い物質」(グループ2A)と評価し

ている。FAO/WHOでは健康危害の観点から、食料へのCAPの残留を禁止しており、我が国をはじめ米国、EUなどにおいて家畜および養殖水産動物への使用が禁止されている。しかし、CAPの広範囲な抗菌スペクトル、低コスト性あるいは入手が容易であることなどから、不法に使用されることが懸念されている。事実、これまでにもEUなどにおいて中国産のハチミツおよびローヤルゼリーなどから高頻度にCAPが検出されており、我が国においても輸入食品などのモニタリング検査においてハチミツから検出された事例がある。2006年に施行される残留農薬等のポジティブリスト制度の暫定基準(案)においても、CAPは遺伝毒性および発ガン物質である可能性が高いことからADIを設定できない動物用医薬品の1つとして、「不検出」基準が設定されている。このような閾値を設定できない薬物の残留分析においては、特に高感度で精度の高い分析法の構築が必要である。

† 連絡先

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

Table 1. MS Conditions for CAP and d_5 -CAP

Ionization	ESI, Negative			
Desolvation gas flow	N ₂ , 600 L/hr			
Cone gas flow	N ₂ , 50 L/hr			
Source temp.	110°C			
Desolvation temp.	350°C			
Monitor ion	Parent	Daughter	Cone (V)	Collision energy (V)
	326	157	30	17* ¹
	323	257	25	12* ²
	323	152	25	20* ²
	321	257	25	12* ²
	321	152	25	20* ³

*¹: d_5 -CAP*²: Use for confirmation*³: Use for quantitation

これまでに CAP の分析法としては GC-ECD^(4),5) や GC/MS⁽⁶⁾, GC/MS/MS⁽⁷⁾, HPLC-UV^(8),9) を用いた方法が報告されている。GC を用いる方法は煩雑な誘導体化操作が必要であり、HPLC は簡便であるが、検出限界が十~数百 ng/g レベルと感度面で問題がある。さらに、HPLC-UV 法および GC-ECD 法では定性情報として得られるのは保持時間のみであり、検出された場合にはさらに確認する作業が必要となってくる。このことから近年では定量と同時に定性情報も得られる LC/MS あるいは LC/MS/MS を用いた高感度分析が報告されている。ハチミツを分析対象とした高感度分析法もいくつか報告^{(10)~(14)}されているが、ローヤルゼリーを対象とした分析法はいまだ報告されていない。

そこで、今回、LC/MS/MS を用いたハチミツおよびローヤルゼリー中の高感度分析法を検討したので報告する。また、中国、EU などにおいては CAP の残留分析のスクリーニング法として ELISA 法が採用されている。そこで本法による測定値と ELISA キットによる測定値とを比較し、相関性について検討したので併せて報告する。

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（クリーム状、錠剤、カプセル剤、顆粒剤）を用いた。

標準品：クロラムフェニコール (CAP) は和光純薬工業 (株) 製を、内標準物質 ²[H₅]-クロラムフェニコール (d_5 -CAP; ring- d_4 , benzyl- d_1) は Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 社製を使用した。クロラムフェニコール ELISA キットには r-Biopharm 社製 RIDA スクリーン「クロラムフェニコールキット」を使用した。

標準溶液：CAP 標準品 10 mg を精ひょうし、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とし、適宜 HPLC 移動相で希釈して標準溶液とした。 d_5 -CAP 標準品は 5 mg を精ひょうし、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とし、さらにメタノールで希釈し、

100 ng/mL 溶液を作製した。これを内標準溶液として各濃度の CAP 標準溶液に対し 5 ng/mL となるように添加した。

除タンパク・抽出溶液：1%メタリン酸-メタノール (4:6) を 10~15°C に冷却して用いた (用時調製)。

Oasis HLB カートリッジ：Waters 社製、60 mg カートリッジはあらかじめメタノールおよび精製水各 5 mL で、200 mg カートリッジはメタノールおよび精製水各 10 mL 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用を、その他の試薬は特級品を使用した。

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 micro

3. 測定条件

分析カラム：関東化学(株)社製 Mightysil RP-18 GP Aqua (2.1 mm i.d.×150 mm, 粒子径 5 μm), カラム温度：40°C, 移動相：10 mmol/L 酢酸アンモニウム-アセトニトリル (73:27), 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 d_5 -CAP 溶液 (100 ng/mL) 50 μL 添加後精製水 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、20%メタノール 5 mL で洗浄後、60%メタノール 6 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を移動相 1 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 d_5 -CAP 溶液 50 μL を加え、1%メタリン酸-メタノール (4:6) 混液 60 mL 加えて 2 分間ホモジナイズした後、ろ過補助剤ハイフろスーパーセルを厚さ 2 mm に敷いた吸引ろ過器を用いてろ過した。ろ紙上の残さに 1%メタリン酸-メタノール (4:6) 混液 15 mL を加えて、混和した後、同様にろ過した。ろ液を合わせ、約 2 mL まで減圧濃縮し、Oasis HLB (200 mg) カートリッジ

に負荷した。精製水 4 mL, 5%メタノール 4 mL で洗浄後, 60%メタノール 10 mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後, 残留物を移動相 1 mL に溶解し, 試験溶液とした。

5. 定 量

各試験溶液 10 μ L を LC/MS/MS に注入し, 得られた CAP と d_5 -CAP のピーク面積比を用いた内標準法で CAP を定量した。

6. ELISA 法での定量

ELISA キットに添付されている「ハチミツの調製法, 測定手順」に従い調製, 測定した。すなわち, ハチミツおよびローヤルゼリーは蒸留水に溶解し, 酢酸エチルを添加した。振とう, 遠心分離後, 酢酸エチル層を分取し, 窒素気流下で乾燥し, 希釈緩衝液に溶解し, 試料溶液とした。

結果および考察

1. LC/MS/MS 条件の検討

1.1 LC 条件の検討

MS 部におけるイオン化の促進および安定化のため, 移動相に添加する揮発性の酸について検討した。ギ酸, 酢酸, ギ酸アンモニウム, 酢酸アンモニウムについて検討したところ, 酢酸アンモニウムが最も効率的に脱プロトン化分子を生成した。また, その濃度について 1, 2.5, 5, 10, 20, 30 mmol/L の濃度を検討したところ, 5 あるいは 10 mmol/L 濃度で CAP のピーク面積値が最大となったことから, 濃度は 10 mmol/L とした。有機溶媒はメタノールおよびアセトニトリルについて検討した。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。

分離カラムは数種の ODS 系カラム (Cadenza CD-C18, Symmetry C18, Cap cell-Pak C18-AQ, TSK-gel Super ODS, Mightysil RP-18 GP) について感度, ピーク形状を比較検討したところ, Mightysil RP-18 GP が最も良好であった。

1.2 MS/MS 条件の検討

CAP 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, MRM 法で測定した。イオン化モードは感度良く測定できたネガティブモードで行った。Fig. 1 にコーン電圧 25 V で測定した CAP および d_5 -CAP のフルスキャン MS スペクトルを示した。CAP は分子内に 2 個の塩素原子を含むことから特徴的な MS スペクトルが得られる。CAP では脱プロトン化イオンである m/z 321 (^{35}Cl , ^{35}Cl), 323 (^{35}Cl , ^{37}Cl), 325 (^{37}Cl , ^{37}Cl) が, d_5 -CAP では m/z 326 (^{35}Cl , ^{35}Cl), 328 (^{35}Cl , ^{37}Cl), 330 (^{37}Cl , ^{37}Cl) が得られた。次に CAP の (^{35}Cl , ^{35}Cl) $[\text{M}-\text{H}]^-$ の m/z 321, d_5 -CAP の (^{35}Cl , ^{35}Cl) $[\text{M}-\text{H}]^-$ の m/z 326 をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンを測定した (Fig. 2)。

衝突遊離分離により CAP は m/z 152 と 257, d_5 -CAP

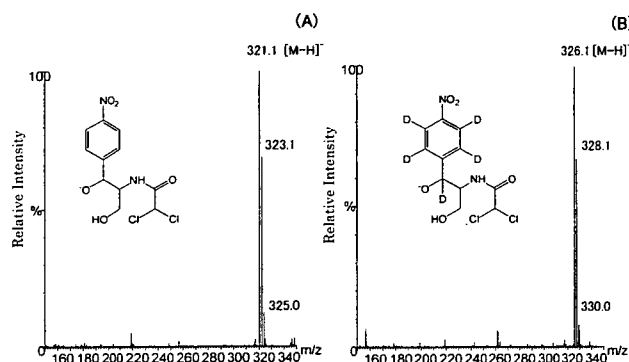


Fig. 1. Full scan mass spectra of chloramphenicol (A) and d_5 -chloramphenicol (B)

The chemical structures are also shown.

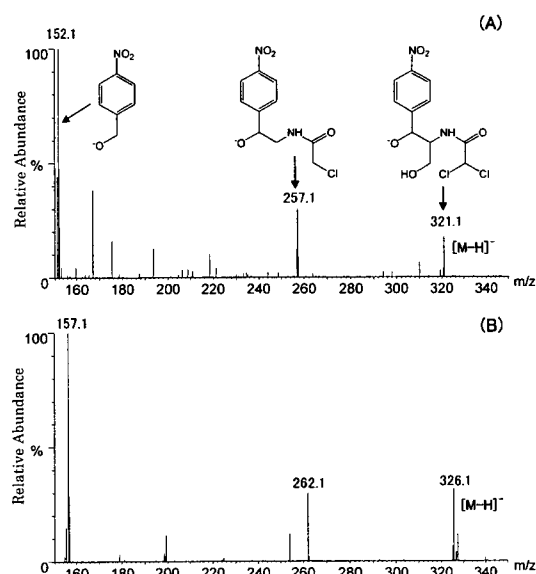


Fig. 2. Full scan product ion spectra of m/z 321 $[\text{M}-\text{H}]^-$ for CAP (A) and m/z 326 $[\text{M}-\text{H}]^-$ for d_5 -CAP (B)

The structures of the fragments are also depicted.

は m/z 157 と 262 の特徴的なフラグメントイオンを生成した。そこで CAP のモニターイオンは最も強度の高い m/z 321 \rightarrow 152 を定量用イオンとして用い, 確認イオンとして m/z 321 \rightarrow 257, m/z 323 \rightarrow 152, m/z 323 \rightarrow 257 を採用した。 d_5 -CAP の定量モニターイオンとしては m/z 326 \rightarrow 157 を採用した。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

m/z 321 \rightarrow 152 (CAP) と m/z 326 \rightarrow 157 (d_5 -CAP) のピーク面積比を用いて, 内標準法で検量線を作成した。0.5~20 ng/mL (0.005~0.2 ng) の範囲で良好な直線性 ($r=0.999$) が得られた。また, 各濃度 (2, 5, 10 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 5% 以内であった。な

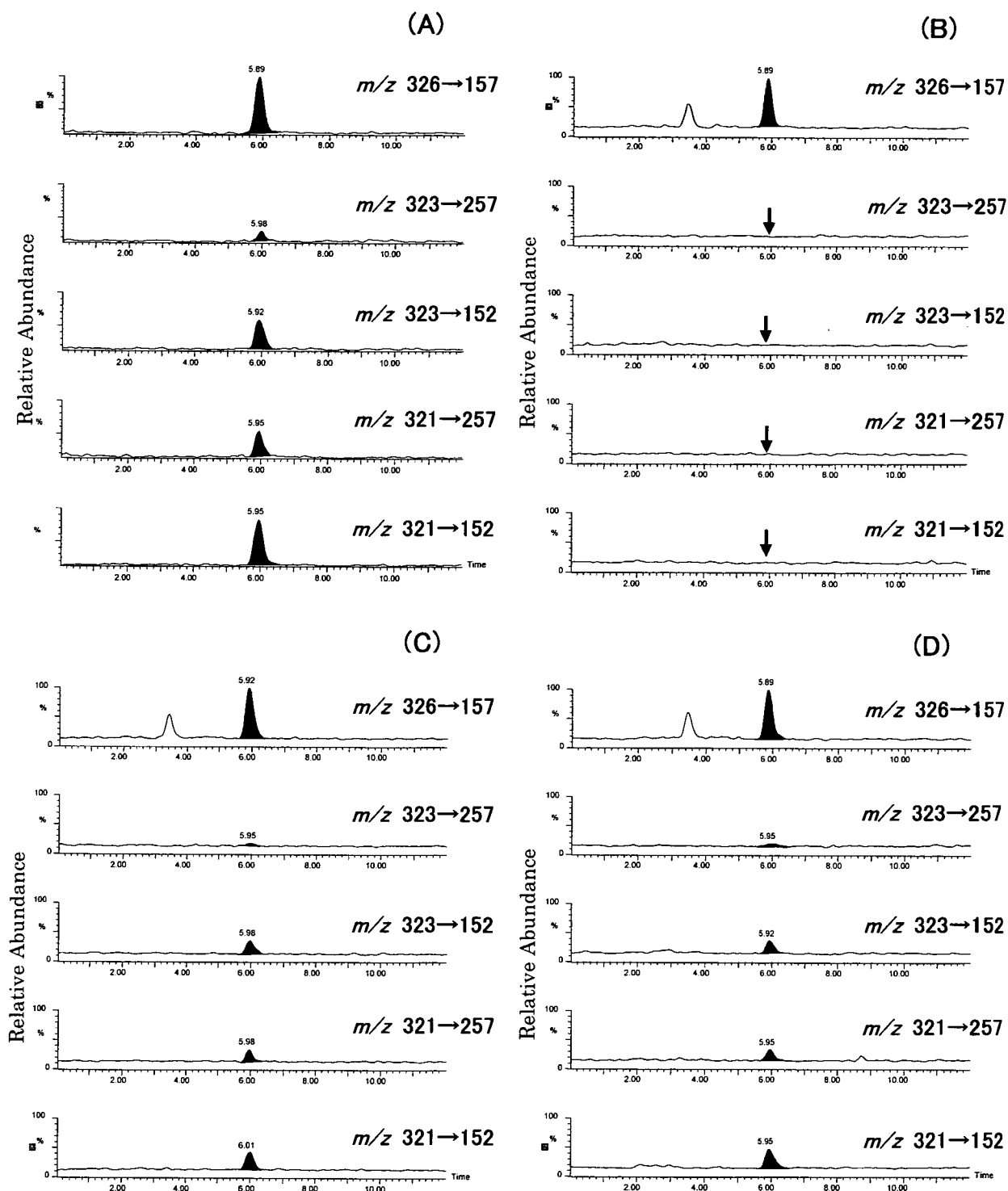


Fig. 3. MRM chromatograms of standard CAP (5 ng/mL) (A), blank honey sample from buckwheat fortified with the internal standard (5 ng/mL) (B), blank honey sample from acacia fortified with CAP (0.3 ng/g) (C), and honey from many sorts of flowers in which 0.6 ng/g of CAP was detected (D)

Arrow indicates the retention time of CAP.

お、本法を用いた標準品の検出限界は 0.5 ng/mL ($S/N=3$)、定量限界は 1.5 ng/mL ($S/N=10$) 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 CAP の分析前処理法としては酢酸エチル^{11,12}、ジクロロメタン-アセトン混液¹⁰、アセトニトリ

ル¹³)などで抽出後、液-液分配¹¹)やカートリッジカラム^{10,13})などで精製する方法が報告されている。また、ハチミツを精製水等で希釈し、直接、カートリッジカラムで精製する方法^{14,15})も報告されている。本法では各種カートリッジカラムのうち通知法¹⁵)で使用している Oasis HLB カートリッジカラムを用いた方法を検討した。ハチ

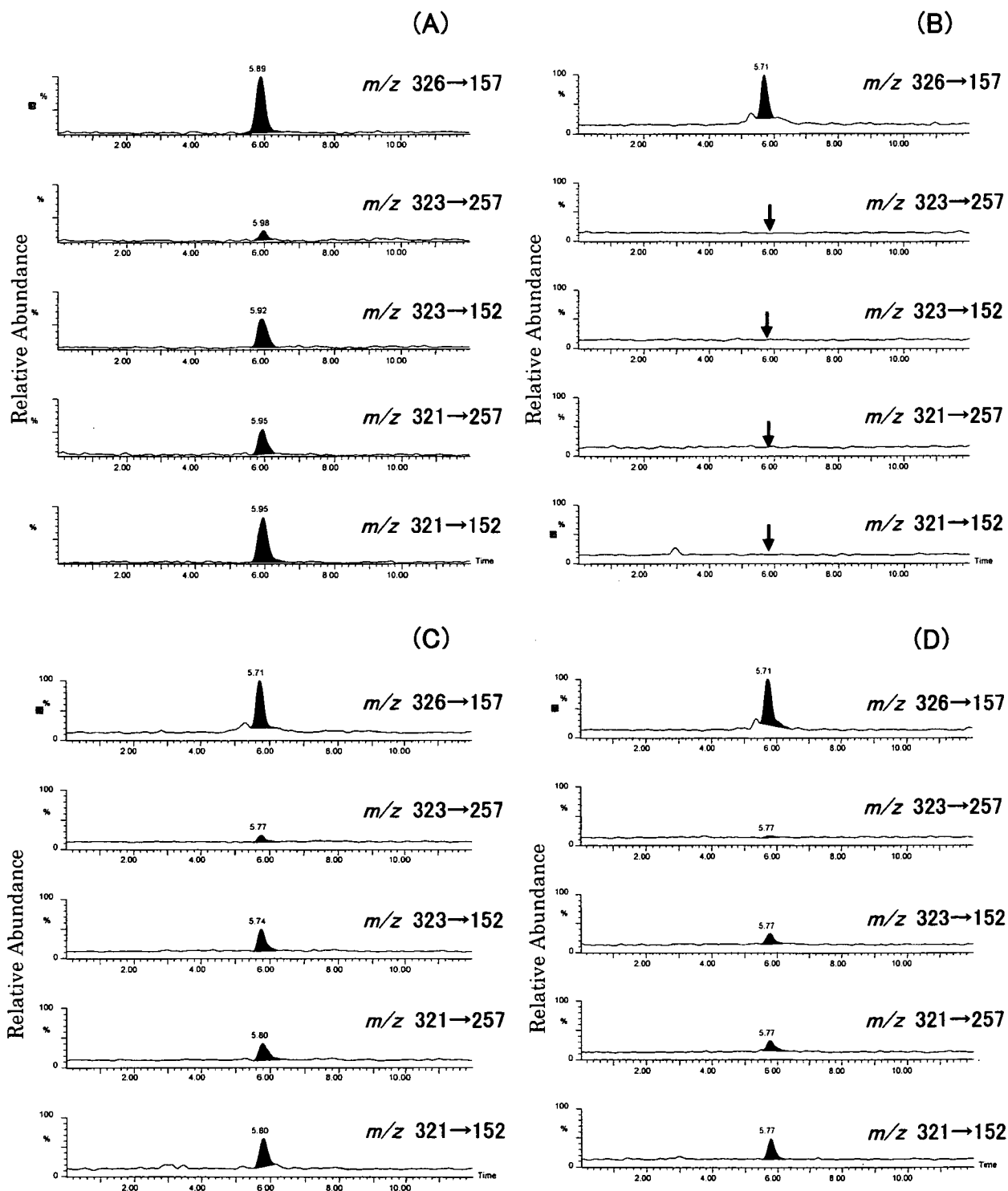


Fig. 4. MRM chromatograms of standard CAP (5 ng/mL) (A), blank royal jelly sample fortified with the internal standard (5 ng/mL) (B), blank royal jelly sample fortified with CAP (4 ng/g) (C), and royal jelly in which 2.6 ng/g of CAP was detected (D)

Arrow indicates the retention time of CAP.

ミツ（アカシア蜜）を精製水に溶解した後、 d_5 -CAP 標準溶液を添加した。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。CAPの溶出画分を検討したところ、20%メタノール液ではCAPはカートリッジから溶出せず、60%メタノール溶液ではほぼ100%が溶出した。必要な溶媒量は洗浄溶媒として20%メタ

ノールが5 mL、溶出溶媒として60%メタノールが6 mLであった。通知法¹⁵⁾ではさらに液-液分配やシリカゲルカラムによる精製を行っているが、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. 3 (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）では検出器にシングルMSを用いた場合、妨害ピークの出現やマトリックスによるイオン化抑制が観測され、分析が困難な場合があった。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、レンゲ蜜などの多種類のハチミツに適用した場合も、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

これまでローヤルゼリー中のCAP分析法に関する報告はなく、分析法の開発が求められている。ローヤルゼリーはクリーム状、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%のクリーム状の製品の分析が最も困難であると考え、検討した。クリーム状の製品に d_5 -CAP標準溶液を添加して、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などの問題が生じた。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、畜水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¹⁶⁾で、除タンパク・抽出操作を行った。1%メタリン酸-メタノール混液の組成比を2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2としたときの d_5 -CAP (5 ng/mL添加)の回収率は、78.5~85.7%であり、最も回収率の高かった4:6の組成を採用した。また、メタリン酸の濃度を0, 0.3, 0.5, 0.7, 1, 2%と変化させて調製したそれぞれのロイヤルゼリー試験溶液に d_5 -CAP標準液を5 ng/mL濃度に添加し、イオン化抑制および促進作用を分析することにより、最も除タンパク効果の高いメタリン酸濃度を検討した。0%溶液ではイオン化抑制作用が32%, 0.3%では12%, 0.7%では11%, 1%では5%, 2%では6%観測された。そこでメタリン酸濃度は最もイオン化抑制作用の低かった1%とした。さらに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CAP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)を使用し、CAPの溶出画分を検討した。メタノール濃度を5, 10, 15, 20%と変化させ検討したところ、10%メタノール溶液でCAPが一部溶出したことから、洗浄溶媒は5%メタノールとした。溶媒量は6 mL以上であるとCAPの一部が溶出することから4 mLとした。溶出は60%メタノール10 mLでCAPはほぼ100%溶出した。本法により分析したローヤルゼリー（クリーム状）のクロマトグラムをFig. 4(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。また、検討したクリーム状のローヤルゼリー以外にも錠剤、カプセル剤、顆粒剤のローヤルゼリーに本法を適用したところ85%以上の d_5 -CAPの回収率が得られた。

4. 添加回収実験

あらかじめCAPが含有していないことを確認したハチミツ（アカシヤ蜜）およびローヤルゼリー（クリーム状）

Table 2. Recoveries of CAP from Honey and Royal Jelly

Sample	Fortification level (ng/g)	Recovery (%) ^{*1}
Honey	1.5	97.6±4.6
	0.3	92.5±8.8
Royal jelly	4.0	100.1±8.5
	1.5	95.1±7.0

*1: Values are the mean±S.D. (n=5)

にCAPを添加し、回収率を求めた。Table 2に示すように、定量下限値（ハチミツ: 0.3 ng/g, ローヤルゼリー: 1.5 ng/g, S/N=10）での回収率は92.5, 95.1%で標準偏差(S.D.)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。CAPを添加したハチミツおよびローヤルゼリーのMSクロマトグラムをFig. 3(C)およびFig. 4(C)に示した。

5. 実態調査

埼玉県内で市販されていたハチミツ20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7検体（クリーム状、錠剤、カプセル剤、顆粒剤）について、本法を用いて残留実態調査を行った。ハチミツは百花蜜1検体から0.6 ng/gのCAPが検出された。ローヤルゼリーは分析した7検体中6検体から1.5, 2.2, 2.6, 4.5, 11.0, 17.8 ng/g濃度のCAPが検出された。Fig. 3(D), Fig. 4(D)にCAPを検出した百花蜜、ローヤルゼリー（クリーム状）のクロマトグラムを示した。

6. 確認の判断基準

CAPは分子内に塩素原子2個を含有する。塩素原子の同位体存在比 $^{35}\text{Cl}:^{37}\text{Cl}$ は約75.4:24.6であることから、理論上 $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl } m/z 323 \rightarrow 257 / ^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl } m/z 321 \rightarrow 257$ の強度比は0.33, $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl } m/z 323 \rightarrow 152 / ^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl } m/z 321 \rightarrow 152$ は0.65となる。5 ng/mL濃度の標準溶液を5回繰り返し測定したときの $m/z 323 \rightarrow 257 / m/z 321 \rightarrow 257$ および $m/z 323 \rightarrow 152 / m/z 321 \rightarrow 152$ は $0.35 \pm 25\%$, $0.64 \pm 22\%$ と理論値に近似していた。そこで試料からCAPが検出された場合、試料と標準溶液から得られる同位体比の比較が確認方法として有効であるか検討した。CAPが検出された試料のフラグメントイオンの強度比は $323 \rightarrow 257 / 321 \rightarrow 257$ 比が0.25~0.40および $323 \rightarrow 152 / 321 \rightarrow 152$ 比が0.54~0.79と標準品の比率とよく一致した。このことから、本法は定量法としてのみならず、同時に定性法としても有用であることが明らかとなった。

7. ELISA法との比較

EUなどではCAPのスクリーニング検査法としてELISA法が用いられている。そこで本法で得られた測定値と市販されているELISAキットでの測定値とを比較検討した。ハチミツについてはELISAキットに添付されている取扱説明書に従い、試験溶液を作製した。ローヤルゼリーはELISAキットで分析対象となっていないため、ハ

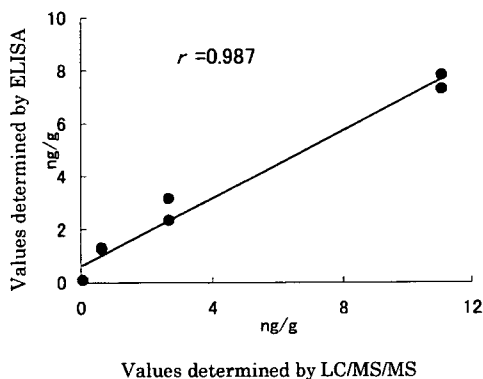


Fig. 5. Relationship between data determined by the present LC/MS/MS method and data obtained with commercial ELISA kit

チミツにおける試験溶液の調製法が準用できるか検討した。クリーム状のローヤルゼリーでは抽出溶媒として用いた酢酸エチルが操作中にゲル化してしまう現象が起り、適用できなかった。一方、錠剤、顆粒状のローヤルゼリーは一部に適用できるものがあり、添加回収率も良好な結果であった。そこで、CAPが検出された百花蜜(0.6 ng/g)、検出下限値以下の痕跡程度に残留が認められたミカン蜜およびローヤルゼリー(錠剤タイプ、顆粒タイプ)の2検体の合計4検体について市販ELISAキットを用いてduplicateで定量し、それぞれの値と本法での測定値とを比較した(Fig. 5)。

ELISAを用いて測定したCAP量と本法を用いて測定したCAP量とは相関係数0.987と良好な相関性を示した。このことから本法の定量確認法としての有用性、ELISA法のスクリーニング法としての有用性が確認できた。

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CAPの高感度分析法を検討した。

1. 前処理法はハチミツについては精製水に希釈後、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で精製した。

2. LC/MS/MS条件はESI、ネガティブモードを採用した。移動相には10 mmol/L酢酸アンモニウム-アセトニトリル(73:27)を、カラムにはMightysil RP-18 GRを用いた。

3. 本法による定量下限値(S/N=10)はハチミツ0.3 ng/g、ローヤルゼリー1.5 ng/gであった。定量下限値での添加回収率はハチミツ、ローヤルゼリーともに92%以上であった。

4. 本法を適用してハチミツ20検体、ローヤルゼリー7検体について実態調査を行ったところ、ハチミツ1検体から0.6 ng/g、ローヤルゼリー6検体から1.5~17.8 ng/gのCAPが検出された。

5. 今回構築したCAPの分析法は、現行のハチミツ中のクロラムフェニコール分析法(通知法、定量下限値100

ng/g)と比較し高感度であり、ハチミツおよびローヤルゼリー中に残留するCAPの分析法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) Woodward, K. N., Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs. *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**, 168-172 (1991).
- 2) Yunis, A. A., Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Am. J. Med.*, **87**, 44N-48N (1989).
- 3) Martelli, A., Mattioli, F., Pastorino, G., Robbiano, L., Allavena, A., Brambilla, G., Genotoxicity testing of chloramphenicol in rodent and human cells. *Mutat. Res.*, **260**, 65-72 (1991).
- 4) Cerkvjenik, V., Analysis and monitoring of chloramphenicol residues in food of animal origin in Slovenia from 1991 to 2000. *Food Addit. Contam.*, **19**, 357-367 (2002).
- 5) Kubala-Drincic, H., Bazulic, D., Sapunar-Postruznik, J., Grubelic, M., Stuhne, G., Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 871-875 (2003).
- 6) Nagata, T., Oka, H., Detection of residual chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol on yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1,280-1,284 (1996).
- 7) Impens S., Reybroeck W., Vercammen J., Courtheyn D., Ooghe S., de-Wasch K., Smedts W., de-Brabander H. F., Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS-MS and LC-MS-MS. *Anal. Chim. Acta*, **483**, 153-163 (2003).
- 8) Di-Pietra, A. M., Piazza, V., Andrisano, V., Cabrini, V., HPLC determination of chloramphenicol and thiamphenicol residues in gamebird meats. *J. Liq. Chromatogr.*, **18** (3), 529-3, 543 (1995).
- 9) Nagata, T., Saeki, M., Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 2,045-2,056 (1992).
- 10) Forti, A. F., Campana, G., Simonella, A., Multari, M., Scortichini, G., Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **529**, 257-263 (2005).
- 11) Bogusz, M. J., Hassan, H., Al-Enazi, E., Ibrahim, Z., Al-Tufail, M., Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **807**, 343-356 (2004).
- 12) Ortelli, D., Edder, P., Corvi, C., Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **59**, 61-64 (2004).
- 13) Hormazabal, V., Yndestad, M., Simultaneous determina-

- tion of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramphenicol in egg, honey and urine using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **24**(2) 477-2,486 (2001).
- 14) Winkeler, H. D., Oepkemeier, S., Determination of chloramphenicol residues in honey by microbore HPLC. *GIT Labor. Fachz.*, **46**(982) 984-985 (2002).
- 15) 厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知 “はちみつ中のクロラムフェニコール分析法等について” 平成 14 年 6 月 21 日, 食監発第 0621001 号 (2002).
- 16) 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).