

技術レポート**5 飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法（中間報告）**

山本 克己*

1 緒 言

クロラムフェニコールは、*Streptomyces venezuelae* 由来の広範囲スペクトルの抗生物質であり、現在では化学合成法によって工業的な製造が行われている¹⁾。しかしながら、その副作用として、骨髄の造血機能に毒性を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある²⁾ため、我が国では食品衛生法に基づく残留基準において不検出とされる農薬等の成分となっている。また、飼料添加物に指定された抗菌性物質ではないため、飼料安全法に基づく成分規格等省令³⁾により、飼料に含まれてはならないとされている。

平成 18 年度の輸入食品検査において、ベトナム産のイカ（及びその加工品）、エビ（及びその加工品）及びイトヨリから、クロラムフェニコールが検出された。

現在、クロラムフェニコールの定量法は、厚生労働省の告示分析法（液体クロマトグラフ質量分析計による方法）等があり、飼料においては、菅野⁴⁾による脱脂粉乳を対象とした方法（液体クロマトグラフによる方法）が飼料分析基準⁵⁾に記載されている。そこで筆者は、後者の飼料分析基準を参考に、魚粉及び魚粉を含む配合飼料への適用の拡大及び液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いることにより、より低濃度での定量の可否について検討したのでその概要を報告する。

2 実験方法**2.1 試 料**

検討に用いた国産魚粉、輸入魚粉及び配合飼料（ほ乳期子豚用配合飼料及びぎんざけ育成用）は、それぞれ 1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎し、供試試料とした。

2.2 試 薬**1) クロラムフェニコール標準液**

クロラムフェニコール（ $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ）標準品（和光純薬工業製、純度 98.0%）20 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製した（この液 1 mL はクロラムフェニコールとして 0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中に 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 及び 0.1 μg を含有するクロラムフェニコール標準液を調製した。

2) シリカゲル

カラムクロマトグラフ用シリカゲル（Silica gel 60, Merck 製、粒径 63~200 μm ）を、110°C で 2 時間乾燥した。

* 独立行政法人農林水産消費安全技術センター仙台センター

- 3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に用いるアセトニトリル及び水は、高速液体クロマトグラフ用を使用した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

2.3 装置及び器具

- 1) 液体クロマトグラフ：Waters 製 Alliance 2695
- 2) タンデム型質量分析計：Waters 製 Quattro micro API Mass Analyzer
- 3) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4
- 4) ロータリーエバポレーター：シバタインテック製 RE121
- 5) 高速遠心分離器：日立製作所製 SCT15B

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル 100 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙（5 種 A）でろ過した。ろ液 50 mL を 100 mL のなす型フラスコに入れ、50°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。クロロホルム 5 mL を加えて残留物を溶かし、カラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とした。

2) カラムクロマトグラフィー

シリカゲル 5 g をクロロホルムに懸濁させてカラム管（内径 15 mm）に流し込み、液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ、カラムを調製した。試料溶液をカラムに入れ、容器をクロロホルム 5 mL で 2 回洗浄し、洗液を順次カラムに加えた後、1 分間に 1~2 mL の速さで流出させた。次に、クロロホルム-メタノール（97+3）30 mL を加えて同様に流出させ、カラムを洗浄した後、50 mL のなす型フラスコをカラム管の下におき、クロロホルム-メタノール（7+3）30 mL を加え、クロラムフェニコールを溶出させた。溶出液を 50°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固した。アセトニトリル-水（1+1）1.0 mL を正確に加えて残留物を溶かし、10,000 rpm（5,000×g）で 5 分間遠心分離し、上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とした。

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各クロラムフェニコール標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、マルチプルリアクションモニタリング（MRM）クロマトグラムを作成し、ピーク面積又は高さより検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出した。

なお、LC-MS/MS の分析条件を表 1 に示した。

表 1 LC-MS/MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径5 μ m)
カラム槽温度	40°C
溶離液	A:10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
グラジエント	0分 (30%B) →15分 (30%B) →15.1分 (100%B) →25分 (100%B) →25.1分 (30%B) →40分 (30%B)
流速	0.35 mL/min
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ネガティブ
ネブライザーガス	N ₂ (600 L/h)
コーンガス	N ₂ (10 L/h)
キャピラリー電圧	3.0 kV
モニターイオン	m/z 321.2 (プレカーサーイオン), 152.1 (プロダクトイオン)

3 結果及び考察

3.1 タンデム型質量分析計条件の検討

クロラムフェニコール標準液について、今回の測定条件においてスキャンモードで測定し、図1のマススペクトルを得た。この結果から、最もイオン強度の大きい m/z 321.2 ($[M-H]^-$) をプレカーサーイオンとして採用した。

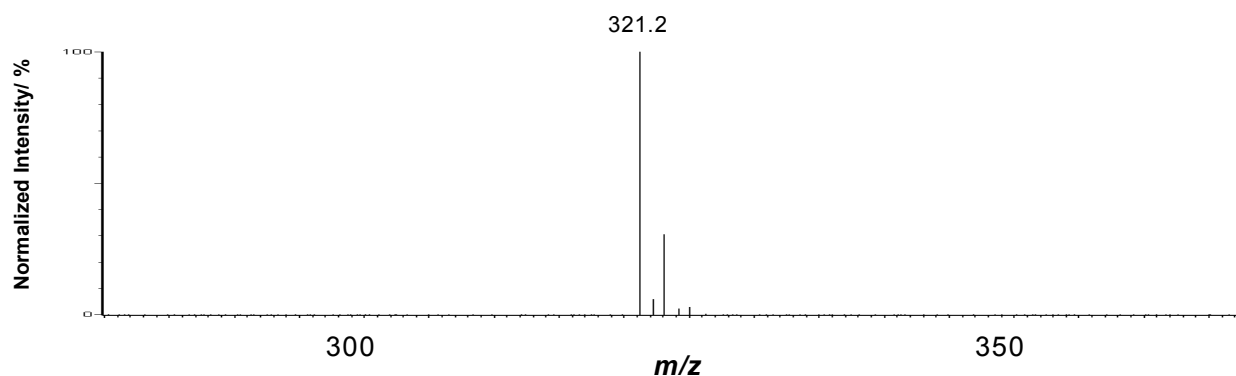


図 1 クロラムフェニコールの MS スペクトル

次に、クロラムフェニコールのプロダクトイオンの MS スペクトルを測定したところ、図2のとおり、主なプロダクトイオンとして m/z 152.1, 176.2, 194.2 及び 257.2 などが得られた。この結果から、最もイオン強度の大きい m/z 152.1 をプロダクトイオンとして採用した。

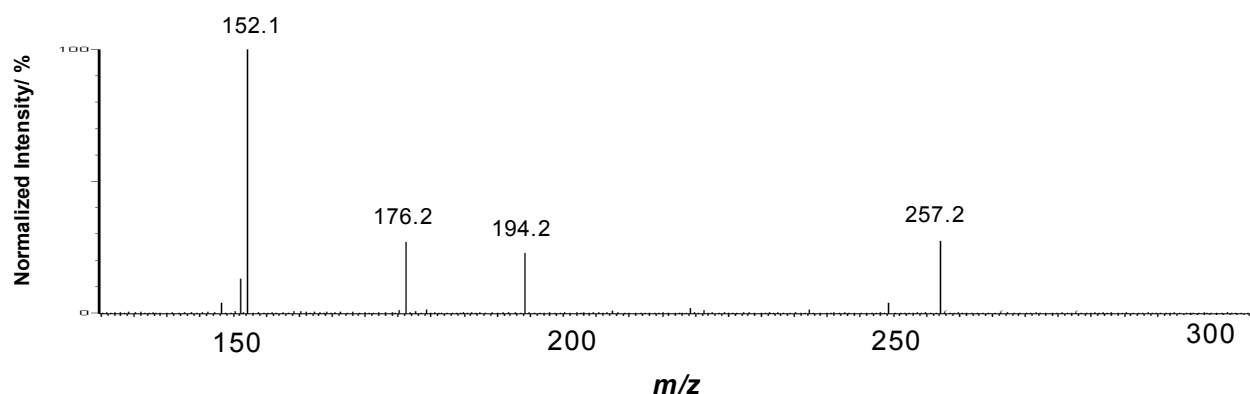


図2 クロラムフェニコールのプロダクトイオンのMSスペクトル

3.2 液体クロマトグラフの測定条件の検討

溶離液として、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3)，水-アセトニトリル (7+3)，10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-メタノール (13+7) 及び水-メタノール (13+7) を検討した。その結果、10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3)，水-アセトニトリル (7+3) において感度が良好であった。両者は、感度及びピーク形状において大きな差は認められなかったが、イオン化効率を考慮し、今回は溶離液を10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル (7+3) とすることにした。

3.3 検量線の作成

2.2 の1)に従って調製した標準液をそれぞれ10 µL ずつ LC-MS/MS に注入し、得られたMRMクロマトグラムからピーク面積又は高さを求めて検量線を作成した。その結果、検量線は0.05~1 ng の範囲で直線性を示した。

3.4 妨害物質の検討

国産魚粉 (2 種類)，輸入魚粉 (2 種類) 及び配合飼料 (ブロイラー肥育後期用，ほ乳期子豚育成用及びぎんざけ育成用) を用い、本法により調製した試料溶液を LC-MS/MS に注入し、定量を妨げるピークの有無を確認したところ、妨害ピークは認められなかった。

3.5 添加回収試験

本法による回収率及び繰返し精度を確認するために添加回収試験を実施した。

魚粉及び配合飼料 (ほ乳期子豚育成用及び養魚用) に、クロラムフェニコールとしてそれぞれ2 及び5 µg/kg 相当量添加し、本法に従って3 回分析を行い、その回収率及び繰返し精度を求めた。

その結果、表2 のとおり、クロラムフェニコールの平均回収率は93.3~113 %，その繰返し精度はRSD として9.1%以下であった。

なお、標準液及び添加回収試験で得られた魚粉におけるMRMクロマトグラムの一例を図3 に示した。

表 2 添加回収試験結果

試料の種類 添加量	(%)							
	国産魚粉		輸入魚粉		ほ乳期子豚育成 用配合飼料		ぎんざけ育成用 配合飼料	
	分析値 ^{a)}	RSD ^{b)}	分析値 ^{a)}	RSD ^{b)}	分析値 ^{a)}	RSD ^{b)}	分析値 ^{a)}	RSD ^{b)}
2 µg/kg	93.3	(8.1)	99.3	(9.1)	102	(1.5)	113	(1.0)
5 µg/kg	108	(3.6)	105	(8.5)	94.8	(6.2)	108	(5.5)

a) $n=3$ の平均回収率

b) 相対標準偏差

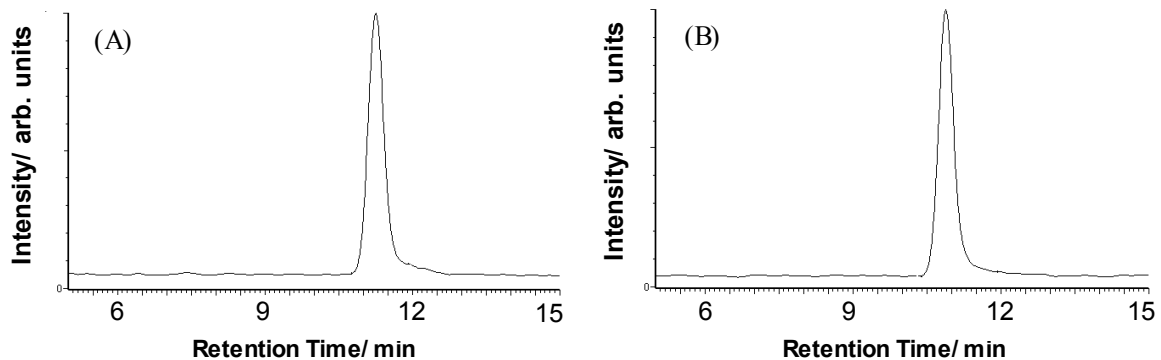


図 3 添加回収試験で得られた MRM クロマトグラムの一例

(A) 標準液 (クロラムフェニコールとして 250 pg 相当量)

(B) 試料溶液 (魚粉, 試料中 5 µg/kg 相当量添加)

3.6 定量下限及び検出下限

本法の定量下限及び検出下限を確認するため、先の 2 µg/kg 相当量の添加回収試験において得られた MRM クロマトグラムにおけるピークの SN 比を求めた。

その結果、得られたピークの SN 比は、魚粉及び配合飼料においていずれも 10 程度であった。このことから、本法における定量下限は、飼料中で 2 µg/kg と考えられた。また、検出下限は、SN 比が 3 となる濃度から、飼料中で 0.6 µg/kg と見積もられた。

4 今後の検討項目

上記のとおり、本法の定量下限は、飼料中で 2 µg/kg であり、検討にあたり目標とした検出感度 (厚生労働省が示している食品の分析法と同等レベル (0.5 µg/kg)) が得られなかった。

このことから、より低濃度の定量が可能となるような LC-MS/MS 分析条件の再検討及び塩素系溶媒を必要としないミニカラム等の導入を視野に入れる必要があると考えられた。

今後は、財団法人日本食品分析センターが検討した分析法⁶⁾を参考に検討を進める予定である。

文 献

- 1) 田中信夫, 中村昭四郎: 抗生物質大要 [第 4 版], 160 (1995).
- 2) Kurylowicz (岡見吉郎訳): 抗生物質論, 154 (1978).

- 3) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和 51 年 7 月 24 日，農林省令第 35 号 (1976).
- 4) 菅野 清：飼料研究報告，29，60 (2004).
- 5) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成20年4月1日，19消安第14729号 (2008).
- 6) (財) 日本食品分析センター：平成 19 年度飼料に含まれるマラカイトグリーン及びロイコマラカイトグリーンの畜産物への残留に関する調査委託事業（飼料中のマラカイトグリーン等の分析法の開発），21 (2008).