

※ 本報告書は、試験法開発における検討結果をまとめたものであり、試験法の実施に際して参考として下さい。なお、報告書の内容と通知または告示試験法との間に齟齬がある場合には、通知または告示試験法が優先することをご留意ください。

平成 26 年度

食品・添加物等規格基準に関する試験検査等に関する報告書

クロラムフェニコール試験法（畜水産物）

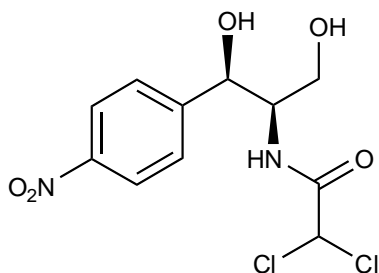
## クロラムフェニコール試験法

### [緒言]

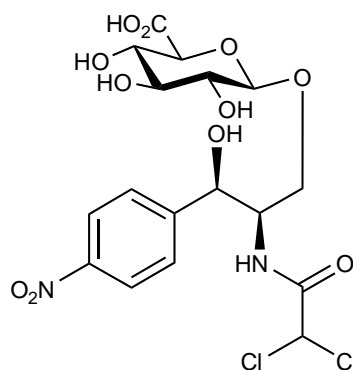
#### 1. 目的及び試験法の検討方針

クロラムフェニコールは、広域の抗菌スペクトルをもつ抗生物質である。本化合物は、遺伝毒性などを有しているものと考えられることなどから、ポジティブリスト制度導入に際して、その基準値が「不検出」とされた。農薬・動物用医薬品部会（平成26年7月31日）により、その基準値を「不検出」とすることに変更はないものの、規制対象を「クロラムフェニコール」から「クロラムフェニコール及びクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体（以下、「グルクロン酸抱合体」という。）」に変更することとされた。現行の告示試験法では、クロラムフェニコールのみを分析対象としており、グルクロン酸抱合体を分析することはできない。そこで、新たにクロラムフェニコールとグルクロン酸抱合体の両化合物を測定可能な方法を検討した。

#### 2. 分析対象物の構造式及び物理化学的性質



クロラムフェニコール



クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体

クロラムフェニコール

分子式：C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

化学名（IUPAC）：2,2-dichloro-*N*-[(1*R*,2*R*)-1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide

分子量：323.13

外観：白色粉末

融点：150.5℃

蒸気圧：1.73E-12 mmHg（25℃）

溶解性：水1Lに2.5 g溶解する（25℃）

1-オクタノール/水分配係数（log Pow）：1.1

[出典] ChemIDplus (U.S. National Library of Medicine)

クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体

分子式：C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>

化学名（IUPAC）：(2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*,3*R*)-2-[(2,2-dichloroacetyl)amino]-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propoxy]-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid

分子量：499.25

外観：白色固体

融点： 174℃以上

溶解性：メタノール、水に溶解する

その他：吸湿性がある

[出典] Toronto Research Chemicals Inc. Certificate of analysis data sheet

### 3. 基準値

不検出とされる農薬等の成分に該当する。施行通知に示されるクロラムフェニコールの検出限界は0.0005 ppm（ローヤルゼリーにあっては0.005 ppm）である。

#### [実験方法]

##### 1. 試料

###### 1) 購入先

牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、しじみは、東京都内のスーパーマーケットで購入したものを用いた。うなぎ（国産）、はちみつ（国産）、ローヤルゼリー（中国産）、ローヤルゼリー（乾燥）（中国産）は、インターネットを介して購入したものを用いた。

###### 2) 試料の採取方法

- ① 牛の筋肉は、可能な限り脂肪層を除き細切均一化した。
- ② 牛の脂肪は、可能な限り筋肉部を除き細切均一化した。
- ③ 牛の肝臓は、全体を細切均一化した。
- ④ 牛の乳は、全体を混合し均一化した。
- ⑤ 鶏卵は、殻を除去し卵黄と卵白をよく混合し均一化した。
- ⑥ はちみつは、そばはちみつを用い、全体を混合し均一化した。
- ⑦ うなぎは、頭部を除き、内臓、骨及び皮を含む可食部を細切均一化した。
- ⑧ しじみは、殻を除去し、得られたむき身を目の細かい金網にのせ、約5分間水切りを行ったものを細切均一化した。
- ⑨ ローヤルゼリーは、全体を混合し均一化した。
- ⑩ ローヤルゼリー（乾燥）は、全体を混合し均一化した。

##### 2. 試薬・試液

###### 1) 標準品

クロラムフェニコール標準品：純度99.9%以上（林純薬工業製）

クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体標準品：純度66.3%（Toronto research chemicals製）

本標準品の純度は、試薬ラベルに95%と記載されていたが、定量NMRにより純度を再度求めた結果、66.3%であることが分った。

###### 2) 試薬

アセトニトリル：残留農薬試験用（関東化学製）

酢酸エチル、メタノール：残留農薬試験用（和光純薬工業製）

アセトニトリル、蒸留水：LC-MS用（関東化学製）

β-グルクロニダーゼ（タイプIX-A） *Escherichia coli*由来のβ-グルクロニダーゼタイプIX-Aを用いた（シグマアルドリッチ製）。なお、本品の1単位は37℃、pH 6.8で1時間にフェノールフタ

レイン β-D-グルクロニドからフェノールフタレイン1.0 μgを遊離させる酵素量と定義されている。

リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、酢酸アンモニウム：試薬特級（和光純薬工業製）

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム：Oasis HLB（500 mg/6 cc）  
（ウォータース製）

### 3) 標準溶液、試液の調製方法

#### ① 標準溶液の調製方法

クロラムフェニコール標準原液：クロラムフェニコール標準品を精秤し、アセトニトリルに溶解して1 mg/mL溶液を調製した。

クロラムフェニコール添加用標準原液：クロラムフェニコール標準原液をアセトンで希釈し、10 ng/mLの濃度の溶液を調製した。

グルクロン酸抱合体標準原液：グルクロン酸抱合体標準品を精秤し、メタノールに溶解して100 μg/mL溶液を調製した。

グルクロン酸抱合体添加用標準原液：グルクロン酸抱合体標準原液をアセトンで希釈し、15.45 ng/mLの濃度（クロラムフェニコールとして10 ng/mL）の溶液を調製した。

#### ② 試液の調製方法

アセトニトリル及び水（3：7）混液：アセトニトリル300 mL及び水700 mLを混合した。

水及びメタノール（1：1）混液：水500 mL及びメタノール500 mLを混合した。

水及びメタノール（1：4）混液：水200 mL及びメタノール800 mLを混合した。

10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム770.8 mgに水を加えて溶解し、1 Lとした。

0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.8）：第1液：リン酸二水素カリウム1.36 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。第2液：リン酸水素二ナトリウム1.42 gを量り、水を加えて溶かし正確に100 mLとした。第1液に第2液を加えて混和し、pHを6.8に調整した。

β-グルクロニダーゼ溶液（1,500単位/mL）：β-グルクロニダーゼ（タイプIX-A）を0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.8）に溶解して、1,500単位/mLとなるように調製した。本酵素溶液は、用時調製した。

### 3. 装置

ホモジナイザー：PT 3100（キネマティカ製）

インキュベーター：PERSONAL-11（タイテック製）

遠心分離機：8100（久保田商事製）

振とう機：SR-2w（タイテック製）

### LC-MS/MS

	型式	会社
LC 装置	Nexera X2	島津製作所
MS 装置	API 4000	SCIEX
データ処理	Analyst	SCIEX

#### 4. 測定条件

LC 条件																								
カラム	InertSustain C18 サイズ:内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 会社：ジーエルサイエンス株式会社																							
流速 (mL/min)	0.3																							
注入量(μL)	5																							
カラム温度 (°C)	40																							
移動相	A 液：10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B 液：アセトニトリル																							
グラジエント条件	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>A 液 (%)</th> <th>B 液 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>5.1</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>			時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)	0	70	30	5	70	30	5.1	5	95	10	5	95	10.1	70	30	15	70	30
時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)																						
0	70	30																						
5	70	30																						
5.1	5	95																						
10	5	95																						
10.1	70	30																						
15	70	30																						
MS 条件																								
測定モード	SRM(選択反応モニタリング)																							
イオン化モード	ESI (-)																							
イオンスプレー電圧 (V)	-4,000																							
ヒーター温度 (°C)	500																							
エントランス電位 (V)	-10(定量イオン、定性イオン)																							
カーテンガス (psi)	50																							
ネブライザーガス (psi)	50																							
ターボガス (psi)	20																							
コリジョンガス	8 (窒素)																							
コリジョンセルイグジット電位 (V)	-9 (定量イオン)、-7 (定性イオン)																							
定量イオン (m/z)	m/z 321→152 [デクラスタリング電位：-60 V、コリジョンエネルギー：-24 eV]																							
定性イオン (m/z)	m/z 323→152 [デクラスタリング電位：-55 V、コリジョンエネルギー：-26 eV]																							
保持時間 (分)	4.2																							

#### 5. 定量

クロラムフェニコール標準原液をアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液で希釈して、0.000025、0.00005、0.000075、0.0001、0.000125、0.00015 mg/Lの検量溶液を調製した。各濃度に調製した検量溶液5 μLをLC-MS/MSに注入して、得られたピーク面積値を用いて検量線を作成した。試験溶液は5 μLをLC-MS/MSに注入して、検量線から絶対検量線法によりクロラムフェニコールの含量を求めた。

## 6. 添加試料の調製

牛の脂肪（添加濃度：0.0005 mg/kg）：試料10.0 gを採り、約40℃の湯浴で融解し添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、-30℃で30分間放置して固化した。

ローヤルゼリー（乾燥）（添加濃度：0.0005 mg/kg）：試料5.00 gに添加用標準溶液0.25 mLを添加し混合した後、30分間放置した。これに、水10 mLを加え膨潤させた後、30分間放置した。

上記以外の試料（添加濃度：0.0005 mg/kg）：試料10.0 gに添加用標準溶液0.5 mLを添加し混合後、30分間放置した。

## 7. 試験溶液の調製

### 概要

クロラムフェニコール及びβ-グルクロニダーゼを試料からメタノールで抽出した。抽出液を濃縮後に、リン酸緩衝液（pH 6.8）に溶解し、β-グルクロニダーゼ溶液を加えて、37℃で60分間加温し加水分解した。反応後の溶液に酢酸エチルを加えて転溶し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認した。

### 1) 抽出

ローヤルゼリー（乾燥）は、試料 5.00 g を採り、水 10 mL を加え混合後 30 分間放置した。その他の食品試料は、試料 10.0 g を量り採った。これにメタノール 50 mL を加えて、ホモジナイズ後に遠心分離（3,000 回転、5 分間）し、上澄液を採取した。残留物にメタノール 30 mL を加えて同様に操作し、上澄液を合わせてメタノールで 100 mL に定容した。メタノール抽出液をホールピペットで 4 mL 採取し、40℃以下で溶媒を除去した。この残留物に 0.1 mol/L リン酸緩衝液（pH 6.8）9 mL を加えて超音波処理により混合した。

### 2) 加水分解

1) で得られた溶液に、β-グルクロニダーゼ溶液 1 mL を加え、37℃で60分間加温した。加水分解後の溶液に酢酸エチル 10 mL を加えて5分間振とうした後、遠心分離（3,000回転、5分間）し、酢酸エチル層を採取した。水層に酢酸エチル 10 mL を加え同様に操作し、酢酸エチル層を合わせて40℃以下で溶媒を除去した。残留物に水及びメタノール（1：1）混液 5 mL を加え、超音波処理により溶解した。食品によっては完全に溶解しない場合があるが、その場合には懸濁した状態でミニカラムに負荷した。なお、検討した食品試料では、懸濁状態であってもミニカラムが詰まる等の問題は生じなかった。

### 3) 精製

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（500 mg）にメタノール 5 mL、水及びメタノール（1：1）混液 5 mL を順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに、2) で得られた溶液を全量負荷し、水及びメタノール（1：1）混液 5 mL でカラムを洗浄した後、水及びメタノール（1：4）混液 10 mL で溶出した。溶出液を40℃以下で濃縮して溶媒を除去した後、残留物をアセトニトリル及び水（3：7）混液に溶解し、正確に 2 mL [ローヤルゼリー（乾燥）については、1 mL] としたものを試験溶液とした。

[分析法フローチャート]

**試料**

- ↓ 試料10.0 g
- ↓ ローヤルゼリー（乾燥）：試料5.00 gに水10 mLを加え30分間放置

**抽出**

- ↓ メタノール 50 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離（3,000 回転、5 分間）し、上澄液を採る
- ↓ 残留物にメタノール 30 mL を加え、ホモジナイズ
- ↓ 遠心分離（3,000 回転、5 分間）し、上澄液を合わせる

**メタノール層**

- ↓ メタノールで 100 mL に定容

**抽出液 4 mL**

- ↓ 40°C以下で濃縮し、窒素を吹きつけて溶媒を除去
- ↓ 0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 6.8）9 mLに溶解

**加水分解**

- ↓ 1,500単位/mL β-グルクロニダーゼ溶液1 mL添加
- ↓ 37°Cで60分インキュベート

**酢酸エチル転溶**

- ↓ 酢酸エチル10 mLを加え、振とう抽出
- ↓ 遠心分離（3,000 回転、5 分間）し、酢酸エチル層を採る
- ↓ 水層に酢酸エチル10 mLを加え、振とう抽出
- ↓ 遠心分離（3,000 回転、5 分間）し、酢酸エチル層を合わせる

**酢酸エチル層**

- ↓ 酢酸エチル層を40°C以下で濃縮し、窒素を吹きつけて溶媒を除去
- ↓ 残留物に、水及びメタノール（1：1）混液5 mLを加え、超音波により溶解

**ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム（Oasis HLB, 500 mg）**

- ↓ 予めメタノール5 mL、水及びメタノール（1：1）混液5 mLを順次通液して平衡化
- ↓ 上記で得られた溶液を全量カラムに注入
- ↓ 水及びメタノール（1：1）混液 5 mLを注入し、流出液を捨てる
- ↓ 水及びメタノール（1：4）混液10 mLを注入し、溶出液を採取

**溶出液**

- ↓ 40°C以下で濃縮し、窒素を吹き付けて溶媒を除去
- ↓ 残留物をアセトニトリル及び水（3：7）混液に溶解し、正確に2 mL [ローヤルゼリー（乾燥）については1 mL] とする

**試験溶液**

↓

**LC-MS/MS測定** （0.2 g 試料/mL）試験溶液5 μLを注入

## 8. マトリックス添加標準溶液の調製

2 ng/mLクロラムフェニコール標準溶液（アセトニトリル溶液）50  $\mu$ Lを2 mLバイアルに採り、室温で窒素ガスを吹き付け乾固した。これに、ブランク試験溶液1 mLを加えて溶解したものをマトリックス添加標準溶液とした。

### [結果及び考察]

#### 1. 測定条件の検討

##### 1) MS条件の検討

##### ① クロラムフェニコールのMS条件の検討

スキャン測定においては、ESIのポジティブモードではクロラムフェニコールは検出されなかった。このため、測定モードは十分な感度が得られたESIのネガティブモードとした。クロラムフェニコールのスキャン測定におけるマススペクトル（デクラスタリング電位（DP）：-60 V）を図1に示した。クロラムフェニコールの二種の同位体由来する脱プロトン化分子（ $m/z$  321、323  $[\text{M-H}]^-$ ）が強く観察されたため、両イオンをプリカーサーイオンとした。図2及び3には、両イオンをプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを示した。いずれのイオンの場合においても、 $m/z$  152が強く検出された。最も高感度に測定できた $m/z$  321 $\rightarrow$ 152（DP：-60 V、CE：-24 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  323 $\rightarrow$ 152（DP：-55V、CE：-26 eV）を定性イオンとした。

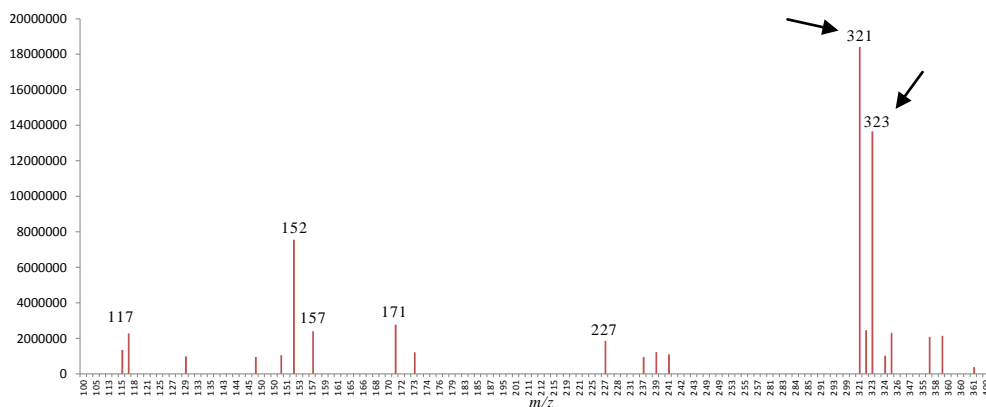


図1 クロラムフェニコールのマススペクトル

スキャン範囲：100~400  $m/z$ 、測定条件：ESI（-）、DP = -60 V  
（DP：デクラスタリング電位）

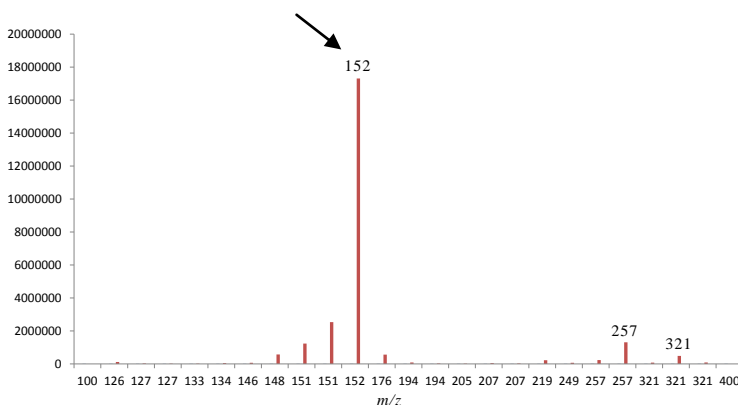


図2 クロラムフェニコールのプロダクトイオンスペクトル（定量用）

プリカーサーイオン： $m/z$  321、測定条件：ESI（-）、DP = -60 V、CE = -24 eV  
（DP：デクラスタリング電位、CE：コリジョンエネルギー）



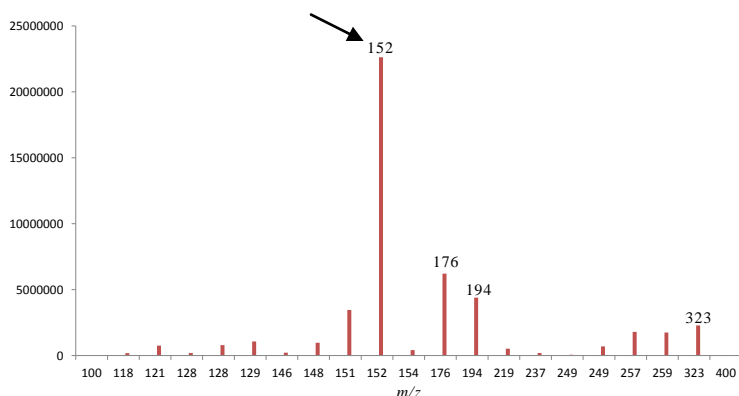


図3 クロラムフェニコールのプロダクトイオンスペクトル（定性用）

プリカーサーイオン： $m/z$  323、測定条件：ESI（－）、DP = -55 V、CE = -26 eV

（DP：デクラスタリング電位、CE：コリジョンエネルギー）

## ② グルクロン酸抱合体のMS条件の検討

グルクロン酸抱合体の測定モードは、スキャン測定において十分な感度を得られたESIのネガティブモードとした。なお、ESIのポジティブモードではグルクロン酸抱合体は検出されなかった。グルクロン酸抱合体のスキャン測定におけるマススペクトル（DP：-80 V）を図4に示した。グルクロン酸抱合体の二種の同位体由来する脱プロトン化分子（ $m/z$  497、499  $[M-H]^-$ ）が強く観察されたため、両イオンをプリカーサーイオンとした。 $m/z$  497をプリカーサーイオンとし、CEを-44 eVとしたときのプロダクトイオンスペクトルを図5に示した。プロダクトイオンとして $m/z$  113が強く検出されたため、本イオンを測定用のプロダクトイオンとした。また、 $m/z$  499をプリカーサーイオンとし、CEを-34 eVとしたときのプロダクトイオンスペクトル（DP：-70V）を図6に示した。同様に $m/z$  193が強く検出されたため、本イオンを測定用のプロダクトイオンとした。両トランジションを用いてSRM測定を行い、グルクロン酸抱合体のピークのS/Nを求めたところ、 $m/z$  497→113のトランジションの方が高いS/Nが得られた。このため、 $m/z$  497→113（DP：-80V、CE：-44 eV）を定量イオンとし、 $m/z$  499→193（DP：-70 V、CE：-34 eV）を定性イオンとした。

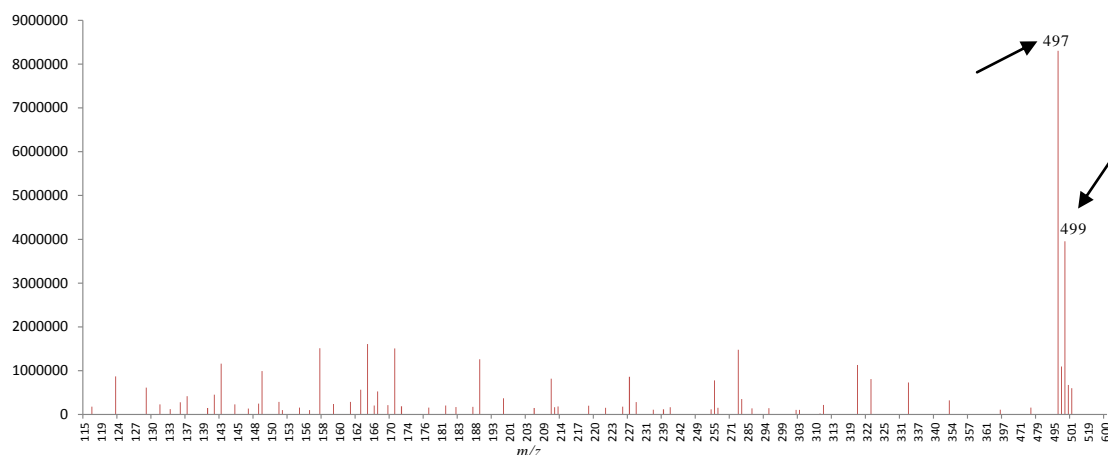


図4 グルクロン酸抱合体のマススペクトル

スキャン範囲：100～600  $m/z$ 、測定条件：ESI（－）、DP = -80 V

（DP：デクラスタリング電位）

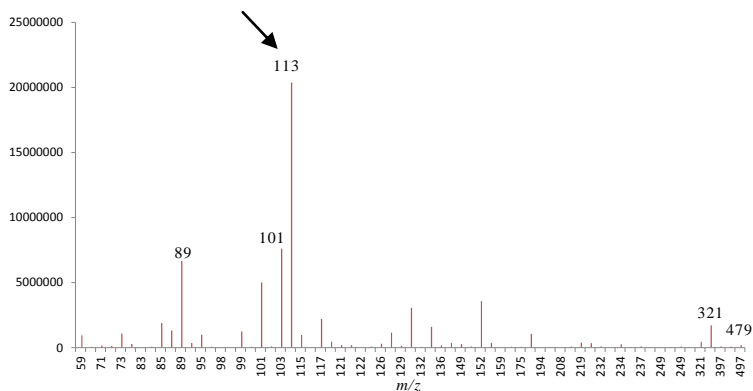


図5 グルクロン酸抱合体のプロダクトイオンスペクトル (定量用)

プリカーサーイオン :  $m/z$  497、測定条件 : ESI (-)、DP = -80 V、CE = -44 eV  
(DP : デクラスタリング電位、CE : コリジョンエネルギー)

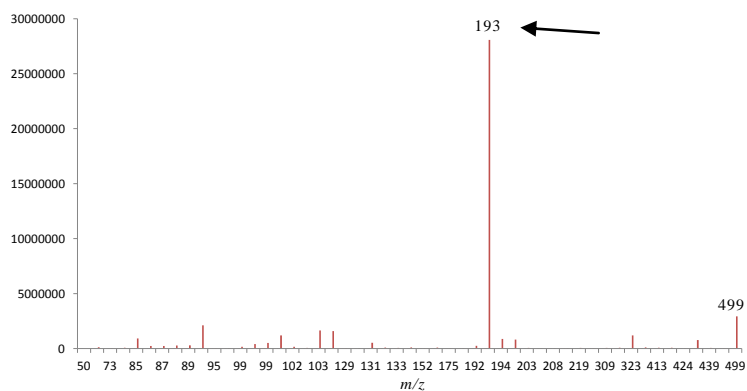


図6 グルクロン酸抱合体のプロダクトイオンスペクトル (定性用)

プリカーサーイオン :  $m/z$  499、測定条件 : ESI (-)、DP = -70 V、CE = -34 eV  
(DP : デクラスタリング電位、CE : コリジョンエネルギー)

## 2) LC条件の検討

### ① 分析カラムの選定

3種のODSカラムを用いてクロラムフェニコール標準溶液を測定し、ピークのS/Nを指標として分析カラムを選択した。表1に示すように、InertSustain C18カラムを用いることでクロラムフェニコールのピークのS/Nが検討したカラムの中では最大となったことから本分析カラムを用いることにした。

表1. 各分析カラムを用いたときの、クロラムフェニコールのピークのS/N

カラム	移動相	保持時間 (分)	クロラムフェニコールの ピークの S/N
L-column2 ODS 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (化学物質評価研究機構製)	アセトニトリル及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(35:65)混液	4.1	1,670
InertSustain C18 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (ジューエルサイエンス製)	アセトニトリル及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(37:63)混液	4.2	1,893
Mighysil PR-18 GP 内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm (関東化学製)	アセトニトリル及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(35:63)混液	4.1	1,511

5 ng/mLクロラムフェニコール標準溶液10 μLを注入

流速：0.4 mL/min

## ② 移動相条件の検討

LC-MS/MS測定に用いる移動相として10 mmol/L酢酸アンモニウム及びメタノールの混合液を用いると、アセトニトリルを用いた場合に比べてクロラムフェニコールのピーク形状が悪くなった。このため、移動相にはメタノールは使用しないことにした。移動相の溶媒としてアセトニトリルを選択し、加える添加剤の種類について検討した。添加剤として水（添加剤なし）、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及び10 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液を用いて、クロラムフェニコール標準溶液を測定し、ピークのS/Nを比較した。表2に示す通り、10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いた場合にS/Nが約1,400と最大になった。次に、最適な酢酸アンモニウムの濃度を明らかにするために、1~20 mmol/Lの酢酸アンモニウム溶液を用いて同様に検討した。その結果、酢酸アンモニウム濃度が10 mmol/Lのときに、ピークのS/Nが約1,400と最大になった。以上のことから、添加剤には10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いることにした。（表3）

表2. 各移動相条件におけるクロラムフェニコールのS/N

移動相	保持時間 (分)	クロラムフェニコールの ピークの S/N
アセトニトリル及び水(35:65)混液	4.7	788
アセトニトリル及び 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(35:65)混液	4.7	1,080
アセトニトリル及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液(35:65)混液	4.7	1,393

5 ng/mLクロラムフェニコール標準溶液10 μLを注入

カラム：InertSustain C18（3.0 x 150 mm, 3 μm）、流速：0.4 mL/min

表3. クロラムフェニコールのS/Nに対する酢酸アンモニウム濃度の影響

移動相	保持時間 (分)	クロラムフェニコールの ピークの S/N
アセトニトリル及び 1 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (35:65) 混液	4.7	1,301
アセトニトリル及び 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (35:65) 混液	4.7	1,176
アセトニトリル及び 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶 液 (35:65) 混液	4.7	1,411
アセトニトリル及び 20 mmol/L 酢酸アンモニウム溶 液 (35:65) 混液	4.7	972

5 ng/mLクロラムフェニコール標準溶液10 µLを注入

カラム：InertSustain C18 (3.0 x 150 mm, 3 µm)、流速：0.4 mL/min

### 3) 検量線

添加濃度 (0.0005 mg/kg) に対する回収率25% (0.000125 mg/L)、50% (0.00025 mg/L)、75% (0.000375 mg/L) 100% (0.0005 mg/L) 125% (0.000625 mg/L) 150% (0.00075 mg/L) に相当する濃度の検量溶液をアセトニトリル及び水 (3 : 7) 混液で調製し、5 µLをLC-MS/MSに注入して検量線を作成した。図7に示すように、上記の濃度範囲で作成した検量線の決定係数 $R^2$ は0.995以上と良好な直線性が認められた。

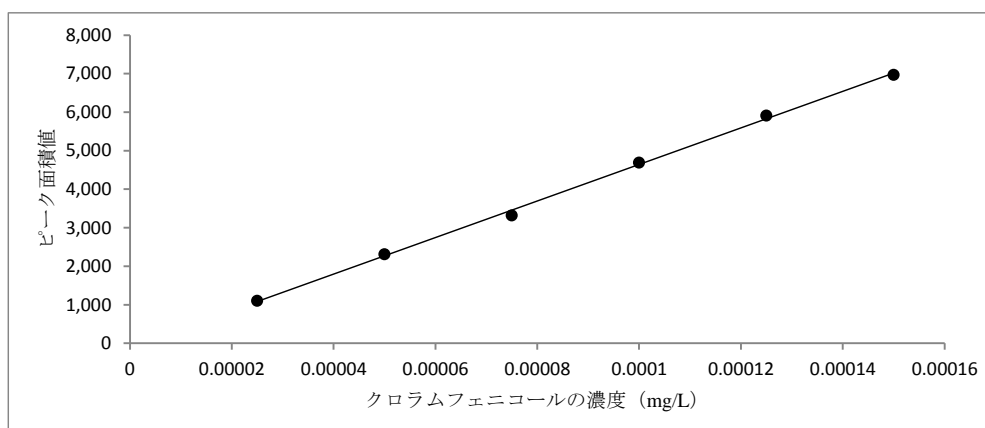


図7 クロラムフェニコールの検量線の例

$$y = 47,451,428 x - 102$$

$$R^2 = 0.9987$$

## 2. 試験溶液調製方法の検討

### 1) 抽出方法の検討

ホモジナイズ抽出時の食品試料の分散状況及び回収率を指標として抽出溶媒を選択した。検討には、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵、ローヤルゼリーを用いた。添加試料には、クロラムフェニコールは試料中の濃度で0.005 mg/kgになるように、またグルクロン酸抱合体は試料中の濃度で0.05 mg/kgとなるように添加して調製した。なお、牛の脂肪については、約40℃の湯浴で融解し添加用標準溶液を添加し混合後、-30℃で30分間放置して固化して調製した。

本検討では、グルクロン酸抱合体自体の回収率を評価するため、加水分解は行わずに直接測定することにした。添加濃度はクロラムフェニコールと同じ濃度では測定感度が不足するため、クロラムフェニコールの10倍とした。

試料に表4に示す抽出溶媒50 mLを加えホモジナイズ後に遠心分離し、上澄液を採取した。残留物に同溶媒30 mLを加え同様に操作し、同溶媒で100 mLに定容した。ブランク試料から得られた抽出液に添加濃度と同じになるようにクロラムフェニコールまたはグルクロン酸抱合体標準溶液を添加して、100 mLとしたものをマトリックス添加標準溶液とした。それぞれの抽出液から10 mLを分取し、40℃以下で濃縮し、アセトニトリル及び水（1：19）混液を加えて10 mLとした。得られた溶液を、LC-MS/MSで測定し、マトリックス添加標準溶液から得られたピーク面積値に対する添加試料から得られたピーク面積値の比を求め回収率とした。

はじめに、牛の脂肪を均一に分散することが可能なアセトン抽出溶媒の候補とした。表4に示すように、牛の脂肪、牛の肝臓、鶏卵では、アセトンに試料が分散することが目視で確認出来たが、ローヤルゼリーでは、均一に分散しなかった。そこで、ローヤルゼリーに水10 mLを添加し混合した試料を用いて分散の状況を確認したが、同様の結果となった。

次に、食品試料と抽出溶媒の混和性の向上を期待して、アセトンとメタノールの混合溶媒を用いて検討した。アセトン及びメタノール（4：1）混液を用いることで、検討した全ての食品試料でホモジナイズ時に均一に分散することが確認された。各食品からの回収率は、クロラムフェニコールの添加試料で95～110%と良好な回収率が得られた。一方、グルクロン酸抱合体の回収率は61～97%であり、特に鶏卵、ローヤルゼリーにおいて低回収となった。これは、グルクロン酸抱合体が高極性化合物であるため、アセトンとメタノールの混液では抽出されにくいものと考えられた。

そこで、グルクロン酸抱合体も抽出されるように、極性の高いメタノールを用いて同様に検討した。その結果、検討した全ての食品試料でホモジナイズ過程において抽出溶媒に均一に分散することが確認され、かつ両化合物で90～105%の良好な回収が得られた。以上のことから、抽出溶媒にはメタノールを用いることにした。

表4 抽出溶媒の検討結果

試料 (10.0 g)	抽出溶媒	抽出溶媒を 50 mL 添加したときのホモジナイズ時の試料の分散の状況	回収率*		選定の可否
			クロラムフェニコール	グルクロン酸抱合体	
牛の脂肪 牛の肝臓 鶏卵 ローヤルゼリー	アセトン	ローヤルゼリーでは分散しなかった。 ローヤルゼリーに水 10 mL を混合しても分散しなかった。	-	-	×
	アセトン及びメタノール（4：1）混液	全ての試料で均一に分散した。	牛の肝臓：110% 牛の脂肪：109% 鶏卵：95% ローヤルゼリー：99%	牛の肝臓：75% 牛の脂肪：97% 鶏卵：61% ローヤルゼリー：64%	×
	メタノール	全ての試料で均一に分散した。	牛の肝臓：95% 牛の脂肪：96% 鶏卵：90% ローヤルゼリー：105%	牛の肝臓：103% 牛の脂肪：91% 鶏卵：99% ローヤルゼリー：101%	○

\*添加試料から得られたピーク面積値 / マトリックス添加標準溶液のピーク面積値 × 100

-：未実施

添加濃度：クロラムフェニコール0.005 mg/kg、グルクロン酸抱合体0.05 mg/kg

## 2) グルクロン酸抱合体の加水分解条件の検討

グルクロン酸抱合体をLC-MS/MSで直接測定した場合には、十分な感度が得られず、施行通知に示された検出限界濃度 (0.0005 mg/kg) を達成することが困難であった。このため、グルクロン酸抱合体を加水分解によりクロラムフェニコールに変換して測定する方法を検討した。加水分解は、アメリカ合衆国農務省 (USDA) により示されているβ-グルクロニダーゼを用いる方法 (以下、USDA法<sup>1)</sup>) を参考した。USDA法では、ホモジナイズした食品試料に直接β-グルクロニダーゼを添加してリン酸緩衝液中で加水分解し、生成したクロラムフェニコールを抽出する方法を採用している。このため、食品の種類によっては、食品マトリックスの影響により加水分解の効率が変化する可能性がある。そこで、本検討では、食品の種類に依らず安定した加水分解反応が得られるように、食品試料からクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体を抽出してから、β-グルクロニダーゼにより加水分解する方法を検討した。参考としたUSDA法では、反応温度の範囲を37±2℃としているが、検討では、設定温度±0.5℃の範囲で温度制御が可能な装置を用いた。

[実験方法] 7. 試験溶液の調製の項の1) 抽出に従って調製した牛の筋肉のブランク試料のメタノール抽出液を用いて加水分解条件 (酵素濃度及び反応時間) について検討した。牛の筋肉の抽出液4 mLを分取し、試料中の濃度で0.0005 mg/kgとなるようにグルクロン酸抱合体標準液を加えて濃縮した後、0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解した。このリン酸緩衝溶液にβ-グルクロニダーゼ溶液を添加した後、37℃で加温し、加水分解した。加水分解後の溶液は、7. 試験溶液の調製の項の3) 精製の操作を行いクロラムフェニコールの回収率を求めた。なお、加水分解時の反応溶液量は、リン酸緩衝溶液と酵素溶液を合わせて10 mLとなるように調整した。

### ① 酵素濃度の検討

最適な酵素濃度について検討するため、上記のリン酸緩衝溶液に25～200 (25、50、75、100、150、200) 単位/mLの酵素濃度となるようにβ-グルクロニダーゼ溶液を添加し、各濃度におけるクロラムフェニコールの回収率を求めた。図8に示すように、酵素濃度が25～100単位/mLまでは、濃度に依存して加水分解が進行しクロラムフェニコールの回収率が上昇した。100単位/mL以上で回収率がほぼ100%で一定となった。食品中のマトリックスの種類により反応効率が変化する可能性があるため、加水分解に用いるβ-グルクロニダーゼの濃度は余裕を見て150単位/mLを用いることとした。

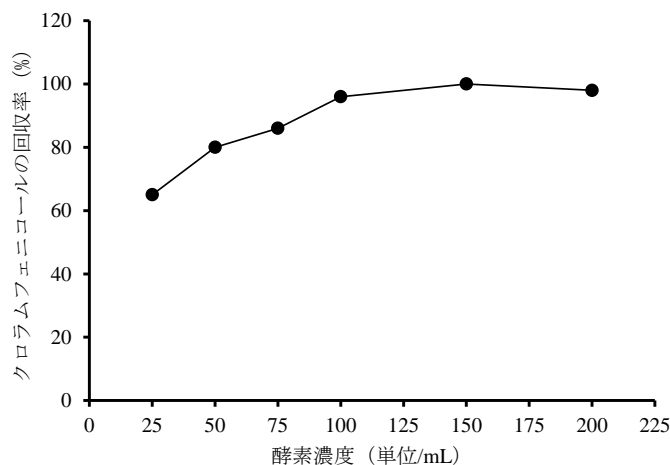


図8 各酵素濃度条件におけるクロラムフェニコールの回収率 (反応時間: 90分)

### ② 反応時間の検討

最適な反応時間について検討するため、上記の通り調製したリン酸緩衝溶液に150単位/mLとなるように酵素溶液を添加し、10～120（10、20、30、60、90、120）分間加温した。反応後の溶液を上記と同様に操作し、反応時間毎のクロラムフェニコールの回収率を求めた。図9に示すように、反応時間が30分以降で回収率がほぼ100%となった。食品の種類により加水分解の効率が変わる可能性があるため、反応時間は余裕を見て60分を用いることとした。

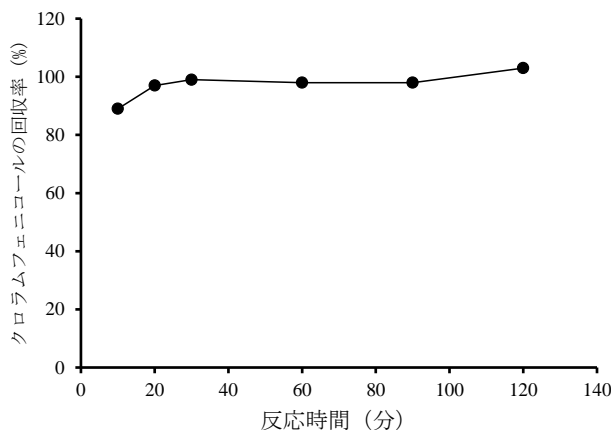


図9 各反応時間におけるクロラムフェニコールの回収率（酵素濃度：150単位/mL）

### 3) 酢酸エチル転溶の検討

牛の筋肉を試料として、[実験方法] 7. 試験溶液の調製の項の1) 抽出、2) 加水分解に従い加水分解まで実施した。得られた加水分解後の溶液に、試料中の濃度で0.0005 mg/kgとなるようにクロラムフェニコール溶液を添加し酢酸エチル10 mLずつで3回抽出した。得られた酢酸エチル層を3) 精製の操作に従い、それぞれの回収率を求めた。表5に、各抽出回における回収率(%)を示した。クロラムフェニコールは1回目の抽出でほぼ100%回収されたが、2回目の抽出においても痕跡量のクロラムフェニコールが検出された。以上のことから、転溶操作は酢酸エチル10 mLで2回行うことにした。

表5 酢酸エチルへの転溶の検討

	回収率(%)			
	酢酸エチル			合計
	10 mL (1回目)	10 mL (2回目)	10 mL (3回目)	
クロラムフェニコール	103	Trace	0	103

添加濃度：0.0005 mg/kg

Trace：3 ≤ S/N ≤ 10

### 4) カラム精製方法の検討

ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムによる精製について検討した。予め、ミニカラムにメタノール5 mL、水及びメタノール（1：1）混液5 mLを順次注入し、流出液は捨てた。このカラムに、0.2 ng/mLクロラムフェニコール溶液（水及びメタノール（1：1）混液）5 mLを負荷し、水及びメタノール（1：1）混液並びに水及びメタノール（1：4）混液で溶出したときの溶出状況を表6に示した。クロラムフェニコールは水及びメタノール（1：1）混液15 mLでは溶出されず、水及びメタノール（1：4）混液10 mLで溶出されたことから、水及びメ

タノール（1：1）混液5 mLで負荷した後、同混液5 mLでカラムを洗浄し、水及びメタノール（1：4）混液10 mLで溶出することにした。

表6 ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出状況

	回収率（%）						合計
	水及びメタノール（1：1）混液			水及びメタノール（1：4）混液			
	5 mL(負荷)	5-10 mL	10-15 mL	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	
クロラムフェニ コール	0	0	0	97	Trace	0	97

Oasis HLB（6CC、500 mg、ウォーターズ製）

添加量：1 ng

Trace：3 ≤ S/N ≤ 10

### 3. 添加回収試験

畜水産物10食品（牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ、ローヤルゼリー、及びローヤルゼリー（乾燥））を用いて、[実験方法] 7. 試験溶液の調製に示す方法に従いクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体の添加回収試験を実施した。両化合物の添加濃度は、0.0005 mg/kg（クロラムフェニコールとして）として、5併行で検討した。添加回収試験における回収率100%相当の溶媒標準溶液、各食品のブランク試料及び添加試料の代表的なクロマトグラムを図10～19に示した。また、各食品のブランク試料のスキャン測定による代表的なトータルイオンクロマトグラムを図20に示した。

#### 1) 選択性の評価

選択性の評価結果を表7に示した。ローヤルゼリー及びローヤルゼリー（乾燥）のブランク試料からクロラムフェニコールの保持時間にピークが検出されたが、選択性の目標値を満たしていた。なお、これらのブランク試料から得られたピークについて、定量イオンに対する定性イオンのピーク面積比を求めたところ、その平均値（n = 5）は、ローヤルゼリーで0.71、ローヤルゼリー（乾燥）では0.69であり、RSD%は、それぞれ3.4%及び6.8%であった。クロラムフェニコールの各濃度の検量溶液における上記のピーク面積比の平均値（n = 6）は0.71、RSDは、4.5%であったことから、ブランク試料からクロラムフェニコールと同じ保持時間に検出されたピークは、クロラムフェニコールである可能性が高いと考えられた。その他の食品では、クロラムフェニコールの定量を妨害するピークは認められなかった。以上のことから、選択性は問題がないと判断した。



表7 選択性の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	妨害ピークの許容範囲の評価		ピーク面積(高さ) <sup>1)</sup>							選択性の 評価 <sup>3)</sup>	備考		
					評価濃度 (ppm)	評価基準	面積又は 高さの別	ブランク			マトリックス添加標準溶液 <sup>2)</sup>					面積(高さ) 比 (a)/(b)	
								n=1	n=2	平均(a)	n=1	n=2	平均(b)				
1	クロラムフェニコール	牛の筋肉	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4540	4600	4570	0.000	○	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3682	3450	3566	0.000	○	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4050	4220	4135	0.000	○	
		牛の乳	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	5300	5680	5490	0.000	○	
		鶏卵	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3834	3673	3754	0.000	○	
		はちみつ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3529	3586	3558	0.000	○	
		うなぎ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4560	4490	4525	0.000	○	
		しじみ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3717	4071	3894	0.000	○	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	656	910	783	5360	5520	5440	0.168	○	
		ローヤルゼリー(乾燥)	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	670	935	803	5470	5210	5340	0.177	○	
2	クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体	牛の筋肉	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4540	4600	4570	0.000	○	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3682	3450	3566	0.000	○	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4410	4350	4380	0.000	○	
		牛の乳	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	5300	5680	5490	0.000	○	
		鶏卵	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3834	3673	3754	0.000	○	
		はちみつ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3529	3586	3558	0.000	○	
		うなぎ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	4400	4570	4485	0.000	○	
		しじみ	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	0	0	0	3717	4071	3894	0.000	○	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	631	724	678	5000	5090	5045	0.155	○	
		ローヤルゼリー(乾燥)	0.0005	不検出	定量限界	0.0005	< 0.333	面積	543	668	606	4320	4740	4530	0.154	○	

- \*1 ブランク試料、標準溶液の順に注入して測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)
- \*2 試料中の濃度が「評価濃度」相当になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液(マトリックス添加標準溶液)を用いる。ブランク試料に妨害ピークが観察されなかった場合には、標準溶液のピーク面積(高さ)は求めなくても良い。
- \*3 面積(高さ)比が、妨害ピークの許容範囲の評価基準に適合する場合には「○」、適合しない場合には「×」を記載する。

2) 真度、精度及び定量限界

真度、精度及び定量限界の検討結果を表8に示した。ローヤルゼリー及びローヤルゼリー(乾燥)においては、ブランク試料からクロラムフェニコールと考えられるピークが検出されたが、これらのブランク値を、添加試料から得られるピーク面積値から差し引かずクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体の真度を求めると、ローヤルゼリーでそれぞれ119及び119%、ローヤルゼリー(乾燥)でそれぞれ123及び107%となり、一部で目標値を満たさなかった。このため、より正確な真度を求めるために、添加試料から得られたピーク面積値からブランク試料のピーク面積値の平均値(n=5)を差し引き、真度を求めた。真度及び併行精度は、クロラムフェニコールでそれぞれ84~109%及び1.6~4.8%、グルクロン酸抱合体でそれぞれ79~104%及び2.8~6.3%であり、目標値を満たした。また、添加試料におけるピークのS/Nの平均値は、クロラムフェニコールで101~261、グルクロン酸抱合体で125~261であり、S/N≧10以上を十分に満たした。以上のことから、本法は検出限界濃度(0.0005 mg/kg)を精度良く定量することが出来ると考えられた。

表8 真度、精度及び定量限界の評価

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	定量限界 の評価 <sup>1)</sup>	検査線		回収率(%)					真度 (%)	併行精度 (RSD%)	S/N <sup>2)</sup>			備考	
							傾き	切片	r <sup>2</sup>	n=1	n=2	n=3	n=4			n=5	Max.	Min.		平均値
1	クロラムフェニコール	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	S/N	47451	-102	0.9987	88.6	87.5	91.9	92.1	88.1	89.6	2.4	211	143	177	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	S/N	37059	-73	0.9980	95.9	102.5	105.0	94.2	99.7	99.5	4.5	198	152	175	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	S/N	42537	25	0.9910	82.6	85.0	79.4	84.3	86.6	83.6	3.3	188	136	162	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	S/N	54894	-21	0.9980	98.9	97.7	95.1	94.9	92.2	95.8	2.7	325	196	261	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	S/N	35512	60	0.9970	93.9	88.1	95.1	98.1	88.0	92.6	4.8	174	139	157	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	38302	-199	0.9970	96.6	92.2	89.9	94.4	89.2	92.5	3.3	81	122	101	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	45726	-36	0.9980	99.6	96.1	98.8	105.8	96.4	99.3	3.9	169	302	236	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	37319	-23	0.9970	101.9	105.2	104.6	106.0	103.3	104.2	1.6	178	121	150	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	S/N	45086	70	0.9970	99.5	99.5	107.5	108.8	101.1	103.3	4.4	255	212	234	
		ローヤルゼリー(乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	S/N	44434	189	0.9920	102.5	107.4	108.8	116.9	107.2	108.6	4.8	224	188	206	
2	クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	S/N	47451	-102	0.9987	79.5	87.7	89.8	80.3	85.6	84.6	5.4	250	166	208	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	S/N	37059	-73	0.9980	91.6	93.9	90.4	87.2	87.4	90.1	3.2	215	164	190	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	S/N	42537	25	0.9910	77.2	70.6	80.6	83.4	81.0	78.6	6.3	190	138	164	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	S/N	54894	-21	0.9980	90.9	89.1	87.4	88.6	84.2	88.0	2.8	292	229	261	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	S/N	35512	60	0.9970	80.9	89.3	91.4	87.1	90.5	87.8	4.8	193	143	168	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	38302	-199	0.9970	91.3	97.9	103.2	98.1	101.8	98.5	4.7	102	150	126	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	45349	-38	0.9980	89.3	90.8	85.3	95.9	92.8	90.8	4.4	264	191	228	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	S/N	37319	-23	0.9970	95.8	108.5	109.9	98.7	107.7	104.1	6.1	211	125	168	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	S/N	44720	-21	0.9940	98.4	101.8	102.9	109.2	106.5	103.8	4.0	144	111	128	
		ローヤルゼリー(乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	S/N	42229	100	0.9990	99.1	101.2	92.0	90.6	90.1	94.6	5.5	142	108	125	

\*1 S/Nを求める必要がある場合には『S/N』と表示される。

\*2 得られた回収率の中で最大値を与えるピーク (Max.) 及び最小値を与えるピーク (Min.) のそれぞれのS/Nを求める。

### 3) 試料マトリックスの測定への影響

試料マトリックスの測定への影響について検討した結果を表9に示した。添加回収試験における回収率100%相当濃度となるように調製したマトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積比を求めた。ローヤルゼリー及びローヤルゼリー (乾燥) のブランク試料からクロラムフェニコールと考えられるピークが検出されたため、添加試料から得られたピーク面積値からブランク試料のピーク面積値の平均値 (n = 5) を差引き、ピーク面積比を求めた。その結果、ピーク面積比は、クロラムフェニコールで0.92~1.03、グルクロン酸抱合体で0.91~1.03であった。表10に、添加回収試験により得られた真度を上記に示すピーク面積比で除して、補正した真度を示した。補正後の真度は、クロラムフェニコールで91~108%、グルクロン酸抱合体で86~114%であり、補正の前後で矛盾は認められなかった。以上のことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。

表9 試料マトリックスの測定への影響

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	標準溶液 濃度 <sup>1)</sup> (mg/L)	ピーク面積 (高さ) <sup>2)</sup>						備考			
							面積又は 高さの別	ブランク <sup>3)</sup>	マトリックス添加標準溶液 <sup>4)</sup>			溶媒標準溶液				
									n=1	n=2	平均	n=1		n=2	平均	
1	クロラムフェニコール	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4540	4600	4570	4660	4690	4675	0.98	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3682	3450	3566	3469	3726	3598	0.99	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4050	4220	4135	4610	4410	4510	0.92	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	5300	5680	5490	5400	5370	5385	1.02	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3834	3673	3754	3678	3779	3729	1.01	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3529	3586	3558	3714	3608	3661	0.97	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4560	4490	4525	4950	4610	4780	0.95	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3717	4071	3894	3849	3676	3763	1.03	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	783	5360	5520	4657	4780	5000	4890	0.95	
		ローヤルゼリー (乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	803	5470	5210	4538	4430	4960	4695	0.97	
2	クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4540	4600	4570	4660	4690	4675	0.98	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3682	3450	3566	3469	3726	3598	0.99	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4410	4350	4380	4830	4700	4765	0.92	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	5300	5680	5490	5400	5370	5385	1.02	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3834	3673	3754	3678	3779	3729	1.01	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3529	3586	3558	3714	3608	3661	0.97	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	4400	4570	4485	4730	4650	4690	0.96	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	0	3717	4071	3894	3849	3676	3763	1.03	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	678	5000	5090	4368	4750	4810	4780	0.91	
		ローヤルゼリー (乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	0.0001	面積	606	4320	4740	3925	4130	4270	4200	0.93	

\*1 添加回収試験における回収率100%相当濃度になるように、ブランク試料の試験溶液で調製した標準溶液 (マトリックス添加標準溶液) 及び溶媒で調製した標準溶液 (溶媒標準溶液) を作成する。

\*2 マトリックス添加標準溶液及び溶媒標準溶液の順に交互に2回以上測定した結果から評価する。(必要に応じて起爆注入を行う。)

\*3 ブランクにピークが認められた場合には、マトリックス添加標準溶液の値はブランク値を差し引いた値を用いる。

\*4 マトリックス添加標準溶液は試験当日のブランク試料の試験溶液を用いて調製する。

\*5 マトリックス添加標準溶液の溶媒標準溶液に対するピーク面積 (又は高さ) の比を求める。

表10 補正真度

No.	分析対象化合物	食品名	定量限界 [検出限界] (mg/kg)	基準値 (ppm)	添加濃度 (ppm)	真度 (%)	ピーク面積比	補正真度 (%) <sup>*1)</sup>	備考
1	クロラムフェニコール	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	89.6	0.98	91.7	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	99.5	0.99	100.3	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	83.6	0.92	91.2	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	95.8	1.02	93.9	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	92.6	1.01	92.0	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	92.5	0.97	95.1	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	99.3	0.95	104.9	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	104.2	1.03	100.7	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	103.3	0.95	108.4	
		ローヤルゼリー (乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	108.6	0.97	112.3	
2	クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体	牛の筋肉	0.0005	不検出	0.0005	84.6	0.98	86.5	
		牛の脂肪	0.0005	不検出	0.0005	90.1	0.99	90.9	
		牛の肝臓	0.0005	不検出	0.0005	78.6	0.92	85.5	
		牛の乳	0.0005	不検出	0.0005	88.0	1.02	86.4	
		鶏卵	0.0005	不検出	0.0005	87.8	1.01	87.3	
		はちみつ	0.0005	不検出	0.0005	98.5	0.97	101.3	
		うなぎ	0.0005	不検出	0.0005	90.8	0.96	95.0	
		しじみ	0.0005	不検出	0.0005	104.1	1.03	100.6	
		ローヤルゼリー	0.0005	不検出	0.0005	103.8	0.91	113.6	
		ローヤルゼリー (乾燥)	0.0005	不検出	0.0005	94.6	0.93	101.2	

\*1 添加回収試験により得られた真度/ピーク面積比

#### 4. その他の試験法検討に関連する事項

牛、豚、鶏、馬及びナマズの筋肉部を対象とするクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体の分析法として、USDA法が報告されている。USDA法は、ホモジナイズした食品試料に直接β-グルクロニダーゼを添加してリン酸緩衝液中で加水分解し、反応溶液中のクロラムフェニコールを酢酸エチルに転溶し、ヘキサン洗浄、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる精製後に、トリメチルシリル化してGC-ECD及びGC-MS測定する方法である。USDA法では、食品試料を用いて直接加水分解操作を行うため、食品の種類によっては加水分解の反応効率や再現性が低下することが懸念された。このため、開発した試験法では、試料からクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体を抽出した後に、β-グルクロニダーゼによる加水分解を行うこととした。これにより、加水分解反応時の夾雑成分を大幅に減少させることが可能となり、USDA法と比べ、β-グルクロニダーゼの量を減らすことができるものと考えられた。しかし、開発した試験法の加水分解条件は、酵素濃度150単位/mL、反応時間60分間に設定したが、USDA法では、54単位/mLで90分間の条件としている。予想に反して、開発した試験法では、USDA法と比較して約3倍の酵素濃度が必要であった。

そこで、USDA法に示される加水分解条件でグルクロン酸抱合体が完全に加水分解されているかを確認するために検討した。牛の筋肉を試料として、抽出、加水分解及び酢酸エチル転溶までをUSDA法に従い、ミニカラム精製以降の操作は本検討で開発した分析法に従い操作し、クロラムフェニコールの回収率を求めた。グルクロン酸抱合体の添加濃度を0.0005 mg/kgとして、3併行で検討した。検討の結果、クロラムフェニコールの回収率は55%、併行精度は16%と低回収率となった。また、マトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は0.93と良好であったことから、低回収率となった原因はマトリックスによるイオン化抑制ではないと判断した。

また、USDA法では、試料量（10.0 g）に対して、抽出溶媒であるリン酸緩衝液の液量（15 mL）が少なく加水分解時に試料と溶液の混和が不十分であった。このため、加水分解が効率的に行われていない可能性がある。更に、酢酸エチル転溶の際には、水層が固化し、酢酸エチル層との間で十分な分配が起きにくい状態となっているため、転溶も十分に行われていない可能が示唆された。以上のことから、USDA法で良好な回収率を得るためには、加水分解条件を含め分析法の大幅な改良が必要であると考えられた。

#### [結論]

クロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体を試料からメタノールで抽出し、グルクロン酸抱合体をβ-グルクロニダーゼで加水分解する。次いで、反応後の溶液に酢酸エチルを加えて転溶した後、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法を開発した。開発した分析法を牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏卵、はちみつ、うなぎ、しじみ、ローヤルゼリー及びローヤルゼリー（乾燥）の10食品に適用した結果、真度および併行精度（RSD%）は、それぞれクロラムフェニコールで、84～109%及び1.6～4.8%、グルクロン酸抱合体でそれぞれ79～104%及び2.8～6.3%と良好な結果が得られた。また、ローヤルゼリー及びローヤルゼリー（乾燥）のブランク試料からクロラムフェニコールと推定されるピークが検出されたが、選択性の目標値を満たしていた。その他の全ての試料ではクロラムフェニコールの定量を妨害するピークは認められなかったことから、選択性は問題ないと判断した。更に、

各食品におけるマトリックス添加標準溶液に対する溶媒標準溶液のピーク面積比は、0.91～1.03であったことから、本法は試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定することが可能と考えられた。また、定量限界として0.0005 mg/kgを設定可能であることが確認された。よって、開発した分析法は、種々の畜水産物中のクロラムフェニコール及びグルクロン酸抱合体を検出限界濃度（0.0005 mg/kg）で精度良く定量することが可能であると考えられた。

[参考文献]

1) Determination and confirmation of chloramphenicol, CLG-CAM.06, United States Department of Agriculture , Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, 2013.

添加回収試験における代表的なクロマトグラム

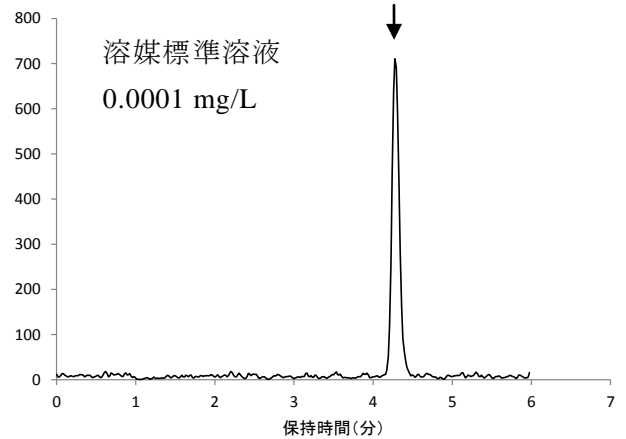
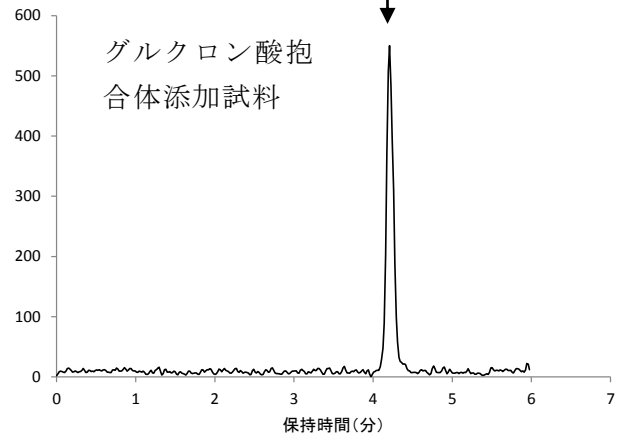
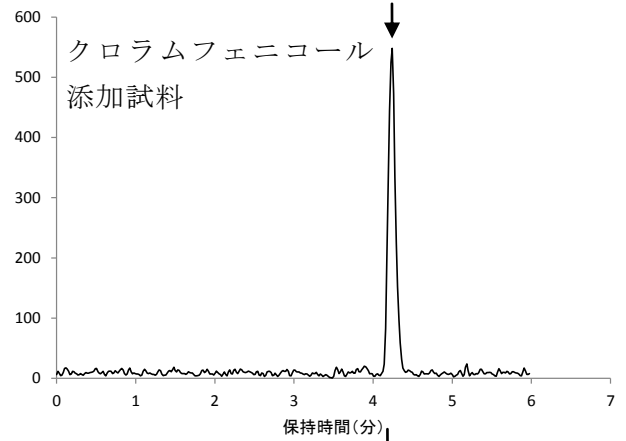
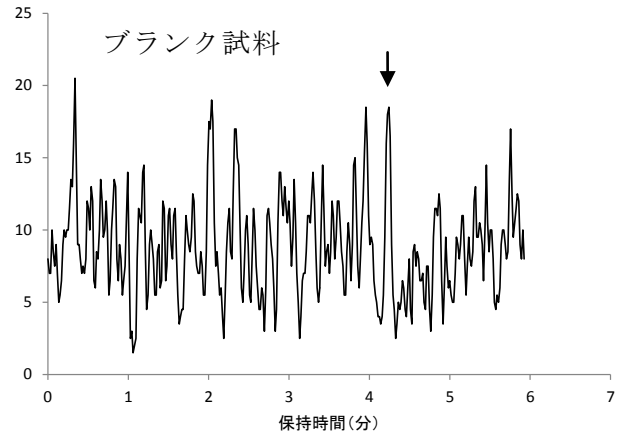
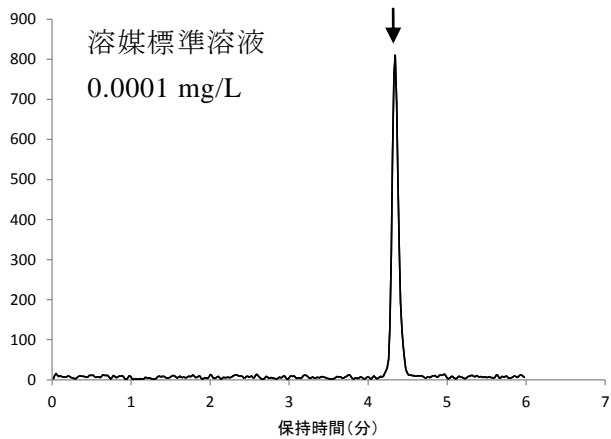
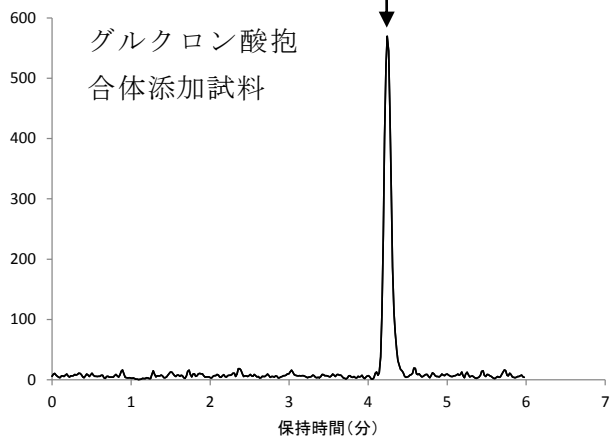
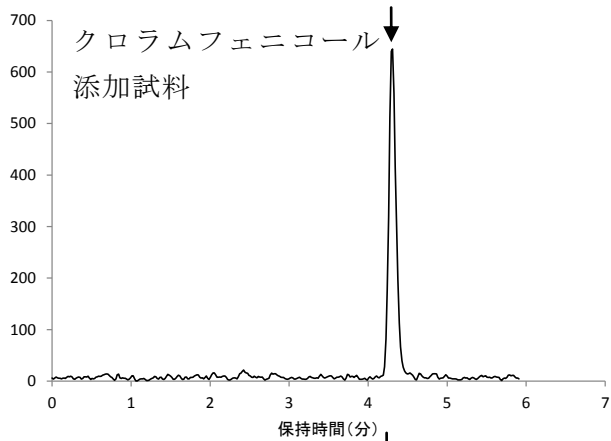
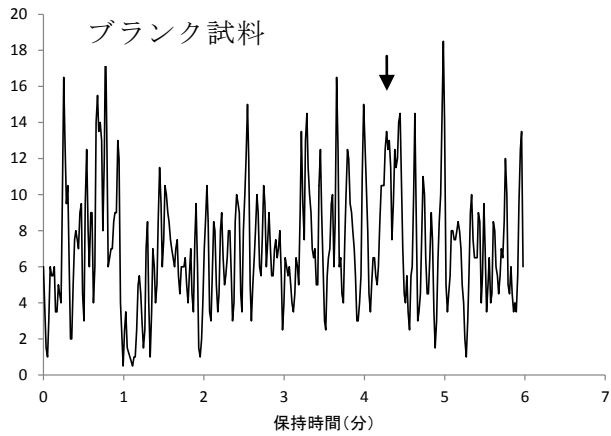


図10. 牛の筋肉のSRMクロマトグラム  
 クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
 添加濃度：0.0005 mg/kg

図11. 牛の脂肪のSRMクロマトグラム  
 クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
 添加濃度：0.0005 mg/kg

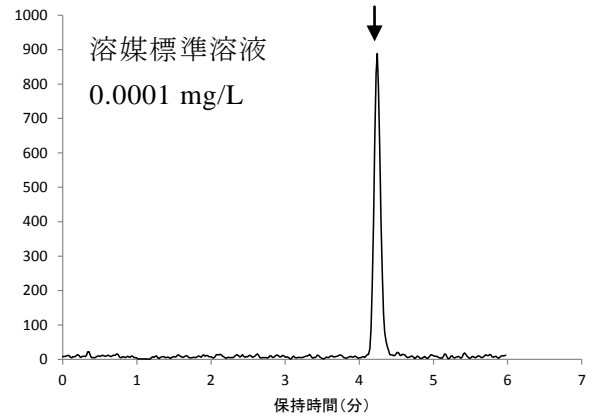
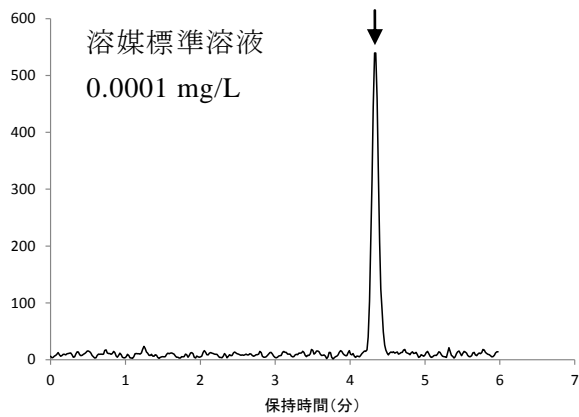
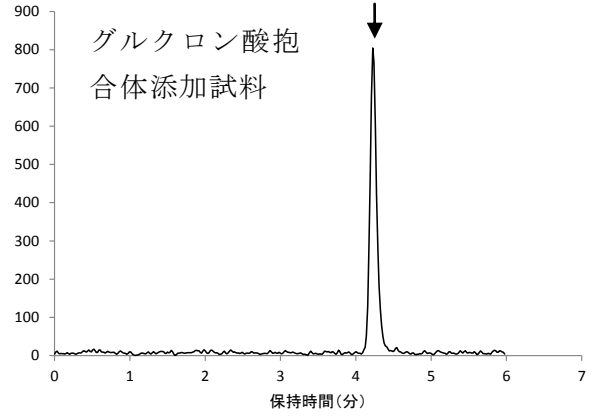
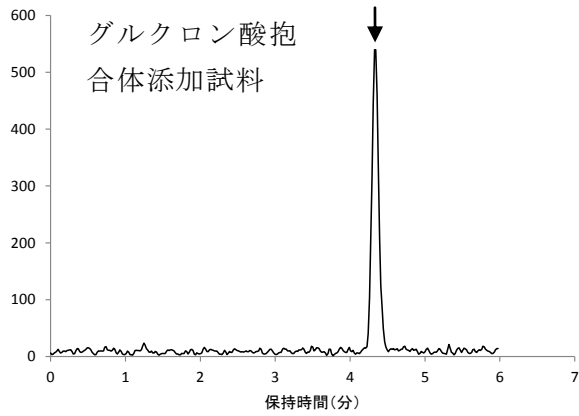
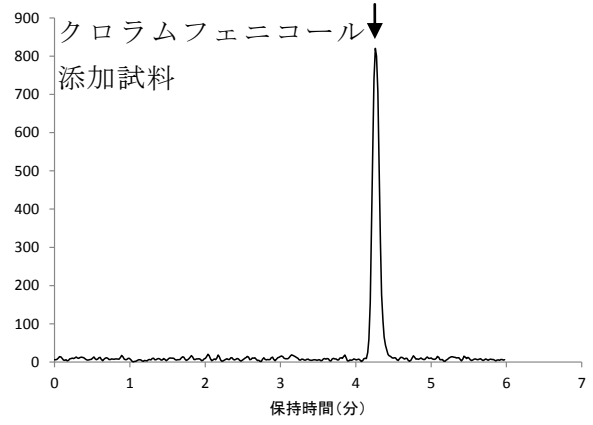
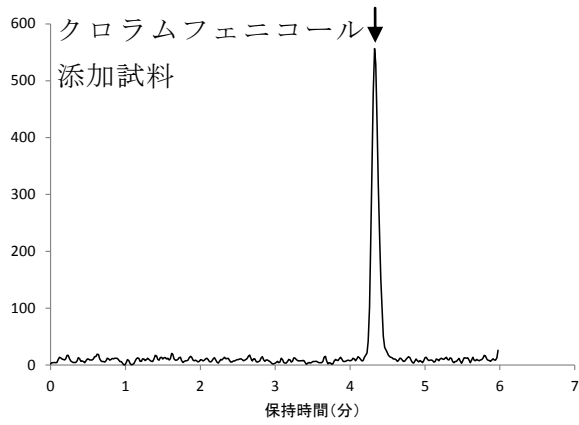
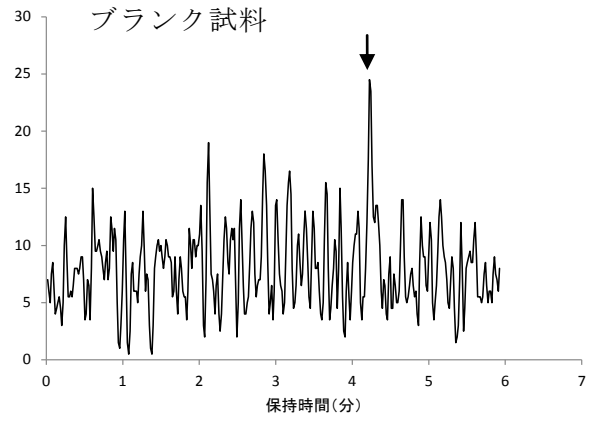
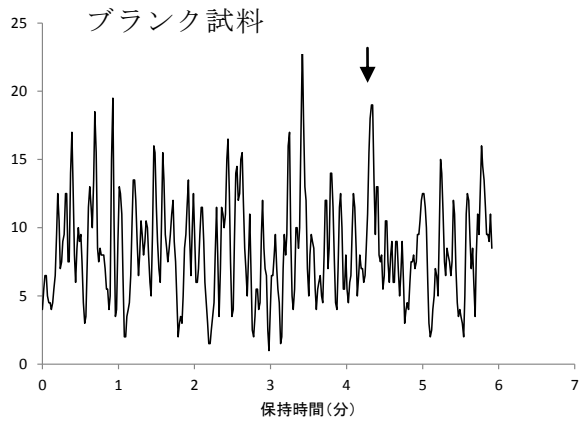


図12. 牛の肝臓のSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度 : 0.0005 mg/kg

図13. 牛の乳のSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度 : 0.0005 mg/kg

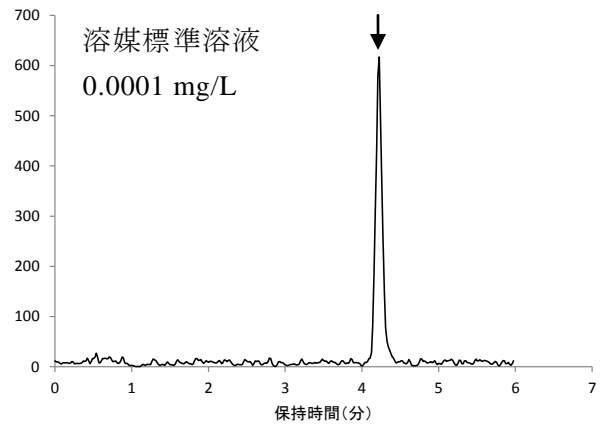
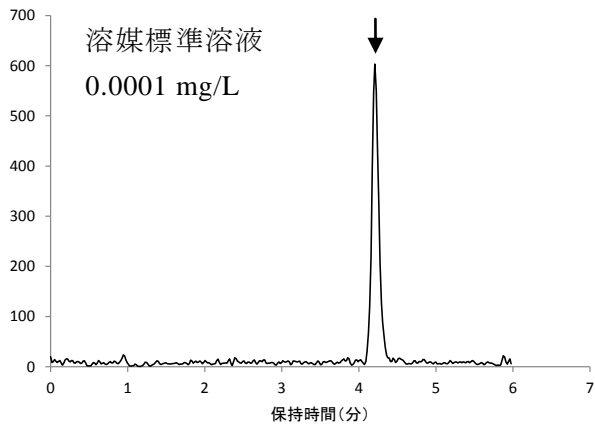
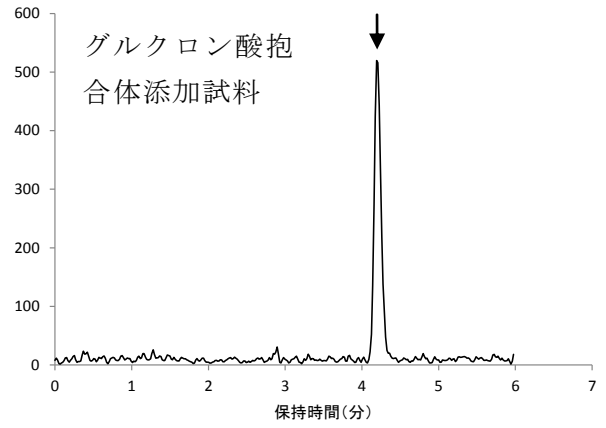
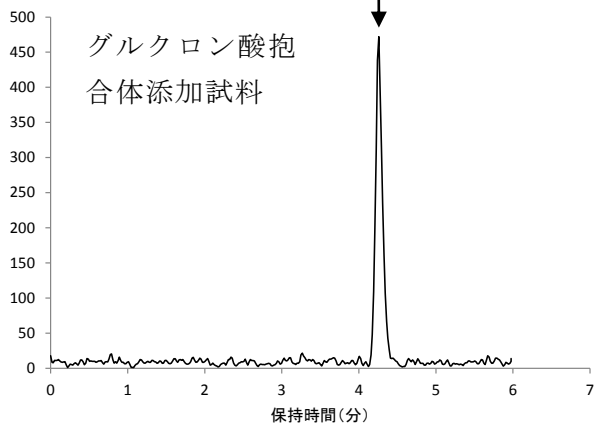
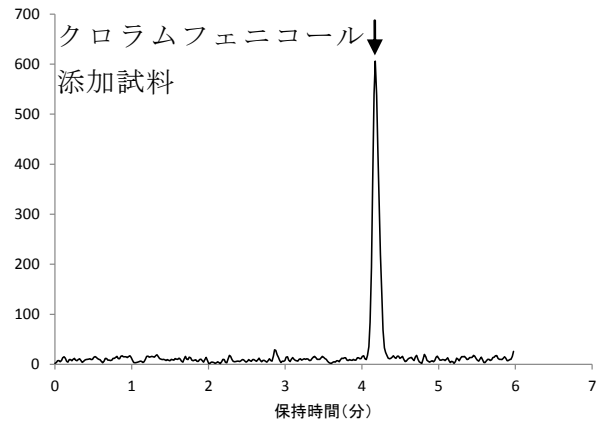
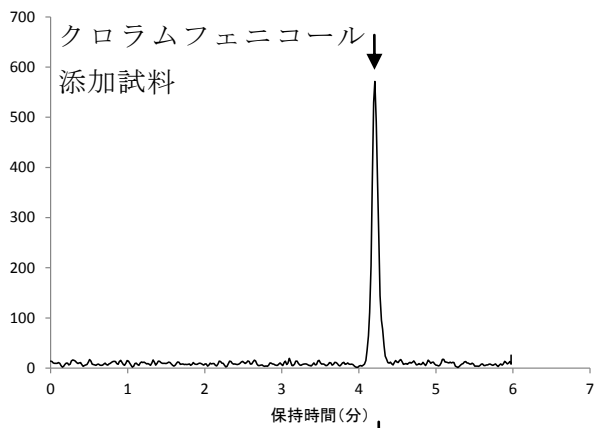
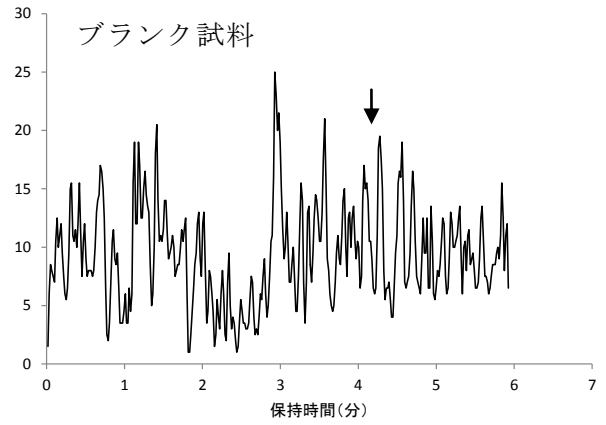
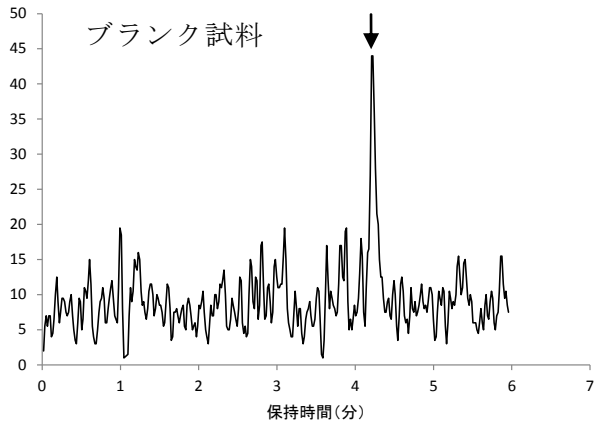


図14. 鶏卵のSRMクロマトグラム  
 クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
 添加濃度 : 0.0005 mg/kg

図15. はちみつのSRMクロマトグラム  
 クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
 添加濃度 : 0.0005 mg/kg

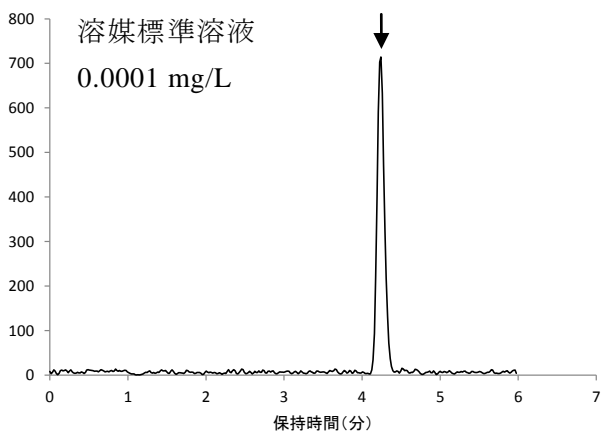
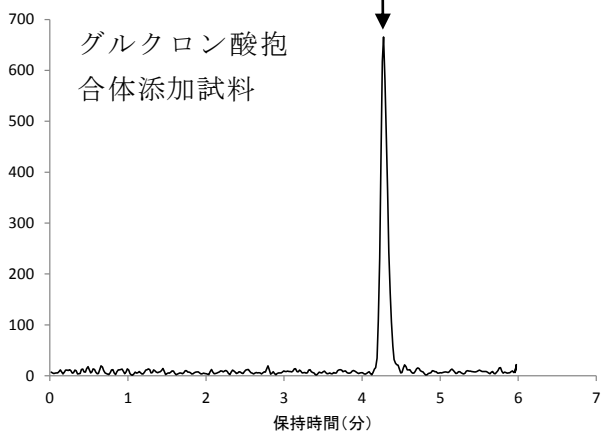
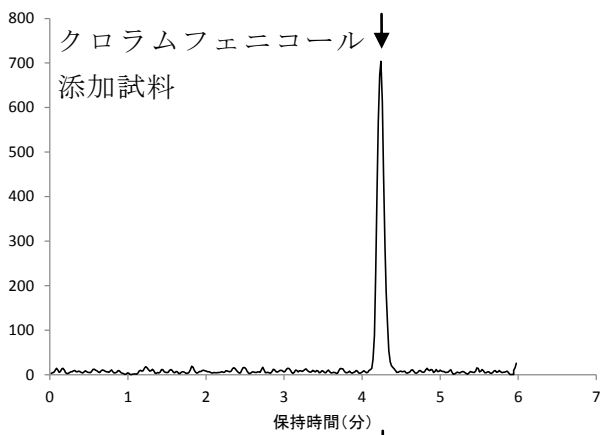
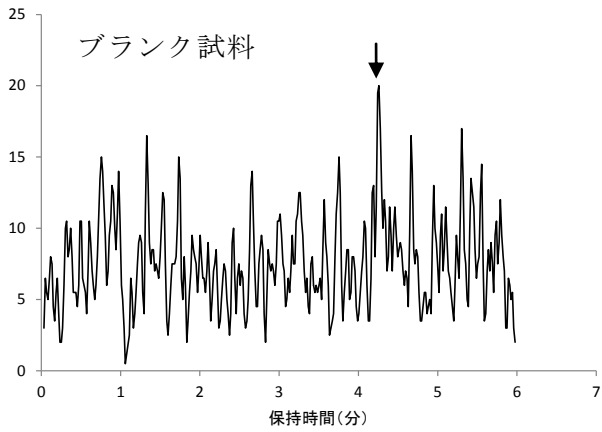


図16. うなぎのSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度：0.0005 mg/kg

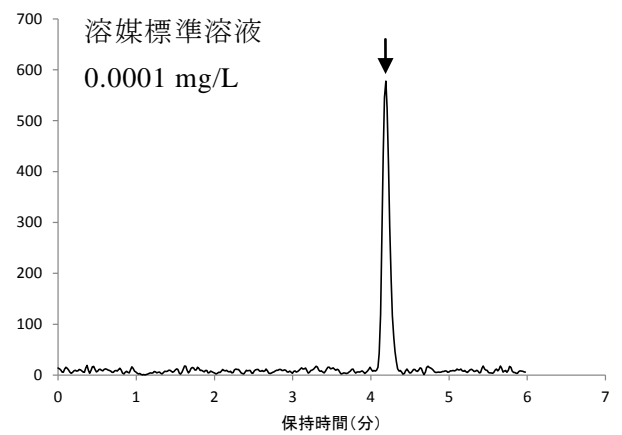
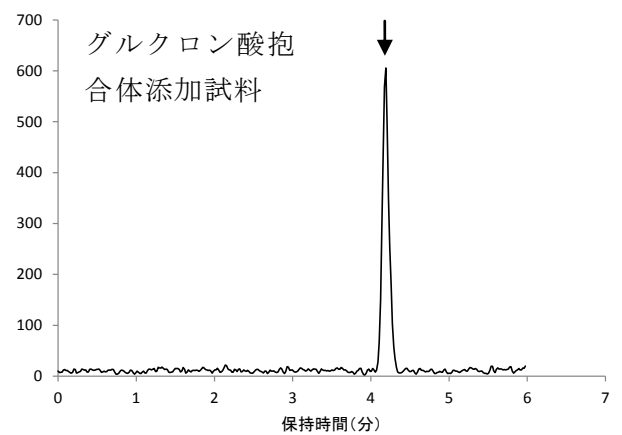
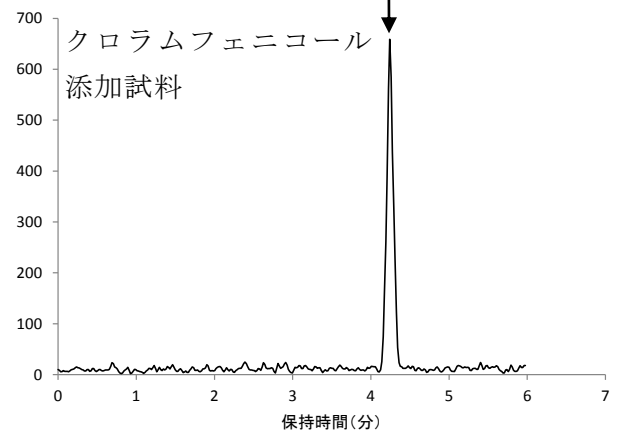
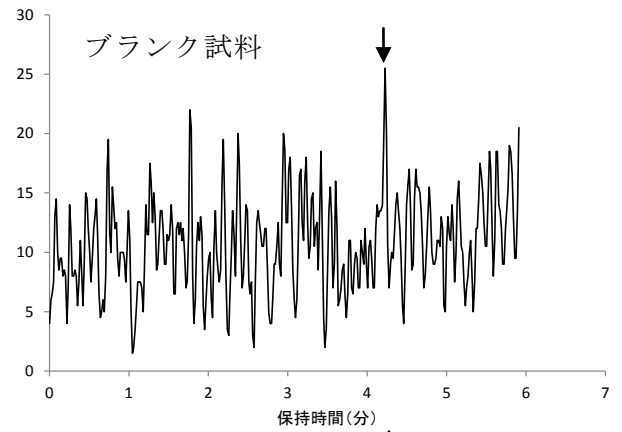


図17. しじみのSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度：0.0005 mg/kg



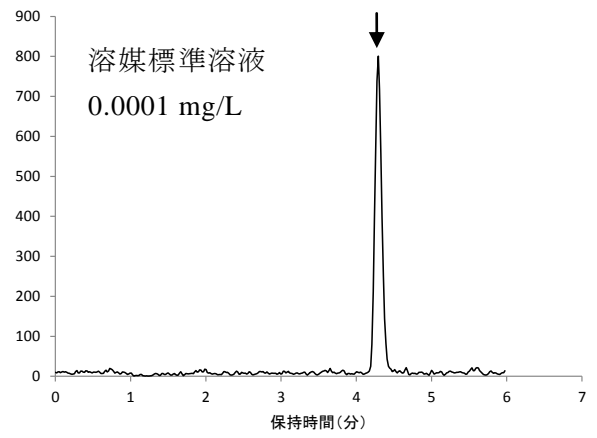
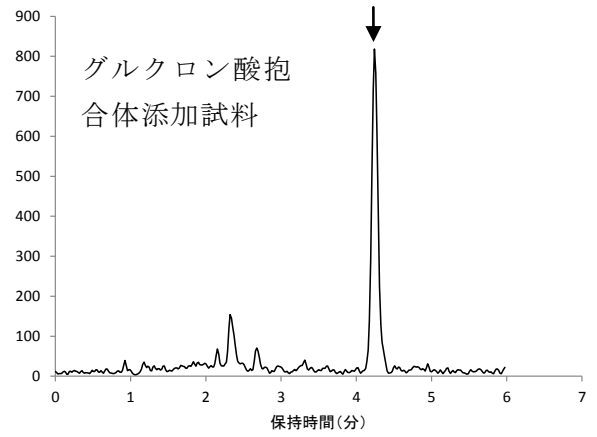
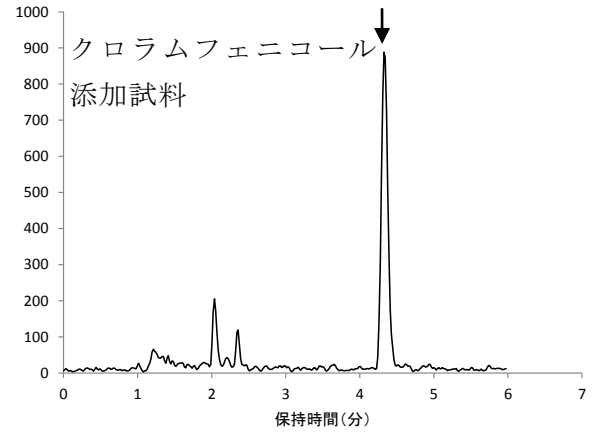
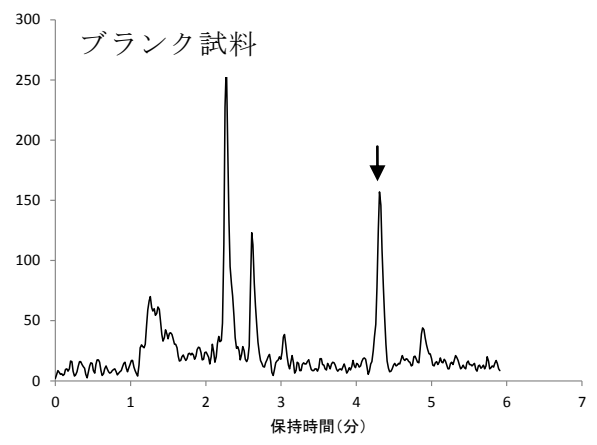
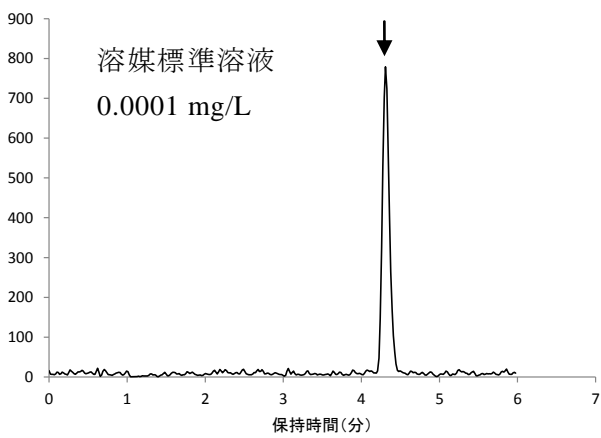
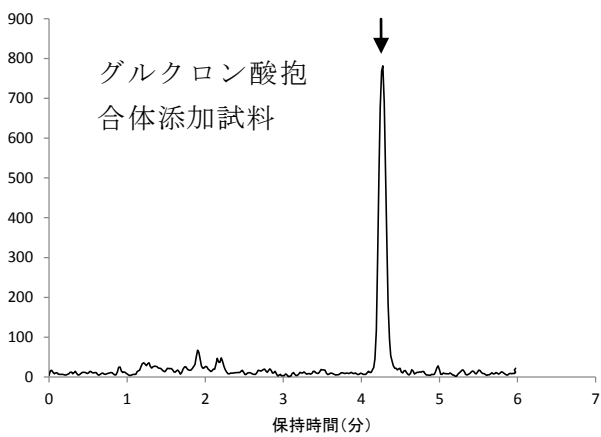
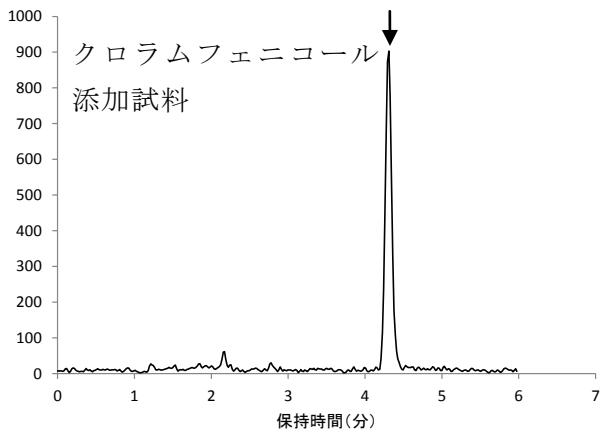
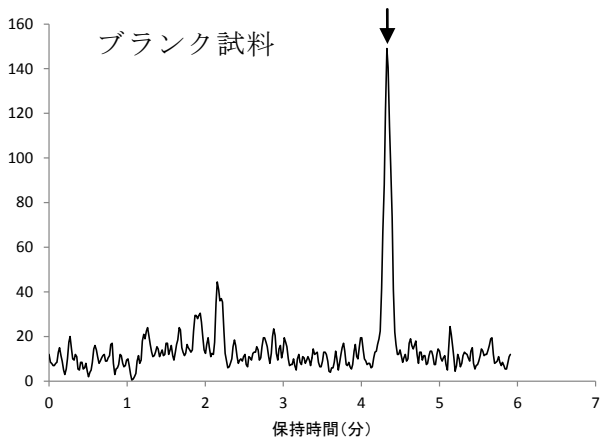


図18. ロイヤルゼリーのSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度：0.0005 mg/kg

図19. ロイヤルゼリー（乾燥）のSRMクロマトグラム  
クロラムフェニコール ( $m/z$  321→152)  
添加濃度：0.0005 mg/kg

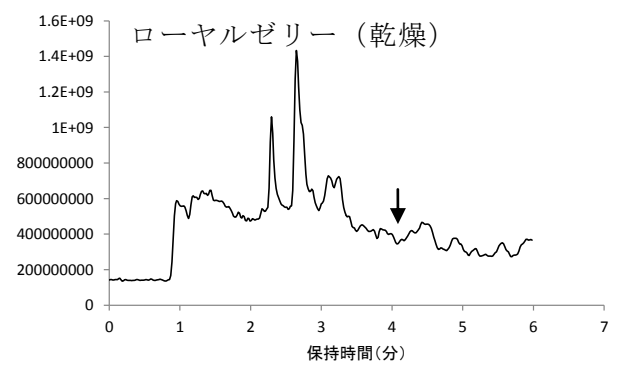
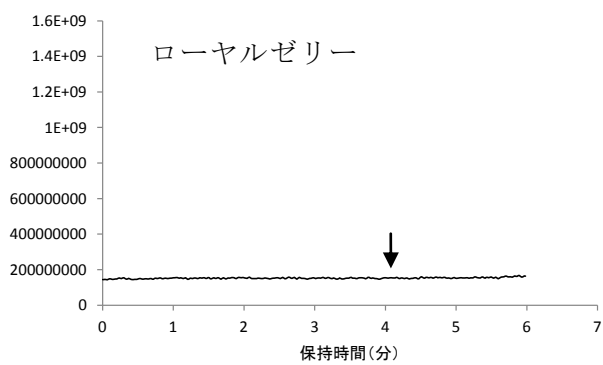
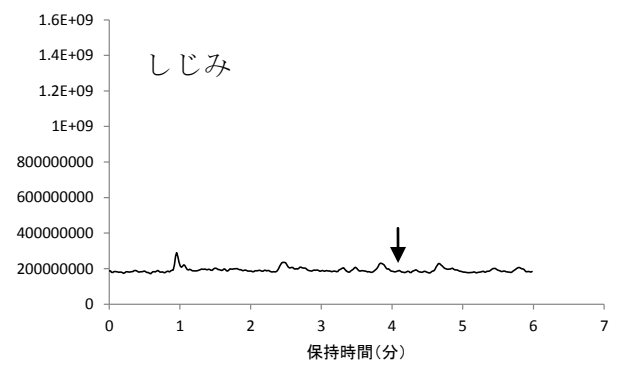
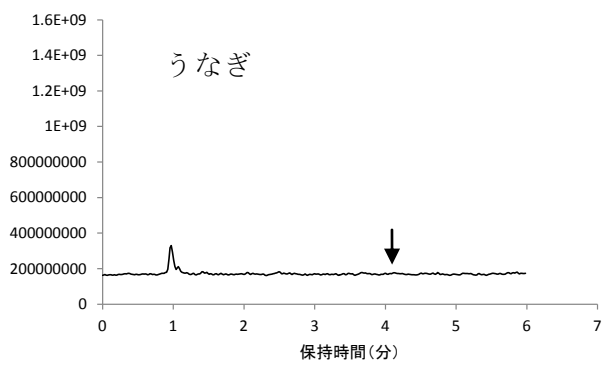
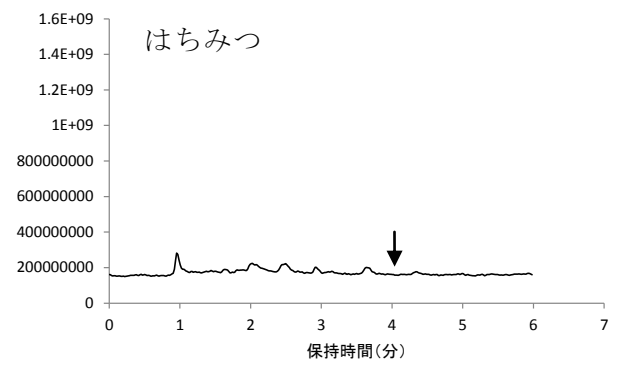
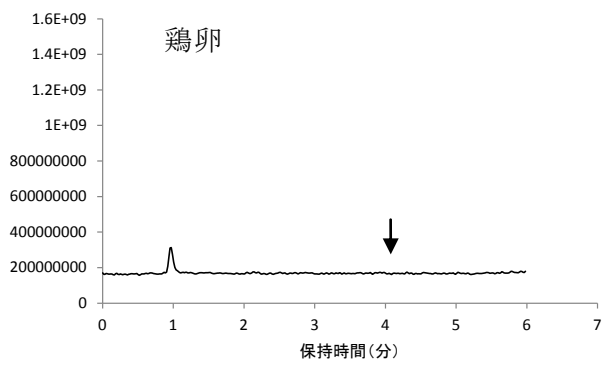
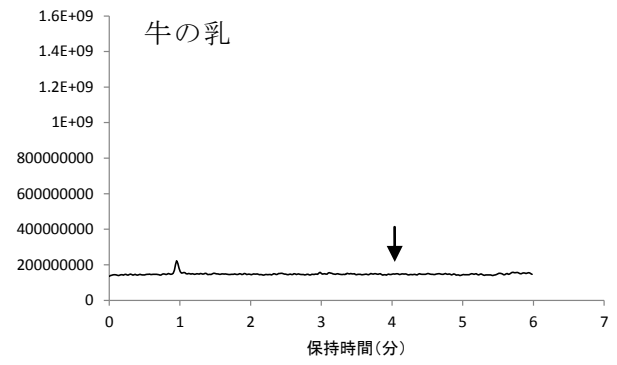
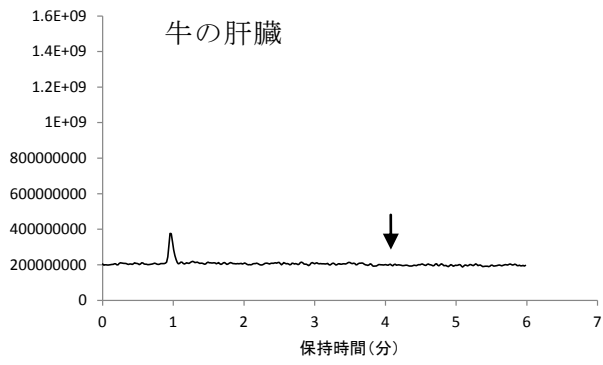
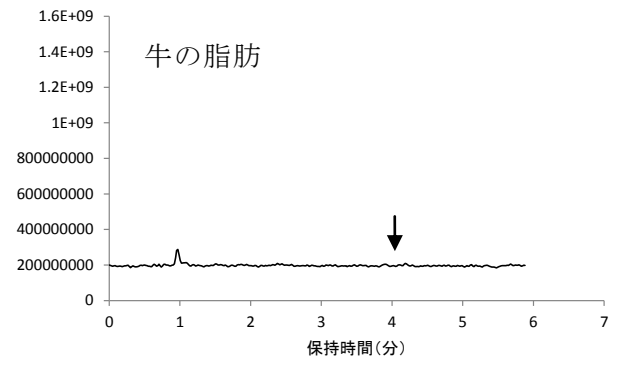
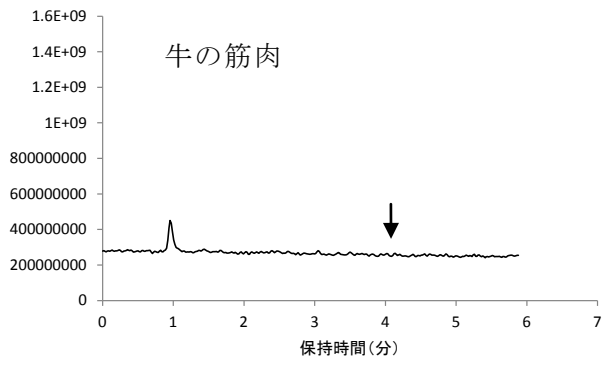


図 20 ブランク試料の代表的なトータルイオンクロマトグラム (スキャン範囲: 50~500 m/z)