

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

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者名	石井,里枝 堀江,正一 村山,三徳 米谷,民雄
発行元	[日本食品衛生学会]
巻/号	47巻2号
掲載ページ	p. 58-65
発行年月	2006年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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, Mighty 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/MS⁶⁾, GC/MS/MS⁷⁾, 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、ろ過補助剤ハイフローズーパーセルを厚さ 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)。

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

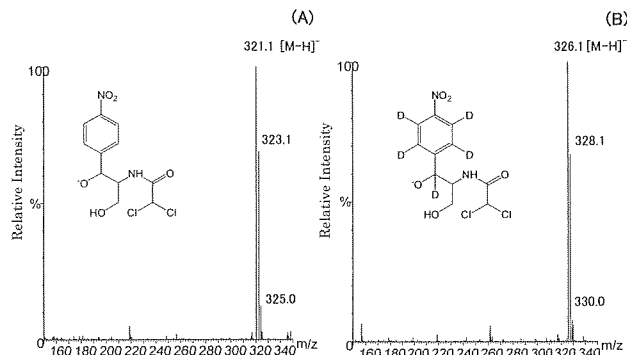


Fig. 1. Full scan mass spectra of chloramphenicol (A) and d_5 -chloramphenicol (B)

The chemical structures are also shown.

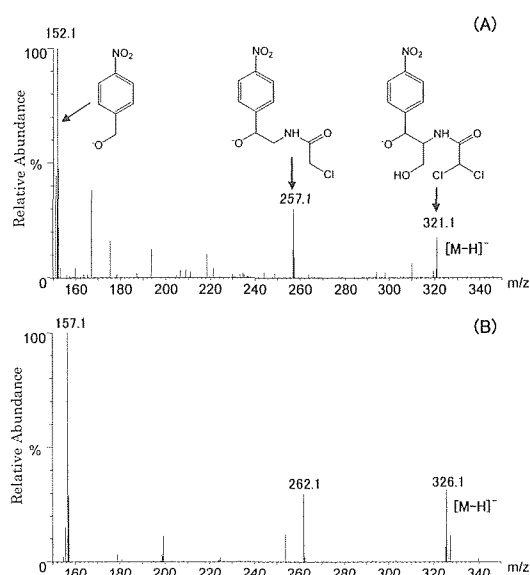


Fig. 2. Full scan product ion spectra of m/z 321 $[\text{M}-\text{H}]^-$ for CAP (A) and m/z 326 $[\text{M}-\text{H}]^-$ for d_5 -CAP (B)

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

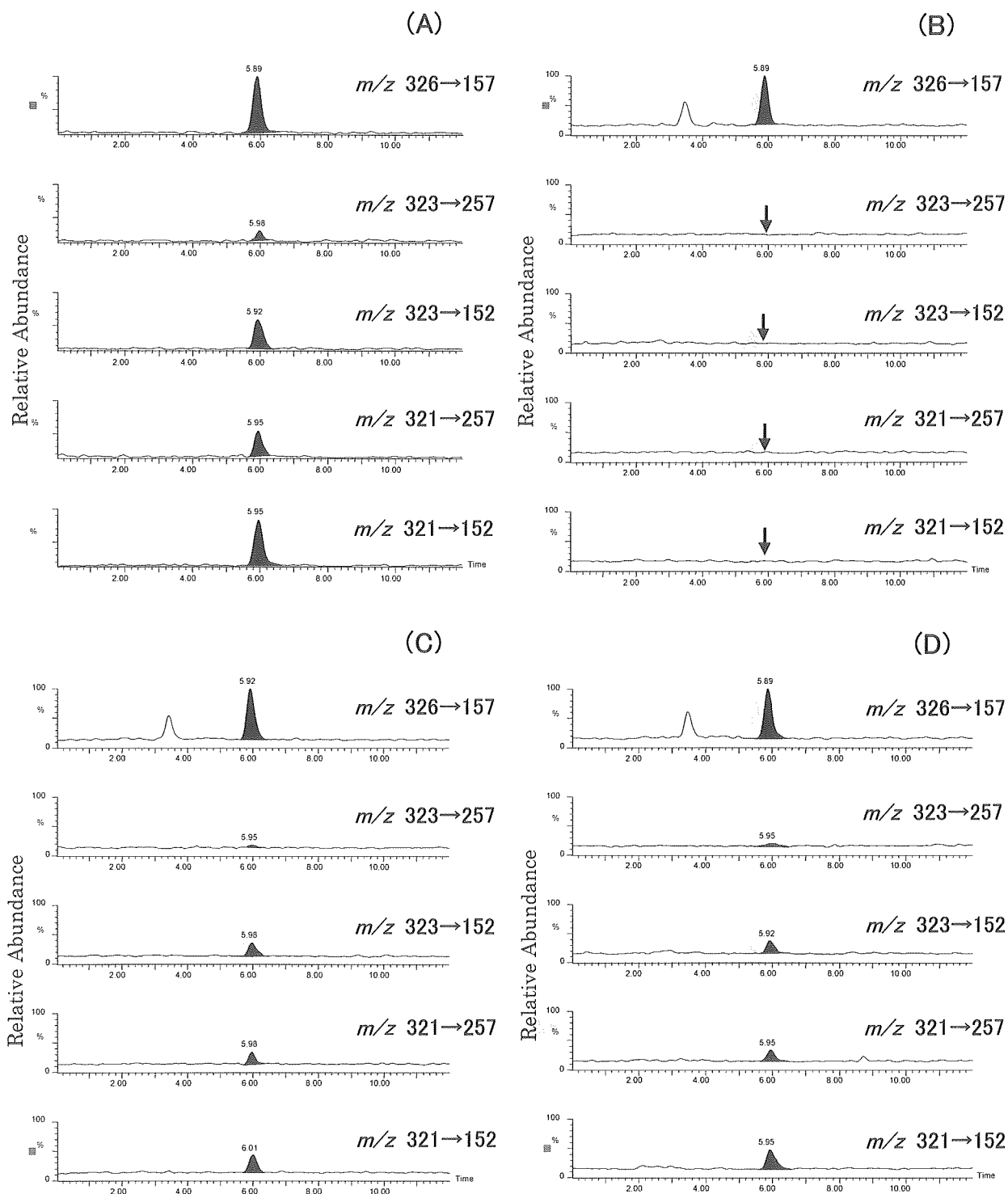


Fig. 3. MRM chromatograms of standard CAP (5 ng/mL) (A), blank honey sample from buckwheat fortified with the internal standard (5 ng/mL) (B), blank honey sample from acacia fortified with CAP (0.3 ng/g) (C), and honey from many sorts of flowers in which 0.6 ng/g of CAP was detected (D)

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

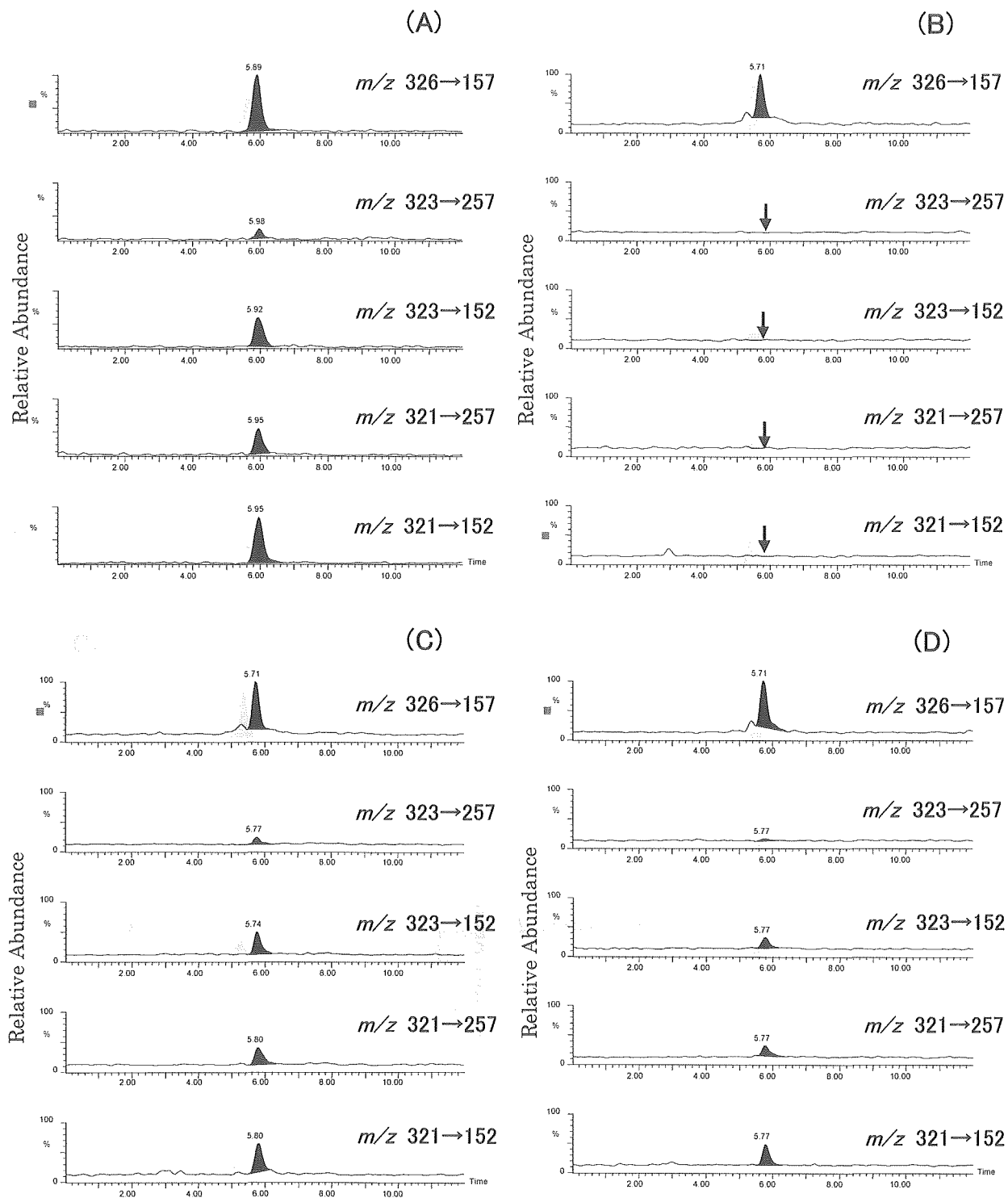


Fig. 4. MRM chromatograms of standard CAP (5 ng/mL) (A), blank royal jelly sample fortified with the internal standard (5 ng/mL) (B), blank royal jelly sample fortified with CAP (4 ng/g) (C), and royal jelly in which 2.6 ng/g of CAP was detected (D)

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¹⁰⁾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±25%, 0.64±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

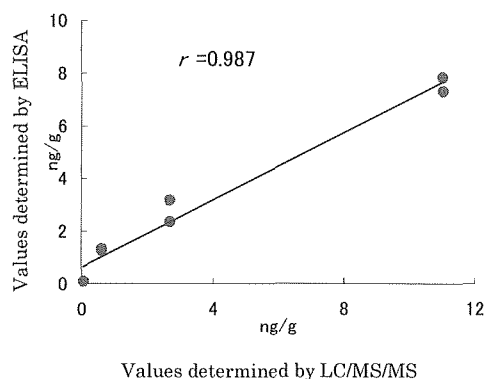


Fig. 5. Relationship between data determined by the present LC/MS/MS method and data obtained with commercial ELISA kit

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

- Woodward, K. N., Hypersensitivity in humans and exposure to veterinary drugs. *Vet. Hum. Toxicol.*, **33**, 168-172 (1991).
- Yunis, A. A., Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. *Am. J. Med.*, **87**, 44N-48N (1989).
- 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).
- Cerkvenik, 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Ortelli, D., Edder, P., Corvi, C., Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, **59**, 61-64 (2004).
- 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).