

3 脱脂粉乳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

山本 謙吾^{*1}, 大島 慎司^{*2}

Determination of Chloramphenicol in Dried Skim Milk by LC-MS/MS

Kengo YAMAMOTO^{*1} and Shinji OSHIMA^{*2}

(^{*1}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department,

^{*2}Food and Agricultural Materials Inspection Center, Fertilizer and Feed Inspection Department

(Now Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan))

An analytical method was developed to determine chloramphenicol levels in dried skim milk using liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS).

After adding chloramphenicol-d₅ and 100 mL of methanol-1 % metaphosphoric acid solution (3:2 v/v), the sample was homogenized. The extract was filtered and the sample was diluted with water to a final volume of 200 mL. Twenty mL of this solution was concentrated and purified with a divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer column (Oasis HLB from Waters; Milford, MA, U.S.), and analyzed by LC-ESI-MS/MS. The LC separation was carried out with an ODS column (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 2.1 mm i.d.×150 mm, 5 μm from Agilent Technologies Inc.; Santa Clara, CA, U.S.) using 10 mmol/L of ammonium formate solution-acetonitrile (7:3 v/v) as the mobile phase. The MS/MS analysis was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode.

Spike tests were conducted on four kinds of dried skim milk spiked with 1 or 25 μg/kg of chloramphenicol and two kinds of dried skim milk spiked with 0.5 μg/kg of chloramphenicol. The mean recoveries ranged from 93.8 to 102 % with relative standard deviations of repeatability of not more than 12 %.

A collaborative study was conducted in 12 laboratories on two kinds of dried skim milk spiked with chloramphenicol at 5 μg/kg. The mean recoveries of chloramphenicol ranged from 105 to 106 %, with repeatability and reproducibility in terms of relative standard deviations (RSD_r and RSD_R) of 4.9 %, 9.9 %, respectively and Horwitz ratio (HorRat) of 0.79.

This method was validated and established for use in the inspection of dried skim milk for animal feed for chloramphenicol.

Key words: chloramphenicol ; liquid chromatograph-electrospray ionization-tandem mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS) ; dried skim milk

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課

キーワード：クロラムフェニコール；液体クロマトグラフ-エレクトロスプレーイオン化-タンデム型質量分析計；脱脂粉乳

1 緒 言

クロラムフェニコール（以下「CP」という。）は、化学合成によって工業的製造が行われている広範囲な抗菌スペクトルを有する抗生物質である¹⁻⁴。副作用として、骨髄の造血機能に作用を及ぼし、再生不良性貧血等を誘発する可能性がある¹⁻⁴。

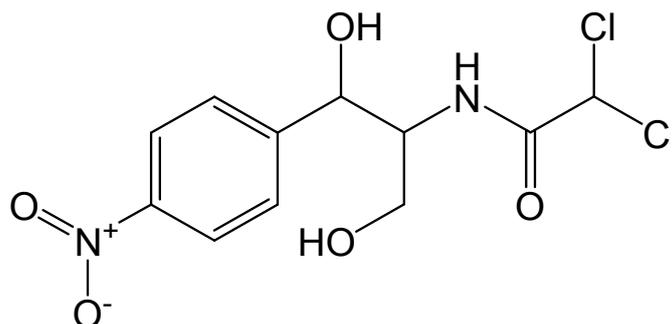
我が国では、CPは飼料添加物に指定された抗生物質ではないため、飼料安全法に基づく成分規格等省令⁵の規定により、飼料に含まれてはならないとされている。また、食品一般の成分規格において含有されてはならない成分として規定されている⁶。

CPの定量法は、飼料では、脱脂粉乳を対象とした方法⁷及び魚粉及び配合飼料（脱脂粉乳を主原料とするものを除く。）を対象とした方法⁸が飼料分析基準⁹に記載されている。また、この他に、液体クロマトグラフ質量分析計を用いた厚生労働省の告示試験法⁶等が示されている。

脱脂粉乳を対象とした方法は抽出及び精製操作にクロロホルムを用いており、環境面及び分析者の安全性確保等の観点から、クロロホルムを用いない方法が望まれている。また、CPは飼料に含まれてはならない成分であり、脱脂粉乳を対象としては従来法の定量下限である5 µg/kgより低濃度での定量が求められている。

今回、厚生労働省の告示試験法⁶を参考として、脱脂粉乳を対象に、クロロホルムを用いない高感度分析法の開発を目的とし、液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（以下「LC-MS/MS」という。）を用いた方法を検討したので、その概要を報告する。

なお、CPの構造式をFig. 1に示した。



Chloramphenicol (CP)

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

C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅ MW: 323.13

CAS No.: 56-75-7

Fig. 1 Chemical structure of chloramphenicol

2 実験方法

2.1 試料

脱脂粉乳（米国産，カナダ産，ニュージーランド産及びフランス産）をそれぞれ 1 mm の網ふるいにかけて，通過したものを，供試試料とした。

2.2 試薬

1) CP 標準液

CP 標準品（和光純薬工業製，純度 98.0 %）10 mg を正確に量って 100 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 CP 標準原液を調製した（この液 1 mL は，CP として 0.1 mg を含有する．）。

更に，標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中に CP として 1 μ g を含有する標準液を調製した。

2) 安定同位体元素標識 CP (CP-d₅) 内標準原液

CP-d₅ 標準原液（Cambrige Isotope Laboratories 製，100 μ g/mL アセトニトリル溶液，D₅ 98 %）1 mL を 100 mL の全量フラスコに正確に入れ，標線までアセトニトリルを加えて CP-d₅ 内標準原液を調製した（この液 1 mL 中は CP-d₅ として 1 μ g を含有する．）。

3) 検量線作成用標準液

内標準原液の一定量をアセトニトリルで正確に希釈し，1 mL 中に CP-d₅ として 250 ng を含有する内標準液を調製した。更に，CP 標準液及び先の内標準液の一定量を水-アセトニトリル (7+3) で正確に希釈し，1 mL 中に CP として 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 及び 20 ng を含有し，かつ CP-d₅ として 2.5 ng を含有する検量線作成用標準液を調製した。

4) 添加用内標準液

使用に際して内標準原液の一定量をメタノールで正確に希釈し，1 mL 中に CP-d₅ として 25 ng を含有する添加用内標準液を調製した。

5) ケイソウ土

ハイフロスーパーセル（Celite 製）を使用した。

6) 水，メタノール及びアセトニトリルは，液体クロマトグラフ用を用いた。メタリン酸は，関東化学製（鹿特級，純度 37.0 %以上）のものを用いた。

2.3 装置及び器具

1) LC-MS/MS :

LC 部 : Agilent Technologies 製 1200 Series

MS 部 : Agilent Technologies 製 Agilent 6410 Triple Quad LC/MS

2) ホモジナイザー : Hsiangtai 製 HG-200 (使用時回転数 10,000 rpm)

3) ロータリーエバポレーター : BÜCHI 製 R-200

4) 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 (以下「ミニカラム」という。) : Waters 製 Oasis HLB (充てん剤量 : 60 mg, リザーバー容量 : 3 mL)

5) メンブランフィルター : 東洋濾紙製 DISMIC-13HP (孔径 0.45 μ m, 直径 13 mm, 親水性 PTFE)

2.4 定量方法

1) 抽出

分析試料 5 g を正確に量って 100 mL の共栓遠心沈殿管に入れ、添加用内標準液 1 mL を正確に加えた。更にメタノール-1 w/v%メタリン酸溶液 (3+2) 100 mL を加え、ホモジナイザーを用いて 10,000 rpm で 1 分間かき混ぜて抽出した。200 mL の全量フラスコをブフナー漏斗の下に置き、抽出液をあらかじめケイソウ土を 2 mm の厚さにのせたろ紙 (5 種 B) で吸引ろ過した。先の共栓遠心沈殿管及び残さを順次水 50 mL で洗浄し、同様に吸引ろ過し、更に全量フラスコの標線まで水を加えた。この液 20 mL を 100 mL のなす形フラスコに正確に入れ、40 °C 以下の水浴で約 10 mL まで減圧濃縮し、ミニカラム処理に供する試料溶液とした。

2) ミニカラム処理

ミニカラムに 10 mL のリザーバーを連結し、メタノール 5 mL 及び水 5 mL で順次洗浄した。試料溶液をミニカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコを水 5 mL ずつで 2 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え、液面が充てん剤の上端に達するまで流出させた。更に水 10 mL をミニカラムに加え同様に流出させた。

50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、メタノール 10 mL をミニカラムに加えて CP を溶出させた。溶出液を 40 °C 以下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。

水-アセトニトリル (7+3) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブランフィルターでろ過し、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

試料溶液及び各検量線作成用標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し、Table 1 及び Table 2 の測定条件に従って選択反応検出 (以下「SRM」という。) クロマトグラムを得た。

Table 1 Operating conditions of LC-MS/MS for analysing chloramphenicol

Column	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm i.d.×150 mm, 5 µm)
Mobile phase	10 mmol/L ammonium formate solution-acetonitrile (7:3)(1 min)→9 min→(1:19) (10 min)→0.1 min→(7:3)(10 min)
Flow rate	0.18 mL/min
Column temperature	40 °C
Ionization	Electrospray ionization (ESI)
Mode	Negative
Nebulizer gas	N ₂ (340 kPa)
Drying gas temperature	N ₂ (350 °C)
Capillary voltage	4 kV

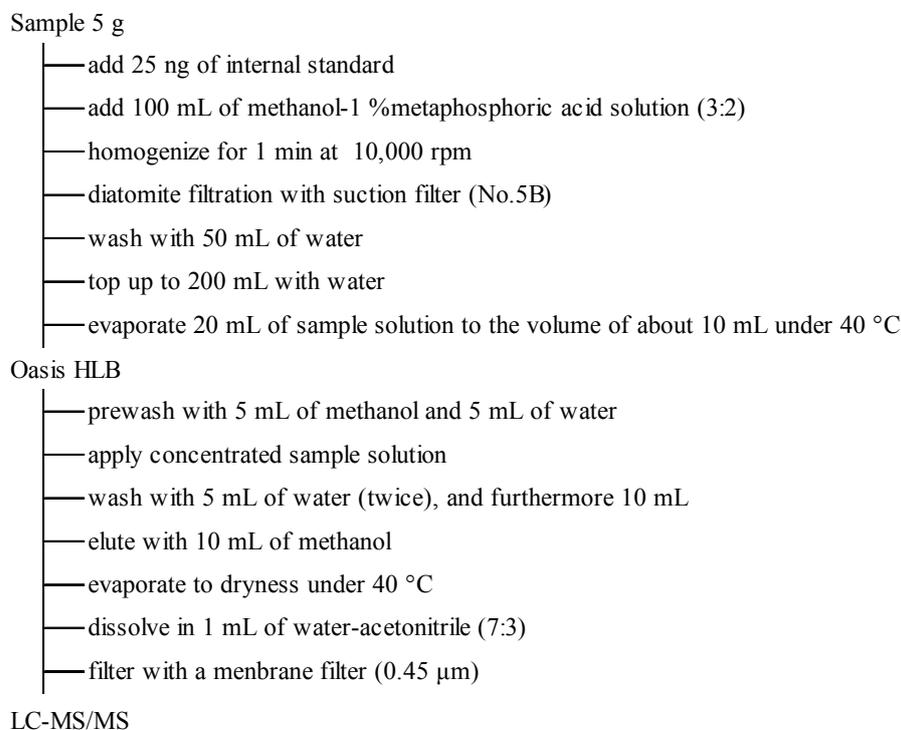
Table 2 MS/MS Parameters

Target ion	Precursor (<i>m/z</i>)	Product (<i>m/z</i>)	Qualifier (<i>m/z</i>)	Fragmentor voltage (V)	Collision energy (eV)
Chloramphenicol	321	152	—	100	10
		—	257	100	5
CP-d ₅	326	157	—	100	15

4) 計 算

得られた SRM 選択反応検出クロマトグラムから CP 及び CP-d₅ のピーク面積を求めて内標準法により検量線を作成し、試料中の CP 量を算出した。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for chloramphenicol in dried skim milk

3 結果及び考察

3.1 検量線法と内標準法の検討

CP の分析法について、厚生労働省の告示試験法⁶⁾では検量線法を採用しているが、飼料分析基準に記載されている LC-MS/MS による魚粉及び配合飼料（脱脂粉乳を主原料とするものを除く。）を対象とした分析法⁹⁾では内標準法を採用している。そこで本法における内標準法の必要性について検討した。

2.1 で調製した脱脂粉乳に CP として 1 µg/kg 相当量を添加した試料を用いて、本法に従って 3 点併行分析を実施し検量線法及び内標準法におけるそれぞれの CP の回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 3 のとおりであり、検量線法では平均回収率 147 及び 144 %，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD_r) として 4.5 及び 1.8 %であった。内標準法では平均回収率 99.6 及び 102 %，その繰返し精度は、 RSD_r として 3.1 及び 1.0 %であった。

このことから、検量線法ではみかけ上の回収率が高くなり正確な定量が困難であったが、内標準法では良好な結果が得られた。よって、本法では内標準法を採用することにした。

Table 3 Recoveries of chloramphenicol by external and internal standard method

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Kind of sample (Country of origin)	External standard method		Internal standard method	
		Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)	Recovery ^{a)} (%)	RSD_r ^{b)} (%)
1	Dried skim milk (NZ)	147	4.5	99.6	3.1
	Dried skim milk (France)	144	1.8	102	1.0

a) Mean($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.2 検量線の作成

2.2 の 3) に従って調製した検量線作成用標準液各 10 μL を LC-MS/MS に注入し、得られた SRM クロマトグラムから CP 及び CP- d_5 のピーク面積比を求めて検量線を作成した。その結果、検量線は Fig. 2 のとおり、CP として 0.1~20 ng/mL (注入量として 1~200 pg) の範囲で直線性を示した。

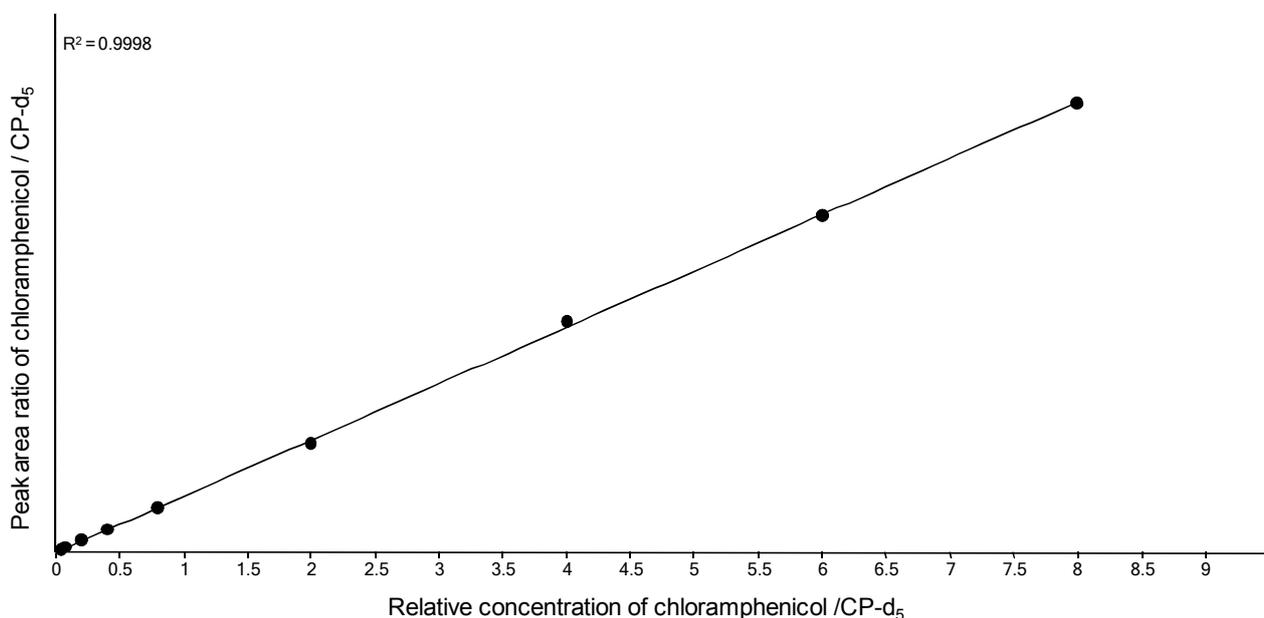


Fig. 2 Calibration curve of chloramphenicol

3.3 ミニカラムの溶出画分の検討

CP についてジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムからの溶出画分の検

討を行った。

2.4 の 1) に従って脱脂粉乳（米国产）から抽出した抽出液に，CP として 10 ng 相当量添加し，2.4 の 2) に従ってミニカラム処理を行った。メタノールを溶出液としてミニカラムからの各溶出画分をそれぞれなす形フラスコに分取した。以下，本法に従い，各溶出画分中の CP 量を算出し，溶出画分を確認した。

その結果は Table 4 のとおりであり，CP は，メタノール 0~5 mL の画分に溶出し，水での洗浄液及び 5 mL 以降のメタノール画分には溶出されなかった。以上の結果から，厚生労働省の告示試験法⁶⁾と同様にメタノール 10 mL で溶出することとした。

Table 4 Elution pattern from Oasis HLB

Fraction volume (mL)	Water		Methanol	
	20	0~5	~10	
Area ratio of chloramphenicol ^{a)} (%)	0	100	0	
Area ratio of CP-d ₅ (%)	0	100	0	

a) Ratio to area of methanol 0~5 mL

3.4 妨害物質の検討

脱脂粉乳 9 点（米国产 3 点，フランス産 1 点，オーストラリア産 1 点，ニュージーランド産 1 点，カナダ産 3 点）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。その結果，定量を妨害するピークは検出されなかった。

なお，妨害物質の検討で得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

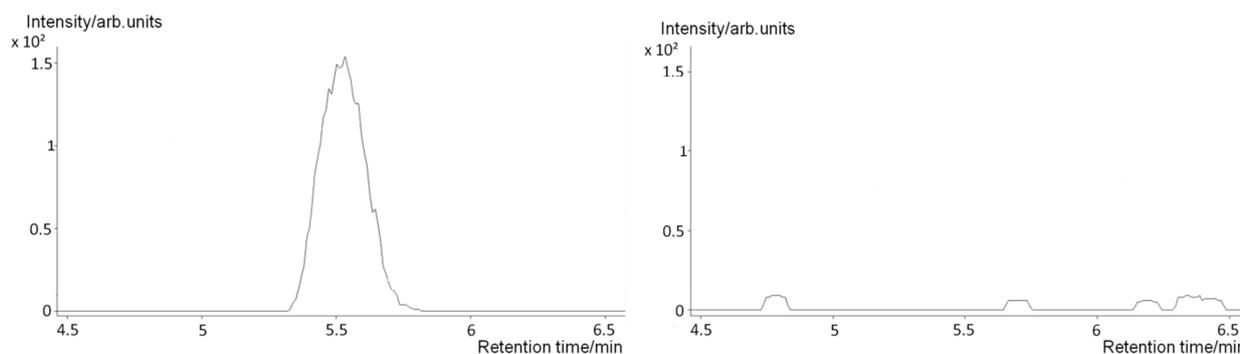


Fig. 3 SRM chromatograms of standard and blank solution

LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2.

(Left) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 2 pg.)

(Right) Sample solution of dried skim milk (not spiked)

3.5 汚染試料への適用

CP に汚染された脱脂粉乳を入手することが困難であったため，次のようにして疑似汚染試料を調製し，本法の汚染試料への適用について検討を行った。

i: 脱脂粉乳 100 g に CP として 10 µg/kg 相当量となるように CP 標準液を添加した後，溶媒

が十分に揮発するまで3日間静置，乾燥した。

ii : ラボミルサーで粉碎してよく混合し，供試試料とした。調製した疑似汚染試料について，本法に従って3点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 5 のとおりであり，平均回収率は 101 及び 105 %，その繰返し精度は RSD_r として 12 及び 9.9 %であった。このことから，CP に汚染された試料に対し，本法を適用することに問題はないと推察された。

Table 5 Recoveries of chloramphenicol from pseudo-contaminated dried skim milk

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (NZ)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
10	101	12	105	9.9

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.6 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添加回収試験を実施した。

脱脂粉乳に CP としてそれぞれ 1 及び 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて，本法に従って3点併行分析を実施し，回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果は Table 6 のとおりであり，CP の平均回収率は 94.2~102 %，その繰返し精度は RSD_r として 6.2 %以下であった。

なお，添加回収試験で得られた SRM クロマトグラムの一例を Fig. 4 に示した。

Table 6 Recoveries of chloramphenicol from spiked dried skim milk

Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (Canada)		Dried skim milk (NZ)		Dried skim milk (France)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
25	95.4	2.7	95.2	3.4	99.4	5.8	96.4	1.2
1	94.2	6.2	98.7	3.7	99.6	3.1	102	1.0

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

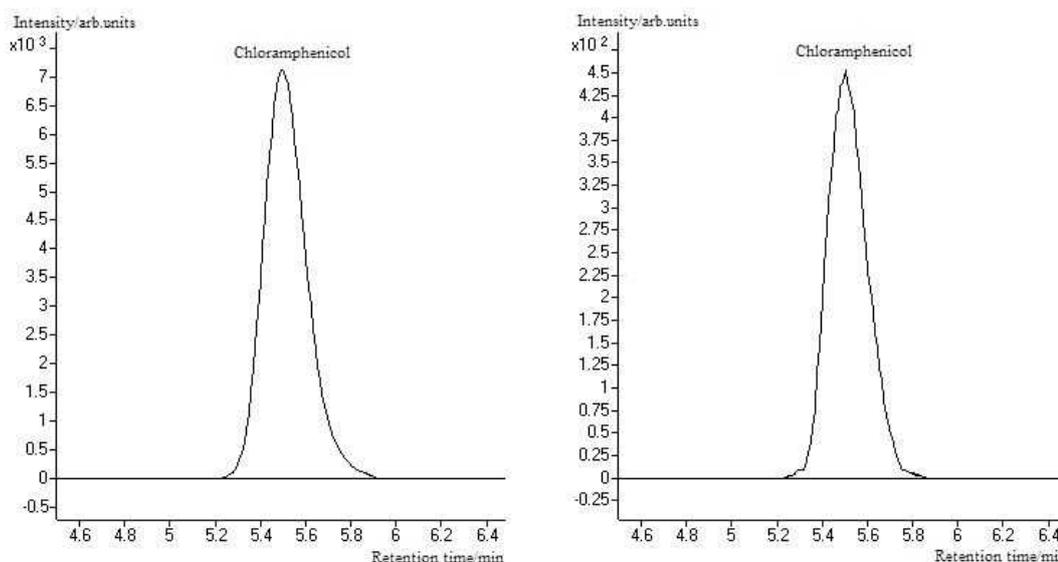


Fig. 4 SRM chromatograms of chloramphenicol

LC-MS/MS conditions are shown in Table 1 and 2.

(Left) Standard solution (The amount of chloramphenicol is 0.1 ng.)

(Right) Sample solution of dried skim milk spiked at 1 µg/kg

3.7 検出下限

本法の検出下限（CP は、飼料に含まれてはならない抗菌性物質であるため、定量下限相当の精度を有する濃度をもって検出下限と表す。）を確認するため、脱脂粉乳に CP を添加し、添加回収試験により得られるピークの SN 比が 10 となる濃度を求めた。

得られたピークの SN 比が 10 以上となる濃度は 0.5 µg/kg であった。

確認のため、2 種類の脱脂粉乳に CP として 0.5 µg/kg 相当量を添加した試料について、本法に従って 3 点併行分析を実施した。

その結果は Table 7 のとおりであり、2 種類の脱脂粉乳において平均回収率は 99.3 及び 93.8 %、繰返し精度は RSD_r として 7.3 及び 12 %であった。

以上の結果から、本法による脱脂粉乳中の CP の検出下限は 0.5 µg/kg と推察された。

Table 7 Recoveries of chloramphenicol at the level of limit of detection

Spiked level (µg/kg)	Dried skim milk (USA)		Dried skim milk (France)	
	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}	Recovery ^{a)}	RSD_r ^{b)}
	(%)	(%)	(%)	(%)
0.5	99.3	7.3	93.8	12

a) Mean ($n=3$)

b) Relative standard deviation of repeatability

3.8 共同試験

本法の室間再現精度を調査するため、共通試料による共同試験を実施した。

フランス産脱脂粉乳及びニュージーランド産脱脂粉乳に CP として 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量 (1 mL 中に 25 μg を含有する標準液 1 mL 添加) を添加した試料を用い、協同飼料株式会社研究所, 日本ウォーターズ株式会社, 社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター, 財団法人日本食品分析センター彩都研究所, 日本ハム株式会社中央研究所, 財団法人マイコトキシン検査協会, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 同札幌センター, 同仙台センター, 同名古屋センター, 同神戸センター及び同福岡センター (計 12 試験室) において, 本法に従い共同試験を実施した。結果の報告があった 12 試験室のうち, 1 試験室において指示の方法の逸脱が認められたため, 当該試験室の報告値は異常値として除外した。残りの 11 試験室について, IUPAC のプロトコール¹⁰⁾に従い, Cochran 検定, 外れ値 1 個の Grubbs 検定及び外れ値 2 個の Grubbs 検定を行った後, 平均回収率, 繰返し精度 (RSD_r) 及び室間再現精度 (RSD_R) を算出した。得られた RSD_R から, 修正 Horwitz 式を用いて HorRat を求めた。

結果を Table 8 に示した。棄却検定によりいずれの試料においても外れ値とされるデータは認められなかった。脱脂粉乳 (フランス産) について, 平均回収率は 106 %, RSD_r は 4.3 %, RSD_R は 7.2 %, HorRat は 0.58 であった。脱脂粉乳 (ニュージーランド産) について, 平均回収率は 105 %, RSD_r は 4.9 %, RSD_R は 9.9 %, HorRat は 0.79 であった。

参考のため, 各試験室で使用した LC-MS/MS の機種等を Table 9 に示した。

Table 8 Collaborative study for chloramphenicol

Lab. No.	Dried skim milk (France) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Dried skim milk (NZ) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	1	4.77	5.54	5.34
2	4.96	5.09	4.99	5.05
3	5.90	5.79	5.69	4.99
4	5.32	5.43	5.93	6.30
5	5.22	5.26	4.99	5.21
6	5.59	5.55	5.58	5.36
7	5.14	5.15	5.15	5.18
8	4.73	4.63	4.71	4.55
9	5.08	4.75	5.24	4.97
10	5.80	5.22	4.76	4.04
11	5.74	5.53	5.95	5.66
Spiked level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5		5	
Mean value ^{a)} ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	5.28		5.23	
Recovery ^{a)} (%)	106		105	
RSD _r ^{b)} (%)	4.3		4.9	
RSD _R ^{c)} (%)	7.2		9.9	
PRSD _R ^{d)} (%)	12		12	
HorRat	0.58		0.79	

a) $n=22$

b) Relative standard deviations of repeatability within laboratory

c) Relative standard deviations of reproducibility between laboratories

d) Predicted relative standard deviations of reproducibility between laboratories calculated from the modified Horwitz equation

Table 9 Instruments used in the collaborative study

Lab. No.	LC-MS/MS	LC column (i.d.×length, particle size)
1	Waters Quattro premier XE	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
2	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
3	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
4	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
5	Waters ACQUITY TQD	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
6	LC: Shimadzu LC-20AD MS/MS: AB SCIEX API-3200	Shimadzu Shim-pack XR-ODS (2.0 mm×100 mm, 2.2 μm)
7	LC: Shimadzu UFLC XR MS/MS: Thermo Fisher TSQ Quantum Ultra	GL Sciences Inertsil ODS-3 (2.1 mm×150 mm, 4 μm)
8	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
9	LC: Agilent Technologies 1200 Series MS/MS: Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
10	LC: Agilent Technologies 1100 Series MS/MS: AB SCIEX API-2000	Agilent Technologies ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 mm×150 mm, 5 μm)
11	LC: Waters ACQUITY UPLC H-Class MS/MS: Waters Xevo TQD	Waters SunFire C18 (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)

4 まとめ

脱脂粉乳中の CP について、LC-MS/MS を用いた定量法の飼料分析基準への適用の可否について検討したところ、次の結果が得られ、適用が可能であると考えられた。

- 1) 本法は安定同位体標識 CP を用いた内標準法による定量を採用した。また、検量線は 0.1~20 ng/mL (注入量として 1~200 pg) の範囲で直線性を示した。
- 2) 脱脂粉乳 9 点を用い、本法に従ってクロマトグラムを作成したところ、CP の定量を妨害するピークは認められなかった。
- 3) 疑似汚染試料を用いた回収試験の結果、良好な回収率及び併行精度が得られたことから、本法は汚染試料への適用が可能と考えられた。
- 4) 4 種類の脱脂粉乳を用いて、CP として 1 及び 25 μg/kg 相当量添加し、添加回収試験を実施し

た結果、平均回収率は 94.2~102 %、その繰返し精度は相対標準偏差 (RSD_r) として 6.2 %以下の成績が得られた。

- 5) 本法による CP の検出下限は、試料中で 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。
- 6) 脱脂粉乳 (フランス産及びニュージーランド産) に CP として 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相当量を添加した試料を用いて、12 試験室 (うち 1 試験室は手順を逸脱したため除外) において本法に従い共同試験を実施した。その結果、フランス産脱脂粉乳について、平均回収率は 106 %、 RSD_r は 4.3 %、 RSD_R は 7.2 %、HorRat は 0.58 であった。ニュージーランド産脱脂粉乳について、平均回収率は 105 %、 RSD_r は 4.9 %、 RSD_R は 9.9 %、HorRat は 0.79 であった。

謝 辞

共同試験に参加していただいた協同飼料株式会社研究所、日本ウォーターズ株式会社、社団法人日本科学飼料協会科学飼料研究センター、財団法人日本食品分析センター彩都研究所、日本ハム株式会社中央研究所及び財団法人マイコトキシン検査協会における関係者各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 二宮幾代治：動物の抗生物質，369-371 (1987). (株式会社養賢堂) .
- 2) 今堀和友，山川民夫 監修：生化学辞典 [第 2 版]，409 (1990). (株式会社東京化学同人) .
- 3) 田中信夫，中村昭四郎：抗生物質大要 [第 4 版]，160-161 (1995). (東京大学出版会) .
- 4) クリロビッツ (岡見吉郎訳)：抗生物質論，153-155 (1978). (学会出版センター) .
- 5) 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).
- 6) 厚生省告示：食品，添加物等の規格基準，昭和 34 年 12 月 28 日，厚生省告示第 370 号 (1959).
- 7) 菅野清：高速液体クロマトグラフィーによる脱脂粉乳中のクロラムフェニコールの定量，飼料研究報告，29，60-67 (2004).
- 8) 山本克己，大島慎司：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，飼料研究報告，34，55-66 (2009).
- 9) 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).
- 10) Horwitz, W., Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method - Performance Studies, Pure & appl. Chem., 67(2), 331-343 (1995).