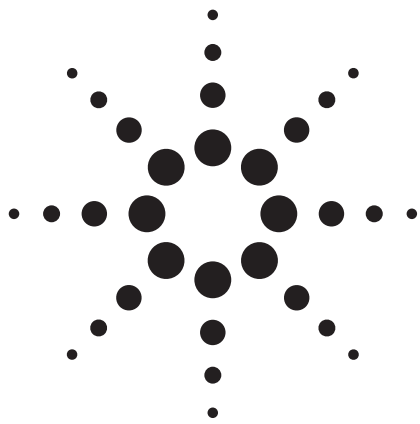




Agilent サンプリーク OPT 固相抽出 カートリッジと液体クロマトグラフィ/ タンデム四重極質量分析によるハチミツ中 クロラムフェニコール、フロルフエニコール、 チアンフェニコールの測定

アプリケーション

食品安全性

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Carol Haney Ball
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive
Cary, NC 27511
USA

概要

ハチミツに含まれる 3 種類の残留抗生物質、クロラムフェニコール (CAP)、フロルフエニコール (FF)、チアンフェニコール (TAP) を同時に測定するメソッドを開発し、有効性を確認しました。液液抽出と固相抽出 (SPE) により分析化合物を精製し、ネガティブイオンマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードのエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィ (LC-ESI-MS/MS) により定量しました。内部標準としてクロラムフェニコール-D5 を使用しました。再現性、性能の十分性、定量結果により、メソッドの有効性が実証されています。このメソッドでは、ハチミツに含まれる 3 種類すべての抗生物質について、サブ ng/g~ng/g 域の定量下限が得られます。全体の回収率は 74.9~107 % で、RSD値は 0.5~9.7 % です。ダイナミックキャリブレーションレンジは、クロラムフェニコールとフロルフエニコールで 0.1~20.0 ng/g、チアンフェニコールで 1.0~20.0 ng/g です。本メソッドを使えば、ハチミツに含まれる残留クロラムフェニコール、フロルフエニコール、チアンフェニコールについて、高速で簡単、かつ効率の高いモニタリングを実施できることが実証されています。



Agilent Technologies

はじめに

クロラムフェニコール (CAP) は、スペクトルの広い静菌性の抗生物質で、バクテリア *Streptomyces venezuelae* に由来します。人体では副作用を起こすおそれがあるため、軽い疾病の治療には推奨されていませんが、重篤な感染症の治療手段として使われています。獣医用薬剤としては、CAP は耐容性の高い、きわめて効果的な抗生物質であることがわかっています。人体で生じるおそれのある副作用は、動物では報告されていません。しかし、人体で毒性を持つことから、ミツバチの作るハチミツなどの動物由来食品における CAP の使用は、厳しく規制されています。動物由来食品中の CAP の最大残留基準値 (MRL) は、欧州連合 (EU) では 0.3 µg/kg [1]、中国では 0.5 µg/kg と定められています [2]。チアンフェニコール (TAP) とフロルフェニコール (FF) は、CAP の類似化合物です。これらの化合物については、CAP の代替獣医用抗生物質として使用することが多くの国で認められています。現在のところ、食品中の TAP の MRL は 50 ng/g、FF の MRL は 100 ng/g と定められています [3]。表 1 に、これら 3 種類の化合物の化学構造と特性を示しています。本アプリケーションノートでは、ハチミツに含まれる 3 種類の

フェニコールを同時に測定するメソッドを解説し、そのバリデーション結果を示しています。

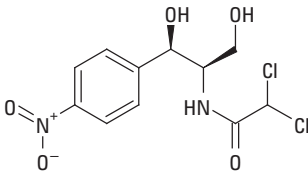
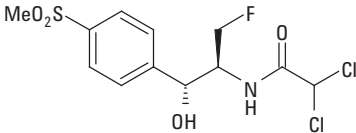
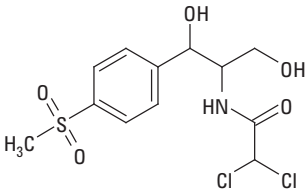
実験手法

試薬と化合物

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリルとメタノールは Honeywell, Burdick & Jackson (マスキーゴン、ミシガン州) から、酢酸エチルは J.T.Baker (フィリップスバーグ、ニュージャージー州) から入手しました。ジメチルスルホキシドは Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。標準物質とその他の化合物は、Sigma-Aldrich から購入しました。

pH メーターでモニタリングしながら 0.05 % NH₄OH 水溶液で Milli-Q 水の pH を調整し、水 (pH 8.5) を作成しました。メタノール 40 mL と酢酸エチル 160 mL をよく混合し、20:80 メタノール/酢酸エチル溶液を作成しました。Milli-Q 水 160 mL にアセトニトリル 40 mL を添加し、20:80 アセトニトリル/H₂O 水溶液を作成しました。

表 1. ターゲット化合物の化学構造と特性

化合物 構造	Log P	pKa	
クロラムフェニコール	1.02	9.61	
フロルフェニコール	-0.12	9.03	
チアンフェニコール	-0.27	9.76	

ジメチルスルホキシド (DMSO) 中で標準原液 (1.0 mg/mL) を作成し、4 °C の冷蔵庫で保管しました。20:80 ACN/H₂O 中で混合分析溶液 (2,500 ng/mL) を毎週作成し、同じく 4 °C で保管しました。その後、混合分析溶液を Milli-Q 水または 20:80 ACN/H₂O で適度に希釈し、添加溶液を毎日作成しました。

DMSO 中で内部標準 (IS) 原液 (0.1 mg/mL) を作成し、4 °C の冷蔵庫で保管しました。原液を Milli-Q 水で適度に希釈して IS 添加溶液 (50 ng/mL) を毎週作成し、4 °C で保管しました。

使用機器および材料

Agilent 1200 シリーズ HPLC (アジレント・テクノロジー、サンタクララ、カリフォルニア州、米国)

エレクトロスプレーイオンソースを搭載した Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS/MS システム (アジレント・テクノロジー、サンタクララ、カリフォルニア州、米国)

サンプリーク OPT 固相抽出カートリッジ、50 × 3 mL チューブ、60 mg (p/n 5982-3036) (アジレント・テクノロジー、ウィルミントン、デラウェア州、米国)

CentraCL3R 遠心分離機 (Thermo IEC、ニーダムハイツ、マサチューセッツ州、米国)

N₂ ドライヤー (Glas-Col、テレホート、インディアナ州、米国)

サンプル前処理

液液抽出

ハチミツ 5 g (± 0.05 g) を計量し、50 mL のキャップつきポリプロピレンチューブに入れました。IS 添加溶液 0.5 mL (50 ng/mL) をチューブに添加し、混合されるまでボルテックスしました。その後、Milli-Q 水 5 mL を添加して 3 分間ボルテックスし、サンプルを完全に混合しました。酢酸エチル 5 mL を添加し、しっかりとキャップをはめ、チューブを 5 分間攪拌しました。その後、チューブを 3,200 rpm で 5 分間にわたって遠心分離し、上澄みの有機層を慎重に別のチューブに移しました。酢酸エチルの添加、攪拌、遠心分離、有機層の移動をさらに 2 回繰り返し、すべての上澄みをひとつにまとめました。コントロールされた 50 °C の N₂ 流ドライヤーによりサンプルを蒸発させて乾燥させ、Milli-Q 水 5 mL に再溶解したのちにボルテックスし、超音波分解により残留物を完全に溶解させました。その後、サンプルを SPE により精製しました。図 1 に液液抽出手順のフローチャートを示しています。

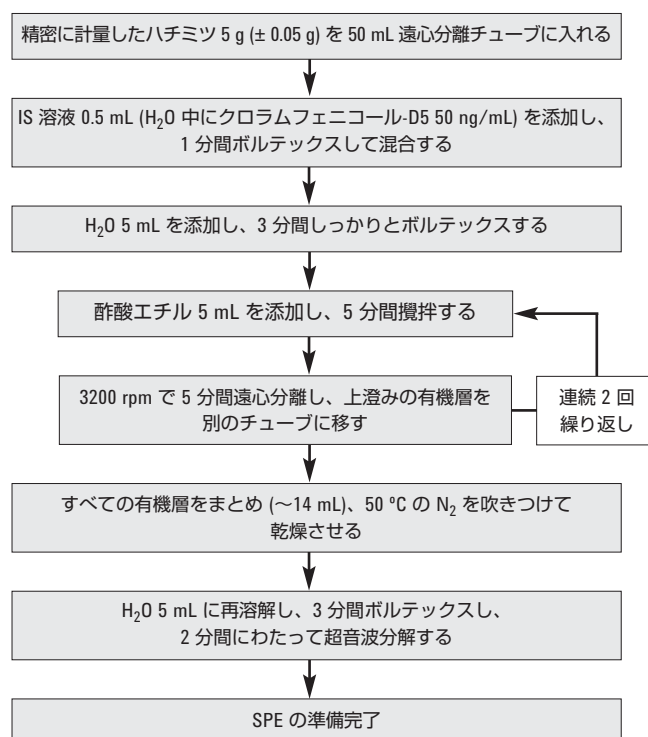


図 1. サンプル前処理—ハチミツ中フェニコールの液液抽出

固相抽出

固相抽出手順を図 2 に示しています。サンプリーク OPT カートリッジを MeOH 3 mL で前処理し、水 5 mL で平衡化しました。その後、サンプル抽出液 5 mL をカートリッジにロードし、重力によりゆっくりとサンプルを通過させました (0.5 mL/min)。Milli-Q 水 5 mL で 2 度にわたってチューブを洗浄しました。洗浄までの手順をもう 1 度繰り返しました。溶出液は廃棄しました。3 分間にわたってカートリッジを完全に真空状態にして、樹脂を完全に乾燥させました。最後に、20:80 MeOH/ 酢酸エチル (2.5 mL × 2) 5 mL により流量 1 mL/min で化合物を溶出しました。溶出液を清潔なチューブに集め、50 °C の N₂ 流で乾燥させました。残留物を 20:80 AcN/H₂O 0.5 mL に再溶解しました。サンプルをボルテックスし、チューブ内の残留物を超音波分解により完全に溶解させました。サンプルを遠心分離チューブに移し、3,200 rpm で 2 分にわたって遠心分離しました。その後、サンプルをオートサンブラ用 2 mL バイアルに移し、分析しました。

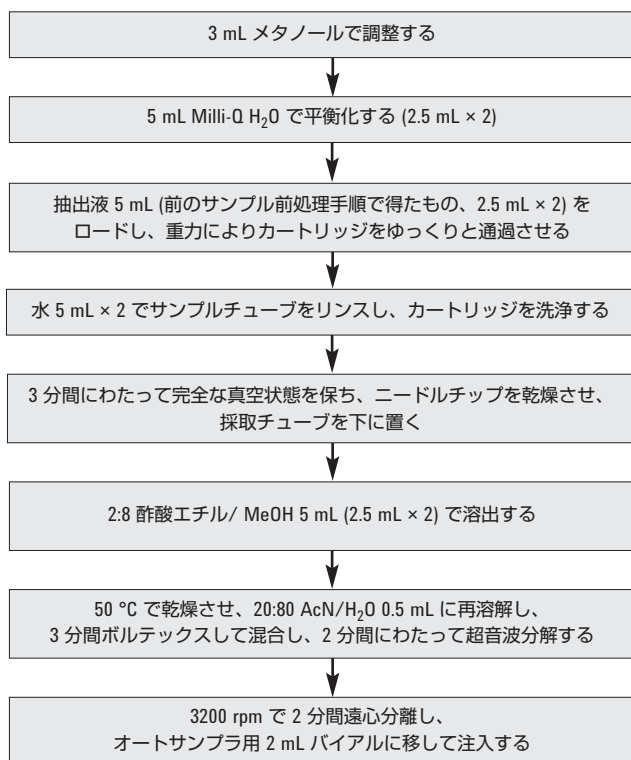


図 2. サンプル精製－サンプルリーク固相抽出

機器条件

HPLC 条件

カラム：	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 150 mm × 2.1 mm, 5 µm (PN: 959701-906)		
流量：	0.3 mL/min		
カラム温度：	30 °C		
注入量：	20 µL		
移動相：	0.05% NH ₄ OH 水溶液でpH 8.5 に調整した H ₂ O (A)、アセトニトリル (B)		
グラジエント：	時間	アセトニトリル %	流量 (mL/min)
	0	20	0.3
	0.5	20	0.3
	6.0	80	0.3
	6.01	100	0.5
	6.50	100	0.5
	6.51	20	0.3
	7.00	STOP	

MS 条件

ネガティブイオン化モードで 3 種類の化合物をモニタリングしました。マルチプルリアクションモニタリングのチャンネルを表 2 に示しています。

表 2. マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 分析でモニタリングした質量

化合物	MRM (m/z → m/z)	ドウェルタイム (ms)
チアンフェニコール	354.0 → 184.9 (クオンティファイア)	50
	354.0 → 290.0 (クオリファイア)	25
フロルフェニコール	355.8 → 185.0 (クオンティファイア)	50
	355.8 → 336.0 (クオリファイア)	25
クロラムフェニコール	320.9 → 152.0 (クオリファイア)	50
	320.9 → 176.0 (qualifier)	25
クロラムフェニコール-D ₅ (IS)	325.9 → 156.8	25

結果と考察

直線性、検出下限

濃度 0.2 ng/g の強化ハチミツの抽出イオンクロマトグラムを図 3 に示しています。抽出ハチミツブランクには、いずれの化合物も含まれていませんでした。このことは、ターゲット分析において、精製したハチミツ抽出液に由来する干渉が生じないことを示しています。

ここで分析した濃度範囲は、TAP の MRL(50 ng/g) で定義される定量下限 (LOQ) を大きく下回っています [3]。本研究では、TAP の定量下限 (LOQ) は 1.0 ng/g で、TAP に用いた検量線の直線範囲は 1.0~20.0 ng/g でした。CAP (LOQ 0.1 ng/g、MRL 0.3 ng/g) および FF (LOQ 0.1 ng/g、MRL 100 ng/g) の検量線の直線範囲は 0.1~20.0 ng/g でした。

CAP および FF を 0.1、0.2、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 ng/g の範囲でマトリックスブランクに添加し、検量線を作成しました。TAP については、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 ng/g の範囲で添加しました。5 ng/g のクロラムフェニコール-D₅ を内部標準として使用しました。分析化合物の相対濃度 (分析化合物の濃度/ IS の濃度) に対して分析化合物の相対レスポンス (分析化合物のピーク面積/ IS のピーク面積) をプロットし、検量線を作成しました。4~5 のシグナル/ノイズ比により検出下限 (LOD) を測定しました。表 3 に、回帰方程式、相関係数 (R²)、LOD を示しています。クロラムフェニコールの検量線を図 4 に示しています。

表 3. フェニコールの直線性と LOD

化合物	回帰方程式	R ²	LOD (ng/g)
クロラムフェニコール	Y = 0.5643X - 0.0001	0.9957	0.02
フロルフェニコール	Y = 0.8790X + 0.0006	0.9932	0.02
チアンフェニコール	Y = 0.1510X - 0.0018	0.9953	0.20

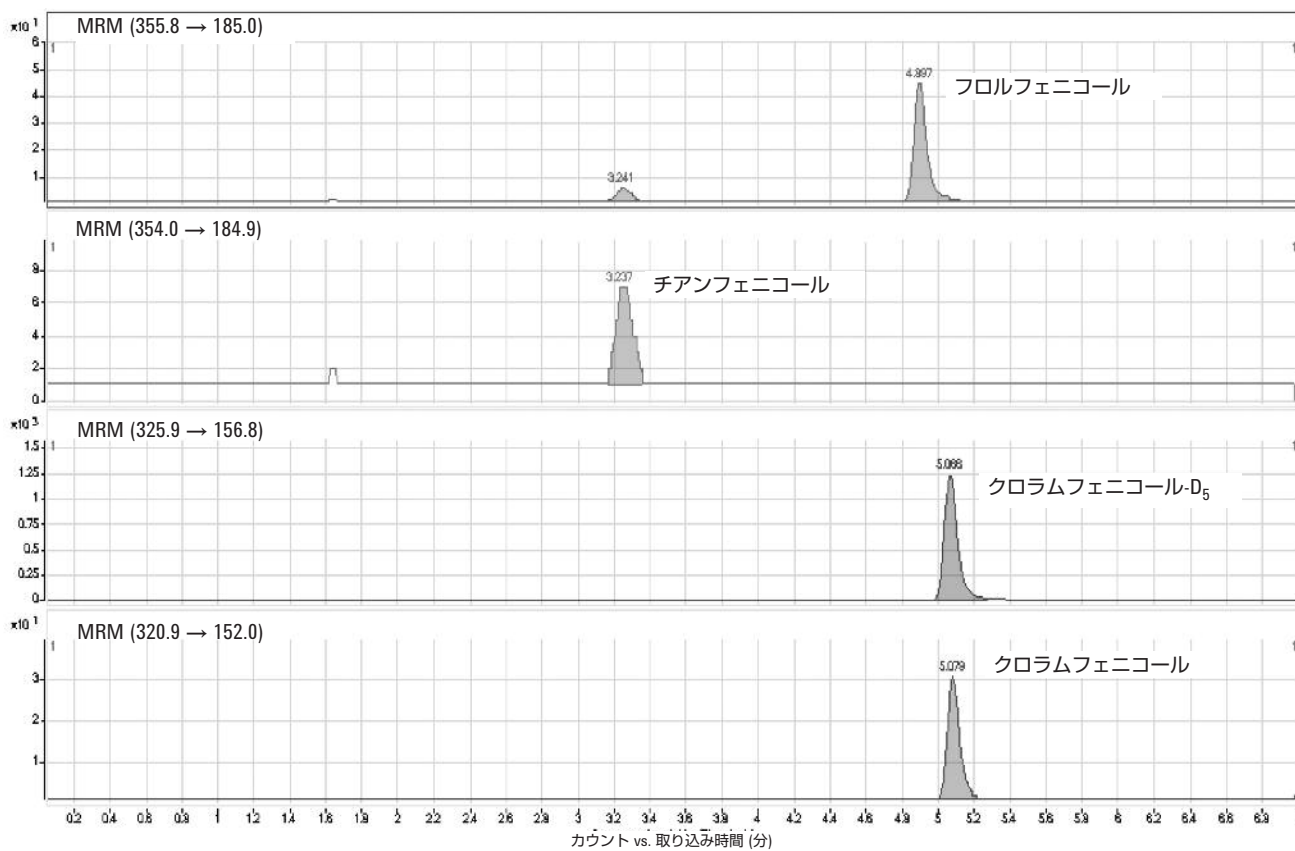


図 3. 強化ハチミツ抽出液 0.2 ng/g のクロマトグラム

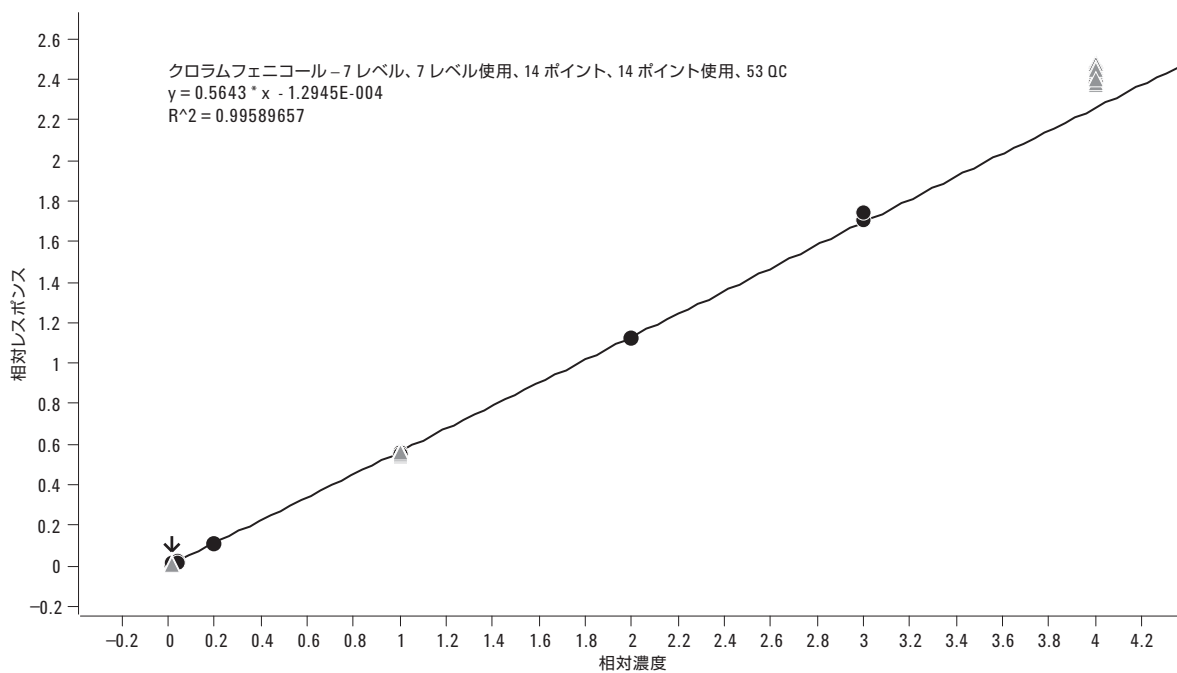


図 4. クロラムフェニコールの検量線 (0.1~20.0 ng/g)。点 (●) は検量線ポイントのサンプル分析結果、三角 (Δ) は品質管理サンプルの分析結果を示しています。

回収率と再現性

回収率と再現性を評価するために、0.1 ng/g (TAP は 1.0 ng/g)、5.0 ng/g、20.0 ng/g の濃度でハチミツ中にフェニコール標準溶液を添加した品質管理サンプル (QC) を作成し、マトリックス添加検量線を用いて QC サンプルを定量しました。各濃度について分析を 6 回繰り返しました。ただし、低濃度の TAP については、繰り返し回数を 4 回としました。表 4 に回収率と再現性 (%RSD で表示) のデータを示しています。CAP と FF は、すべての QC 濃度で優れた回収率と再現性を示しています。TAP については、回収率はすべての濃度で適度な値となり、再現性は良好でした。

表 4. 強化ハチミツ中フェニコールの回収率と再現性

化合物	添加濃度 (ng/ ハチミツ1 g)	回収率 (%)	RSD (%) n = 6
クロラムフェニコール	0.10	96.94	3.51
	5.00	98.88	0.87
	20.00	107.32	0.46
フロルフェニコール	0.10	100.67	9.77
	5.00	100.28	2.84
	20.00	107.49	2.55
チアンフェニコール	1.00	76.00	4.39*
	5.00	74.89	2.34
	20.00	89.81	3.83

* 4 回繰り返し分析

結論

Agilent サンプリーク OPT SPE カートリッジを使えば、ハチミツに含まれるクロラムフェニコール、フロルフェニコール、チアンフェニコールの精製と濃縮を簡単かつ効果的に行うことができます。マトリックス添加標準溶液を分析して得られた回収率と再現性の結果は、EU および中国の規制当局が定めるハチミツ中残留クロラムフェニコール測定の基準を満たしています。ハチミツの不純物とマトリックス効果が最小限に抑えられ、いずれのターゲット化合物でも定量の干渉は生じません。3 種類のフェニコールの LOQ は、MRL を大幅に下回ります。

参考文献

1. GB/T 18932.19-2003, "Determination of Chloramphenicol Residues in Honey -LC/MS/MS Method."
2. "Commission Decision" 2003/181/ED of 13 March 2003, Off. J. Eur. Commun. L71/17 (2003).
3. "Handbook of Food Analysis: Residue and Other Food Component Analysis," CRC Press, 2004, pgs 937, 940.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Printed in Japan
February 16, 2009
5990-3615JAJP



Agilent Technologies