

論 文

LC-MS/MSによる蜂蜜中の動物用医薬品の一斉分析

南谷臣昭, 中村昌司, 永井宏幸, 大塚公人, 後藤黄太郎

要 旨

蜂蜜中に残留する動物用医薬品 36 成分の一斉分析法を開発し, 妥当性評価を行った. 蜂蜜試料を Na_2EDTA 含有のトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し, 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 (Oasis HLB plus) による固相抽出を行った. ミニカラムからアセトニトリルで医薬品成分を溶出後, 水で 10 倍希釈することで試験溶液を調製し, LC-MS/MS により分析した. 本法は感度が高く, 検出限界はいずれの動物用医薬品でも 1 ng/g 以下となった. 添加濃度 0.01 $\mu\text{g/g}$ で, 3 種類の蜂蜜 (アカシア, オレンジ, マヌカ蜂蜜) により本法の妥当性評価を実施したところ, アカシア蜂蜜では 36 成分中 32 成分で厚生労働省通知のガイドラインの目標値を満たした. 本法を用い, アカシア, レンゲ, クローバーといった比較的夾雑成分の少ない市販の蜂蜜 16 製品について実態調査を行ったところ, 複数の製品からシプロフロキサシンやノルフロキサシンといった成分がごく微量検出された.

キーワード: 蜂蜜, 動物用医薬品, LC-MS/MS, 妥当性評価, ニューキノロン

1 はじめに

ミツバチの主な病気は, 蜂児の細菌性感染症である腐蝕病や, ミツバチヘギイタダニの寄生によるバロア病といった病気が知られている. これらの疾病予防として現在国内で使用が認められている動物用医薬品は, 抗生物質のミロサマイシンを主成分とするアピテン, 殺ダニ剤のフルバリネート, アミトラズを主成分とするアピスタン, アピバルの 3 種のみである. しかし, 国内に流通する蜂蜜の大半が輸入蜂蜜を原材料とするものであり, 近年輸入蜂蜜中の動物用医薬品による食衛生法違反の例が数多く報告されている.

蜂蜜中に残留する動物用医薬品の LC-MS/MS による分析法については, テトラサイクリン系抗生物質やサルファ薬といった特定の分類の抗生物質, 抗菌剤を対象とするグループ試験法¹⁻⁸⁾が開発されているが, 近年, 複数の分類にわたる成分を同時に分析する方法も開発されている^{9,10)}.

今回我々は, テトラサイクリン系抗生物質 3 成分, β -ラクタム系抗生物質 4 成分, マクロライド系 2 成分, サルファ薬 14 成分, キノロン系抗菌薬 11 成分, その他 2 成分 (トリメトプリム, オルメトプリム) の合計 36 成分を対象に, 簡易な前処理と LC-MS/MS による高感度分析を組み合わせた迅速・簡便な分析法を開発し, 厚生労働省通知¹¹⁾に基づく妥当性評価を行った. また, 本法により, アカシア, レンゲ, クローバーといった比較的夾雑成分の少ない市販の蜂蜜 16 製

品について実態調査を行ったので報告する.

2 実験方法

2.1 試料

添加回収用試料として, 中国産アカシア蜂蜜, メキシコ産オレンジ蜂蜜, ニューージーランド産マヌカ蜂蜜を用いた. これらの蜂蜜は事前に, 分析対象とする動物用医薬品成分が検出されないことを確認して用いた. 市販蜂蜜の実態調査には, 岐阜県内の小売店で販売されていた 16 製品を用いた.

2.2 試薬および標準品

動物用医薬品標準品: 和光純薬工業 (株) 製の高速液体クロマトグラフ用, 関東化学 (株) 製の食品分析用および Dr. Ehrenstorfer 社製の残留農薬試験用を用いた. ミロサマイシン標準品は川崎三鷹製薬 (株) 販売 (旭化成ファーマ (株) 製) の標準品 (純度 91.4%) を用いた.

各標準品を 1,000 $\mu\text{g/mL}$ あるいは 100 $\mu\text{g/mL}$ となるようにメタノールで希釈して標準原液を調製した. シプロフロキサシンおよびオキシリン酸はメタノールに対する溶解性が悪かったため 25 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した. 各標準原液を混合してメタノールで希釈し, 1 $\mu\text{g/mL}$ の混合標準溶液を調製し試験に用いた.

その他の試薬: エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (Na_2EDTA) は (株) 同仁化学研究所製の試験研究用の試薬を, トリス (ヒドロキシメチ

ル) アミノメタン (Tris) はナカライテスク (株) 製の分子生物学研究用試薬を用いた。塩酸 (HCl), リン酸, リン酸二水素ナトリウム二水和物, リン酸水素ナトリウムは和光純薬工業 (株) 製の特級品を用いた。メタノール, アセトニトリルおよびギ酸は和光純薬工業 (株) 製の LC-MS 用を用いた。

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は Waters 社製の Oasis HLB plus (225 mg) を用いた。抽出およびカラムからの溶出液の希釈には Thermo 社製のポリプロピレン製遠心沈殿管 (50 mL および 15 mL) を用いた。試験溶液を入れるバイアルは, Agilent 社製のポリプロピレン製バイアル (1 mL) を用いた。標準溶液の調製には BIOHIT 社製のマイクロピペット (1000 μ L, 200 μ L) を用いた。

2.3 装置および測定条件

2.3.1 装置

高速液体クロマトグラフ: Agilent 社製 1200LC(SL)

質量分析装置: ABSciex 社製 4000QTRAP

2.3.2 LC-MS/MS 条件

カラム: (財) 化学物質評価研究機構製 L-column2 ODS (2.1 \times 150 mm, 3 μ m), カラム温度: 40 $^{\circ}$ C, 注入量: 10 μ L, 移動相: A 液 0.1%ギ酸, B 液アセトニトリル, 移動相流速: 0.20 mL/min, グラジエント条件: 0分 (A : B = 99 : 1) \rightarrow 1分 (A : B = 85 : 15) \rightarrow 13分 (A : B = 55 : 45) \rightarrow 23分 (A : B = 5 : 95) \rightarrow 25分 (A : B = 5 : 95) \rightarrow 25.1分 (A : B = 99 : 1) \rightarrow 40分 (A : B = 99 : 1), 保持時間: 表1に示した。

イオン化モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI (+)), 測定モード: sMRM (Scheduled Multiple Reaction Monitoring) モード, イオンスプレー電圧: 5.5 kV, ターボガス温度: 600 $^{\circ}$ C, 各動物用医薬品の MS/MS 条件: 表1に示した。

2.4 試験溶液の調製

蜂蜜 5 g をポリプロピレン製遠心沈殿管 (50 mL) に量り採り, 10 mM Na₂EDTA 含有 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 20 mL を加え 5 分間振とう後, 3000 rpm で 10 分間遠心分離した。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 Plus) にメタノール 10 mL, 水 10 mL, 10 mM Na₂EDTA 含有 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.5) 10 mL を注入し, 流出液は捨てた。このカラムに遠心分離した上清を注入した。10 mL の水でカラムを洗浄し, 減圧下で吸引して水分を除去した後, アセトニトリル 10 mL を注入し全溶出液を採った。溶出液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離した後, 上清を 1 mL ポリプロピレン製遠心沈殿管 (15 mL) に量り採り, 水 9 mL を加えて試験溶液とした。(図 1)

2.5 定量

1 μ g/mL 混合標準溶液をポリプロピレン製遠心沈殿管 (15 mL) に 1 mL 量り採り, 水 9 mL を加えて 10 倍希釈した (100 ng/mL)。マイクロピペットを用い, ポリプロピレン製バイアル中で, アセトニトリル・水 (1 : 9) 混液により, この溶液を段階希釈して検量線用の標準溶液を調製した。(0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 ng/mL の 7 濃度。) これを 10 μ L 注入してピーク面積法により検量線を作成し, 絶対検量線法により定量した。

2.6 添加回収試験

アカシア蜂蜜, オレンジ蜂蜜, マヌカ蜂蜜 5 g に 100 ng/mL 混合標準溶液を 500 μ L 添加して添加試料とした (試料中濃度 0.01 μ g/mL)。また, 本試験法の妥当性を評価するため, 各蜂蜜について 1 日 2 併行の添加回収試験を 5 日間実施し, 一元配置の分散分析により併行精度 (RSD%) と室内精度 (RSD%) を求めた。全体の平均値の真度 (%) と併せ, 厚生労働省通知の妥当性評価ガイドライン¹¹⁾に示された目標値と比較して評価を行った。

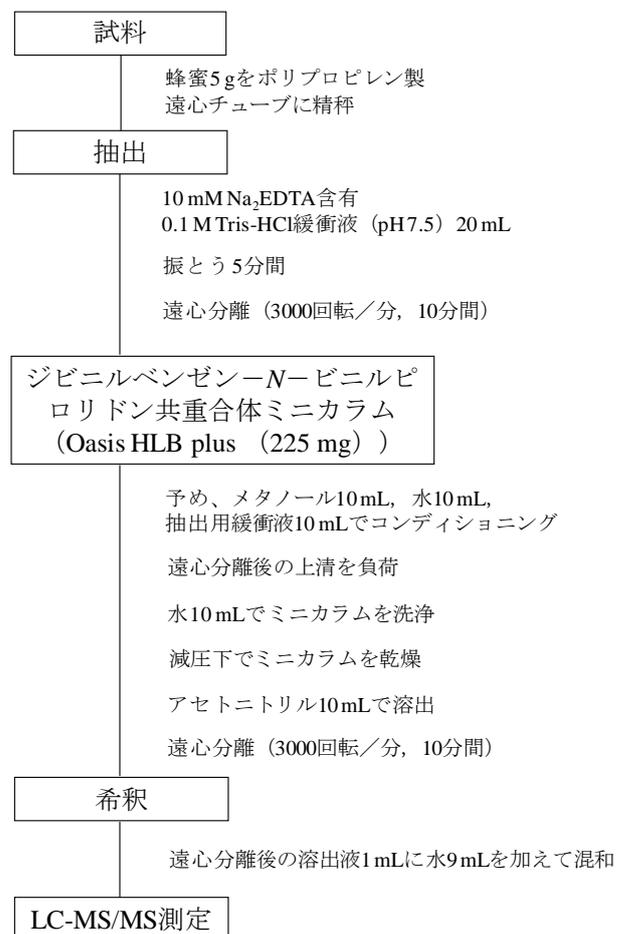


図 1 試験溶液調製の方法

表1 動物用医薬品36成分のLC-MS/MSパラメーター

化合物	略称	保持時間(分)	DP*1 (V)	定量イオン			定性イオン			検出限界(ng/g)
				MRM*2トランジション(m/z)	CE*3 (V)	CXP*4 (V)	MRM*2トランジション(m/z)	CE*3 (V)	CXP*4 (V)	
オキシテトラサイクリン	OTC	9.2	71	461 > 426	29	24	461 > 444	17	12	0.4
テトラサイクリン	TC	9.6	61	445 > 410	27	24	445 > 428	23	11	0.3
クロルテトラサイクリン	CTC	11.4	71	479 > 444	25	12	479 > 462	25	12	0.4
アモキシシリン	AMPC	7.5	51	366 > 349	13	10	366 > 114	27	8	0.2
アンピシリン	ABPC	8.7	51	350 > 106	25	8	350 > 160	19	12	0.08
ベンジルペニシリン	PCG	16.6	56	335 > 160	13	28	335 > 176	21	30	0.5
ナフシリン	NFPC	20.4	71	415 > 199	19	16	415 > 171	53	10	0.07
ミロサマイシン	MRM	13.2	101	728.4 > 158	37	14	728.4 > 554.3	29	16	0.02
タイロシン	TS	14.6	121	916.5 > 174	53	14	916.5 > 772.4	41	22	0.3
スルファキノキサリン	SQX	15.0	76	301 > 156	23	14	301 > 92	47	16	0.03
スルファクロルピリダジン	SCPD	12.3	66	285 > 156	23	12	285 > 92	41	14	0.06
スルファジアジン	SDZ	8.9	61	251 > 156	21	26	251 > 92	33	16	0.07
スルファジミジン	SDD	10.8	51	279 > 156	35	26	279 > 92	39	16	0.1
スルファジメトキシ	SDMX	15.0	76	311.1 > 156	29	26	311.1 > 92	49	16	0.02
スルファチアゾール	STZ	9.2	56	256 > 156	21	28	256 > 92	38	15	0.1
スルファドキシ	SDOX	12.9	71	311 > 156	25	28	311 > 92	41	16	0.01
スルファニトラン	SNT	17.8	76	336 > 156	19	12	336 > 134	37	22	0.3
スルファピリジン	SPY	9.5	61	250 > 156	25	26	250 > 92	41	14	0.07
スルファベンズアミド	SBA	14.6	56	277 > 156	19	14	277 > 92	39	14	0.04
スルファメトキサゾール	SMXZ	13.0	46	254 > 156	25	12	254 > 92	37	8	0.09
スルファメキシピリダジン	SMPD	10.9	56	281 > 156	23	8	281 > 92	35	16	0.03
スルファメラジン	SMR	9.9	66	265 > 156	23	26	265 > 92	43	16	0.05
スルファモノメトキシ	SMMX	11.8	66	281.1 > 156	25	26	281.1 > 92	41	16	0.04
オキシリン酸	OXA	14.0	51	262 > 244	25	40	262 > 216	39	36	0.04
ナリジクス酸	NA	16.8	31	233 > 215	25	16	233 > 187	35	32	0.08
フルメキン	FMQ	17.4	61	262.1 > 244	25	12	262.1 > 202	45	10	0.05
エンロフロキサシン	ERFX	9.5	81	360 > 316	27	16	360 > 245	37	20	0.4
シプロフロキサシン	CPFX	9.1	81	332 > 288	25	16	332 > 245	35	20	0.7
オフロキサシン	OFLX	8.9	76	362 > 318	25	22	362 > 261	37	38	0.2
オルビフロキサシン	OBFX	9.7	96	396 > 352	25	8	396 > 295	35	16	0.3
サラフロキサシン	SRFX	10.2	81	386 > 342	27	20	386 > 299	39	16	0.2
ジフロキサシン	DFLX	10.4	66	400 > 356	27	18	400 > 299	41	16	0.1
ダノフロキサシン	DNFX	9.3	61	358 > 340	31	20	358 > 314	27	18	0.06
ノルフロキサシン	NRFX	8.9	76	320 > 276	23	24	320 > 233	35	14	1
トリメプリム	TMP	8.7	71	291 > 230	31	10	291 > 123	31	2	0.06
オルメプリム	OMP	9.1	81	275 > 123	35	20	275 > 259	35	12	0.1

*1 Declustering potential
 *2 Multiple reaction monitoring
 *3 Collision energy
 *4 Collision cell exit potential

3 結果および考察

3.1 LC-MS/MS 測定条件の検討

極性が異なる多成分を同時に分析するにあたり、高極性成分の保持が課題となった。そこでまず、逆相系のオクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) カラムの中で、高極性の保持に優れたカラム3種 (Atlantis T3, CAPCELL PAK C18 AQ, TSK gel ODS-100V) を用いて検討した。移動相は0.1%ギ酸とアセトニトリルのグラジエントにより行った。その結果、Atlantis T3では、高極性の成分であるアモキシシリン (AMPC)、アンピシリン (ABPC) の保持は良好であったが、ニューキノロン系の成分にテーリングが見られた。また、

CAPCELL PAK C18 AQ および TSK gel ODS-100V はニューキノロン系の成分の保持は比較的良好であったが、オールドキノロン系の成分にテーリングが見られた。

本研究で採用した L-column2 ODS は、オールドキノロン系の成分 (OXA, NA, FMQ) にややテーリングが見られたものの、上記カラムに比べてその程度は小さかった。また、AMPC と ABPC の保持が良好であり、ニューキノロン系の成分のピーク形状も良好であった (図2)。

濃縮操作がない簡便な方法であるにも関わらず、良好なピーク形状のため、本法の検出限界はいずれの成

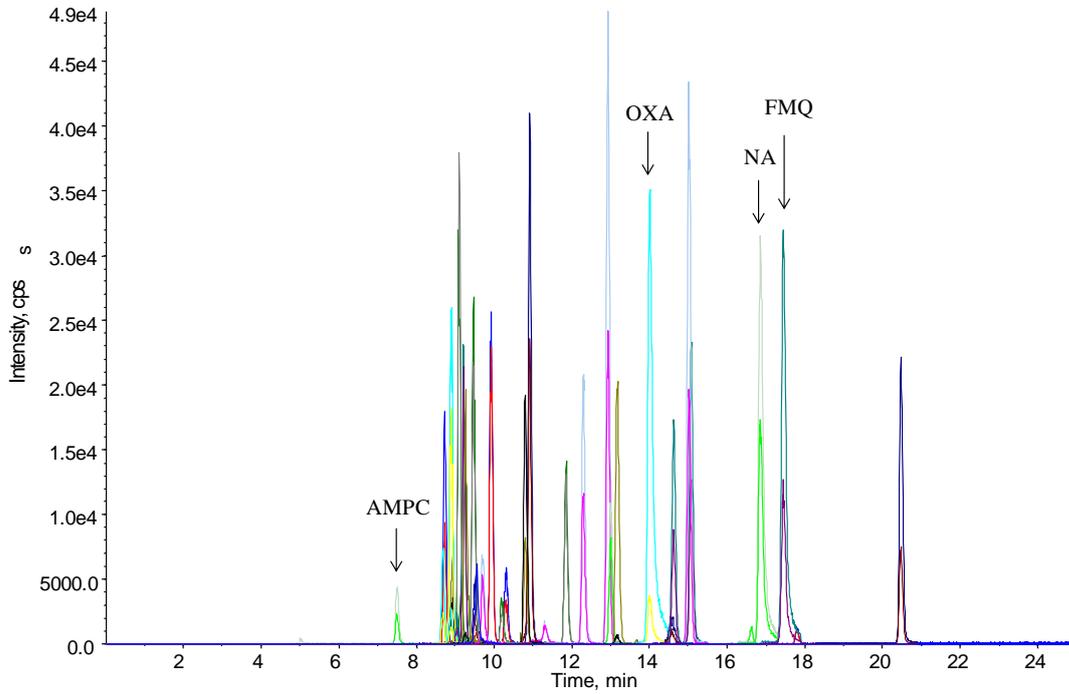


図2 標準溶液 (1 ng/mL) のLC-MS/MS クロマトグラム

表2 妥当性評価結果 (アカシア蜂蜜, オレンジ蜂蜜, マヌカ蜂蜜)

化合物	略称	系統	アカシア蜂蜜			オレンジ蜂蜜			マヌカ蜂蜜		
			真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
オキシテトラサイクリン	OTC	テトラサイクリン系	105.3	7.5	14.8	102.2	10.2	14.1	100.2	11.4	16.2
テトラサイクリン	TC		101.0	8.7	13.2	113.2	8.3	11.1	114.5	2.0	11.9
クロルテトラサイクリン	CTC		100.1	7.9	8.8	104.0	6.1	8.6	97.9	7.2	8.3
アモキシシリン	AMPC	β-ラクタム系	56.6	8.0	12.8	45.7	5.2	8.3	12.6	22.5	36.0
アンピシリン	ABPC		71.0	6.2	11.6	75.6	2.8	5.7	54.9	6.4	13.0
ベンジルペニシリン	PCG		79.5	4.9	7.5	86.3	3.5	6.5	89.6	6.4	7.6
ナフシリン	NFPC		86.0	2.0	9.3	91.4	1.4	8.0	97.0	2.0	5.6
ミロサマイシン	MRM	マクロライド系	117.5	1.0	8.8	111.0	3.0	10.9	84.9	3.1	14.5
タイロシン	TS		187.2	3.8	9.1	185.5	1.7	9.7	185.9	3.9	10.1
スルファキノキサリン	SQX	サルファ薬	83.1	2.3	2.7	69.2	3.4	5.6	18.8	9.2	25.2
スルファクロルビリダジン	SCPD		85.9	1.7	5.1	63.2	2.4	8.4	29.2	2.1	12.4
スルファジアジン	SDZ		65.4	5.7	10.5	43.8	6.2	13.2	18.9	8.4	23.1
スルファジミジン	SDD		90.4	3.1	4.0	78.5	1.9	4.4	26.2	6.8	15.9
スルファジメトキシシ	SDMX		86.8	2.4	3.7	85.5	1.6	5.9	42.7	2.5	10.4
スルファチアゾール	STZ		72.2	7.8	8.4	51.2	6.8	7.7	17.7	5.4	14.3
スルファドキシシ	SDOX		99.0	2.8	3.3	86.3	2.6	6.5	39.9	2.9	14.1
スルファニトラン	SNT		105.5	4.5	4.5	105.9	3.3	7.2	96.6	5.1	7.1
スルファビリジン	SPY		65.5	4.7	9.2	48.7	4.5	8.7	14.8	10.6	22.5
スルファベンズアミド	SBA		97.4	2.6	5.3	94.4	3.6	6.0	67.5	2.9	5.6
スルファメトキサゾール	SMXZ		91.0	2.8	3.4	83.2	4.2	5.3	48.2	5.8	8.0
スルファメトキシビリダジン	SMPD		90.4	6.2	7.7	67.4	4.0	5.7	18.0	5.1	13.5
スルファメラジン	SMR		87.1	1.8	5.8	69.3	4.7	10.6	26.8	4.0	22.2
スルファモノメトキシシ	SMMX		84.7	1.5	3.8	60.6	2.6	7.6	28.9	2.3	5.6
オキソリン酸	OXA	オールドキノロン系	109.5	1.3	3.0	114.9	1.5	5.1	90.2	3.7	6.5
ナリジクス酸	NA		113.4	2.8	5.0	118.5	2.2	9.6	123.5	2.1	8.1
フルメキン	FMQ		113.9	3.1	5.7	121.8	1.4	8.8	99.1	1.2	11.7
エンロプロキサシ	ERFX	ニューキノロン系	99.6	10.2	11.1	100.5	6.0	17.8	109.0	9.5	10.5
シプロフロキサシ	CPFX		90.4	7.4	13.8	86.6	10.9	12.5	88.8	9.2	13.2
オフロキサシ	OFLX		102.3	7.8	14.3	98.1	8.2	15.8	94.4	9.8	12.9
オルビフロキサシ	OBFX		100.8	5.7	7.3	96.5	7.0	9.2	93.3	9.3	12.3
サラフロキサシ	SRFX		89.1	6.8	13.7	87.6	2.5	9.6	79.0	2.8	7.6
ジフロキサシ	DFLX		104.5	2.9	11.1	103.0	4.8	11.7	98.0	4.7	14.4
ダノフロキサシ	DNFX		106.9	3.8	9.8	96.3	8.8	16.4	44.0	13.3	41.7
ノフロキサシ	NRFX		83.0	10.8	20.0	78.0	11.5	26.1	72.5	9.0	16.1
トリメトプリム	TMP		82.5	5.2	8.7	66.5	3.3	5.6	28.6	4.0	14.0
オルメトプリム	OMP		79.1	7.4	9.1	63.6	7.0	7.7	26.2	10.4	15.8

* 真度が70%未満または120%超, 併行精度が25%以上, 室内精度が50%以上の場合は を付けて示した。

分についても 1 ng/g 以下と低くなった (表 1)。

3.2 抽出操作の最適化

抽出液の pH, ミニカラムの容量について条件検討を行った。

pH2~9 までの各種 pH のリン酸緩衝液に標準溶液を添加し, 固相ミニカラムへの保持挙動を検討した。リン酸緩衝液に 100 ng/mL の標準溶液を 1 mL 添加し, 2.4 の試験溶液の調製と同様に処理して測定を行った。pH2~4 ではトリメトプリム (TMP), オルメトプリム (OMP) の回収率が低かった。pH 8 および 9 ではスルファジアジンの回収率が低下した。pH5-8 の領域では pH が高くなるほど極性の高い成分である AMPC と ABPC の保持が良くなる傾向が見られた。以上を考慮して pH を 7.5 に設定した。

ミニカラムの容量は, 60 mg の場合 AMPC の回収率が悪かった。そこでカラム容量を増やし 225 mg のミニカラムを用いることとした。

テトラサイクリン, ニューキノロン, マクロライドは, 試料中に含まれる Ca^{2+} や Fe^{2+} といった金属イオンとキレートを形成し, ミニカラムへの保持が弱くなるため, 抽出溶液中にキレート試薬である Na_2EDTA を添加するのが常法となっている^{5,10,12}。本研究でも抽出溶液に Na_2EDTA を 10 mM となるように加えた。これによりテトラサイクリン, ニューキノロン, マクロライドでは真度が安定した。

3.3 3種の蜂蜜による妥当性評価試験結果について

アカシア蜂蜜では, 全 36 成分中 32 成分が厚生労働省通知の妥当性評価ガイドラインの目標値 (真度 70-120%, 併行精度 25% 以下, 室内精度 30% 以下) を満たし良好な結果となった (表 2)。しかし, オレンジ蜂蜜とマヌカ蜂蜜では, ガイドラインを満足する項目がそれぞれ 23 成分と 16 成分となった。マヌカ蜂蜜ではサルファ薬の多く, TMP と OMP および高極性成分の AMPC と ABPC の真度が目標値の範囲外であった。オレンジ蜂蜜, マヌカ蜂蜜では試料由来のマトリックスがアカシア蜂蜜よりも多く, 試験溶液の調製時または測定時に影響したと考えられる。

3.4 実態調査

妥当性評価の結果から, 本分析法はレンゲ, アカシア, クローバー蜂蜜といった夾雑成分が比較的少ない蜂蜜には適用可能であると考え, これらの蜂蜜を主に含む市販の蜂蜜について, 実態調査を実施した (表 3)。

検出された成分はテトラサイクリン (TC), タイロシン (TS), スルファメトキサゾール (SMXZ), シプロフロキサシン (CPFEX), ノルフロキサシン (NRFEX), トリメトプリム (TMP) の 6 成分であった。特に, 中国産の蜂蜜から, ニューキノロン系の合成抗菌剤であ

る CPFEX, NRFEX の検出が多く見られた。

検出値はいずれも微量であるため, 健康危害という点では問題とはならないが, 薬剤耐性を引き起こす可能性が懸念される。

表 3 市販蜂蜜の実態調査結果

試料番号	原産国	蜜種	検出動物用医薬品 ¹⁾ (濃度 (μg/g))
1	中国		CPFEX(0.008), NRFEX
2	中国・アルゼンチン		SMXZ(0.001), CPFEX, NRFEX(0.006), TMP(0.008)
3	中国	レンゲ	CPFEX(0.003), NRFEX
4	中国		CPFEX, NRFEX(0.006), TMP(0.001)
5	中国		CPFEX, NRFEX
6	中国	アカシア	TC(0.001), NRFEX
7	中国		NRFEX
8	中国		TC(0.001), CPFEX, NRFEX
9	中国	アカシア	
10	中国・アルゼンチン	アカシア, レンゲ, クローバー	
11	インド		
12	中国	レンゲ	
13	カナダ		TS(0.002)
14	中国		CPFEX
15	中国	レンゲ	NRFEX
16	カナダ		

1) 検出された動物用医薬品を略称で示した。() 内は検出値。数値が無いものは検出限界値以上, 定量限界値未満。

4 まとめ

蜂蜜に残留する動物用医薬品 36 成分を LC-MS/MS により高感度に分析する一斉試験法を検討した。妥当性評価の結果, 本法はアカシア蜂蜜では良好な結果となったものの, 夾雑成分が多いオレンジ蜂蜜やマヌカ蜂蜜では, サルファ薬などの成分で真度の低下が見られた。

本法により, 市販の蜂蜜の実態調査を行った結果, 微量ながらも 6 成分が検出された。特にニューキノロン系の合成抗菌剤である CPFEX や NRFEX の検出が多く見られた。

謝 辞

添加回収試験の実施にあたり, 分析対象とする動物用医薬品成分が残留していないブランク試料を提供していただいた株式会社秋田屋本店の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Wang J: Determination of five macrolide antibiotic residues in honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS, J Agric Food Chem, 52, 171-181, 2004.

- 2) Granja R, Niño AM, Zucchetti R, Niño RM, Patel R, Salerno AG: Determination of erythromycin and tyrosin residues in honey by LC-MS/MS, *J AOAC Int*, 92, 975-980, 2009.
- 3) Sheridan R, Policastro B, Thomas S, Rice D: Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC-MS/MS analysis, *J Agric Food Chem*, 56, 3509-3517, 2008.
- 4) Pang GF, Cao YZ, Zhang JJ, Jia GQ, Fan CI, Li XM, Liu YM, Li ZY, Shi YQ: Simultaneous determination of 16 sulfonamides in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J AOAC Int*, 88, 1304-1311, 2005.
- 5) Kanda M, Kusano T, Kanai S, Hayashi H, Matushima Y, Nakajima T, Takeba K, Sasamoto T, Nagayama T: Rapid determination of fluoroquinolone residues in honey by a microbiological screening method and liquid chromatography, *J AOAC Int*, 93, 1331-1339, 2010.
- 6) Lopez MI, Feldlaufer MF, Williams AD, Chu PS: Determination and confirmation of nitrofurans residues in honey using LC-MS/MS, *J Agric Food Chem*, 56, 1103-1108, 2007.
- 7) Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T: Analysis of chloramphenicol in honey and royal jelly by LC-MS/MS, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 47, 58-65, 2006.
- 8) Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T: Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC-MS/MS, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 47, 277-283, 2006.
- 9) Lopez MI, Pettis JS, Smith IB, Chu PS: Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS, *J Agric Food Chem*, 56, 1553-1559, 2008.
- 10) Vidal JL, Aguilera-Luiz Mdel M, Romero-Gonzalez R, Frenich AG: Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 57, 1760-1767, 2009.
- 11) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知: 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて, 平成 19 年 11 月 15 日, 食安発第 1115001 号, 2007.
- 12) Pena A, Pelantova L, Lino CM, Silveira MI, Solich P: Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection, *J Agric Food Chem*, 53, 3784-3788, 2005.

Simultaneous Analysis of Antibiotic Residues in Honey by LC-MS/MS

Tomiaki MINATANI, Masashi NAKAMURA, Hiroyuki NAGAI, Kimihito OTSUKA, Kotaro GOTO

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:

1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan

Summary

A method has been developed for the simultaneous analysis of 36 veterinary drug residues in honey. Honey samples were dissolved with Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing Na₂EDTA, followed by solid-phase extraction using divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer cartridges (Oasis HLB plus). The veterinary drugs were eluted with acetonitrile from solid-phase and test solutions, analyzed by LC-MS/MS, were made up by dilution of the acetonitrile solutions with water ten times. This method provided high sensitivity and the detection limits of all veterinary drugs were lower than 1 ng/g. The method was validated according to the guideline of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; recovery tests were performed on 3 kinds of honeys (acacia, orange and manuka honey) by fortification of 36 veterinary drugs at the concentration 0.01 µg/g. In the case of acacia honey, this method satisfied the guideline criteria for 32 drugs. The developed procedure was applied to analysis of veterinary drugs in 16 retail honey samples such as acacia, Chinese milk vetch and clover honey and the trace amounts of ciprofloxacin and norfloxacin were detected in multiple samples.

Keywords: honey, veterinary drug, LC-MS/MS, validation, new quinolone