

蜂蜜中のクロラムフェニコールの検出、確認、 および定量

Agilent 1260 Infinity II LC システムおよび
Agilent Ultivo LC/TQ

著者

Vikrant Goel
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II LC システムを Agilent Ultivo LC/TQ と組み合わせることで、蜂蜜サンプルに含まれるピコグラム単位の微量のクロラムフェニコール (CAP) を分析できることを実証します。本メソッドは、コンパクトな形状ながらも、比類ない分析結果を得られる Agilent Ultivo LC/TQ で開発しました。このアプリケーションは、食品産業における蜂蜜の製造、加工、および商用試験時のルーチン分析のほか、学術的目的に最適です。シンプルな液液抽出法 (LLE) ベースのサンプル前処理を用いて、マトリックス中の定量下限 (LOQ) 50 ppt を達成することができます。

はじめに

CAP はタンパク質合成を阻害する広域スペクトル抗生物質です。長期間の曝露により、稀ではあるものの重篤な血液疾患 (再生不良性貧血) と骨髄の損傷をもたらします。CAP はヒトに対する著しい毒性作用を示すため、最小要求性能限界 (MRPL) 0.3 ppb を超える濃度で食品中に存在することが禁止されています^{1,2}。

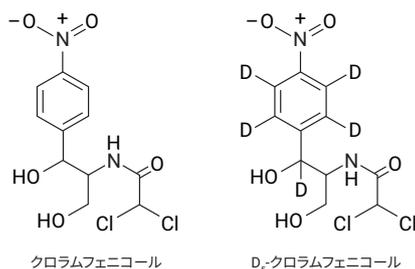


図 1. CAP および重水素化 CAP

トリプル四重極 LC/MS システムは、蜂蜜中 CAP の確認に関して、米国、EU、FSSAI、およびその他の国のガイドラインに準拠した標準分析法です。トリプル四重極 LC/MS システムの画期的な進化型である Ultivo LC/TQ をこのアプリケーションに用いました。Ultivo LC/TQ で得られる感度は、EU の食品関連規制で定められた MRPL を十分上回っています。

本ワークフローでは LLE のみを用いました。一方、従来のメソッドでは、LLE と固相抽出法 (SPE) が併用されます。SPE ステップを排除することで、シンプルでコスト効率に優れ、時間を節約できます (図 2)^{3,4,5}。

Ultivo LC/TQ を使用する本ソリューションでは、ばらつきを抑えるために、構造上類似した内部標準として CAP-d₅ を用いて、特異的かつ線形で、堅牢かつ信頼性の高い結果を得られました。

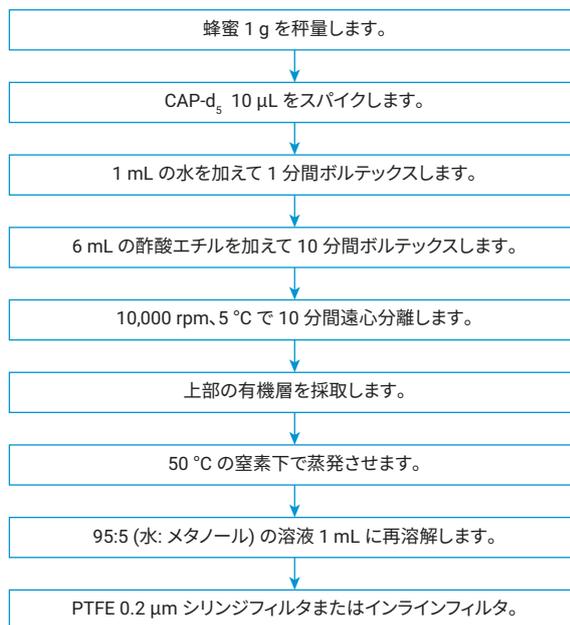


図 2. LLE ベースのサンプル前処理

実験方法

使用した溶媒を次に示します。アセトニトリル (Honeywell, LC/MS、部品番号 34967)、メタノール (Honeywell, LC/MS、部品番号 34966)、水 (Millipore, Milli-Q)、酢酸エチル (AR グレード、Rankem)、およびクロラムフェニコール (Agilent Technologies、部品番号 5091-0591)。CAP の測定用希釈溶液はすべて 100 % メタノールで調製しました。

装置構成

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプラ (G7129C)
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)
- Agilent Ultivo LC/TQ および AJS イオン源 (G6465A)

表 1. HPLC グラジエントメソッド

| パラメータ | 設定値 | | |
|--------|---|----------|--------------|
| カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm (p/n 685775-922) | | |
| 移動相 | A) 水 B) メタノール, 500 µL/min | | |
| 注入量 | 25 µL | | |
| カラム温度 | 50 °C | | |
| グラジエント | 時間 (分) | 水 (100%) | メタノール (100%) |
| | 0.0 | 95 | 5 |
| | 2.5 | 2 | 98 |
| | 3.0 | 2 | 98 |
| | 3.5 | 95 | 5 |
| | 5.0 | 95 | 5 |

結果と考察

300 ppt が望ましい MRPL と定められていることを考慮し、一般レベルとして 100 ppt が多くの分析ラボにおいてルーチン LOQ として設定されています。提案メソッドの検出下限 (LOD) は 25 ppt です。しかし、蜂蜜の多様な性質を考慮すると、LOQ 50 ppt が推奨されます。図 3 の MRM クロマトグラムは、希釈溶液のブランク、LOD、および LOQ を示します。さらに、図 4 に示すとおり、再現可能な溶出プロファイルが希釈剤に種々の濃度の CAP を注入することで得られました。

表 3. Agilent Ultivo LC/TQ の条件

| パラメータ | 設定 | |
|--------------------|-------------------|--------|
| イオン化モード | AJS (ネガティブ) | |
| ネブライザガス | 35 psi | |
| ドライガス | 350 °C で 10 L/min | |
| ソースガス | 400 °C で 12 L/min | |
| キャピラリ電圧 | 2,000 V | |
| ノズル電圧 | 1,500 V | |
| フラグメンタ電圧 | 90 V | |
| CAV | 9 V | |
| ドウェルタイム | 50 msec | |
| 分解能 | Unit/Unit | |
| 成分 | MRM トランジション | CE (V) |
| CAP | 321/151.9 | 9 |
| CAP | 321/257.1 | 2 |
| CAP | 321/194.0 | 3 |
| CAP-d ₅ | 326/157.0 | 9 |

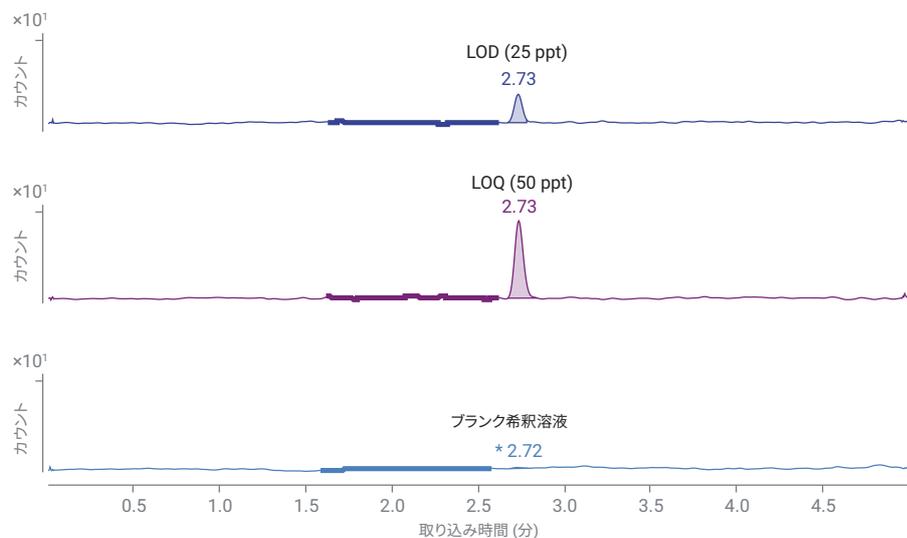


図 3. Agilent Ultivo LC/TQ での CAP の感度

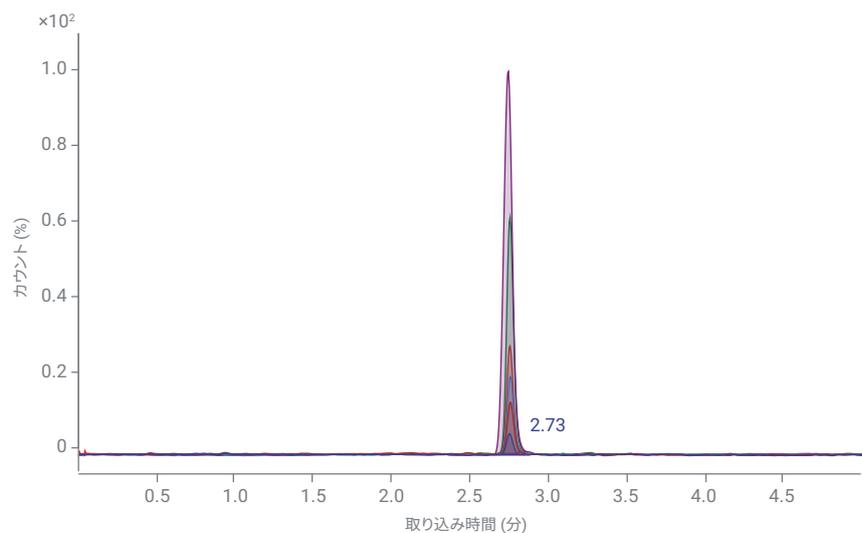


図 4. CAP の種々の濃度の重ね表示

キャリブレーションおよび直線性

検量線の直線性のプロットが、50 ~ 600 ppt の濃度全体の相対レスポンス係数 (CAP 対 CAP-d₅ の面積比) に対して生成されました (図 5)。データを確実に取得するために、各濃度で 3 回繰り返し取得し、LOQ レベルでは 6 回繰り返し測定しました。規制内容に従って、1 つのクオンティファイア、2 つのクオリファイアおよび MRM 比率を含むキャリブレーションテーブルのスクリーンショットを図 6 に示します。

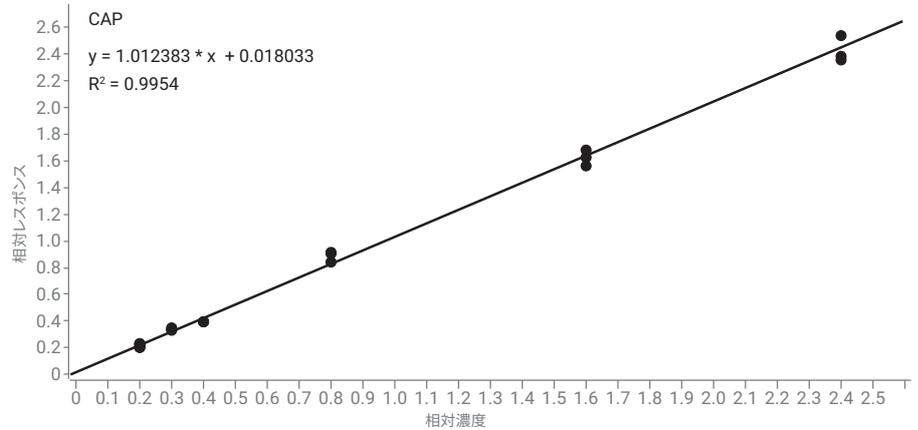


図 5. 50 ~ 600 ppt までの直線性プロット (R² = 0.9953)

蜂蜜サンプル中の定量

本メソッドでは市販の蜂蜜を用いました。蜂蜜はインドのデリーのローカルショップ (ブランド 1、ブランド 2、およびブランド G) や、路面店 (ローカル、ローカル 2) から購入したものです。サンプルはすべて 3 回繰り返し測定しました。図 7 は、CAP が EU MRPL 水準の 300 ppt を下回る水準にある結果が報告されたことを示しています。

| Sample | | | CAP Met. | CAP Results | | | | Qualifier | Qualifier | CAP-IS (ISTD) R. |
|--------|-------|------------------------|------------|-------------|-------------|----------|------------------|-----------|-----------|------------------|
| Type | Level | Acq. Date-Time (Inst.) | Exp. Conc. | RT | Calc. Conc. | Accuracy | ISTD Resp. Ratio | Ratio | Ratio | RT |
| Blank | | 8/24/2018 4:18 AM | | 2.59 | 0.00 | | 0.0061 | | 208.3 | 2.72 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 1:54 AM | 50.00 | 2.73 | 43.47 | 86.9 | 0.2061 | 87.3 | 47.7 | 2.73 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 2:06 AM | 50.00 | 2.73 | 42.73 | 85.5 | 0.2031 | 110.6 | 44.4 | 2.73 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 2:12 AM | 50.00 | 2.73 | 48.06 | 96.1 | 0.2244 | 92.0 | 38.5 | 2.73 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 2:18 AM | 50.00 | 2.73 | 48.88 | 97.8 | 0.2277 | 84.6 | 40.7 | 2.72 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 2:24 AM | 50.00 | 2.73 | 49.16 | 98.3 | 0.2288 | 104.3 | 47.7 | 2.73 |
| Cal | 1 | 8/24/2018 2:30 AM | 50.00 | 2.73 | 42.17 | 84.3 | 0.2008 | 80.7 | 39.1 | 2.73 |
| Cal | 2 | 8/24/2018 2:42 AM | 75.00 | 2.73 | 86.21 | 114.9 | 0.3768 | 88.0 | 41.5 | 2.72 |
| Cal | 2 | 8/24/2018 2:48 AM | 75.00 | 2.73 | 82.51 | 110.0 | 0.3621 | 105.0 | 43.3 | 2.73 |
| Cal | 2 | 8/24/2018 2:54 AM | 75.00 | 2.73 | 81.06 | 108.1 | 0.3563 | 87.4 | 47.4 | 2.72 |
| Cal | 3 | 8/24/2018 3:06 AM | 100.00 | 2.73 | 89.71 | 89.7 | 0.3908 | 96.7 | 48.9 | 2.72 |
| Cal | 3 | 8/24/2018 3:12 AM | 100.00 | 2.73 | 89.93 | 89.9 | 0.3917 | 100.9 | 39.7 | 2.72 |
| Cal | 3 | 8/24/2018 3:18 AM | 100.00 | 2.73 | 91.81 | 91.8 | 0.3992 | 90.0 | 38.6 | 2.72 |
| Cal | 4 | 8/24/2018 3:24 AM | 200.00 | 2.73 | 219.27 | 109.6 | 0.9086 | 103.6 | 47.5 | 2.72 |
| Cal | 4 | 8/24/2018 3:36 AM | 200.00 | 2.73 | 217.76 | 108.9 | 0.9025 | 104.5 | 46.3 | 2.72 |
| Cal | 4 | 8/24/2018 3:42 AM | 200.00 | 2.73 | 205.06 | 102.5 | 0.8518 | 109.8 | 46.2 | 2.72 |
| Cal | 5 | 8/24/2018 3:48 AM | 400.00 | 2.72 | 399.33 | 99.8 | 1.6281 | 90.5 | 43.9 | 2.71 |
| Cal | 5 | 8/24/2018 3:54 AM | 400.00 | 2.72 | 380.87 | 95.2 | 1.5543 | 95.3 | 46.6 | 2.71 |
| Cal | 5 | 8/24/2018 4:00 AM | 400.00 | 2.71 | 412.19 | 103.0 | 1.6795 | 94.3 | 43.7 | 2.71 |
| Cal | 6 | 8/24/2018 11:48 AM | 600.00 | 2.73 | 583.31 | 97.2 | 2.3633 | 94.6 | 42.2 | 2.72 |
| Cal | 6 | 8/24/2018 11:54 AM | 600.00 | 2.72 | 584.87 | 97.5 | 2.3696 | 98.3 | 43.3 | 2.71 |
| Cal | 6 | 8/24/2018 12:00 PM | 600.00 | 2.71 | 626.66 | 104.4 | 2.5366 | 95.1 | 41.4 | 2.71 |

図 6. CAP 50 ~ 600 ppt のキャリブレーションテーブル

蜂蜜サンプルからの回収

RT が 2.73 ± 0.1 分に分離ピークのないサンプルと EU のガイドラインを超えるイオン比は、陰性サンプルと考えられます⁶。ブランド G のサンプルの CAP レベルは LOD 値を超えており、ローカル 2 のサンプルの CAP レベルは LOQ 値を超えていました。さらに、図 7 に示すとおり、蜂蜜サンプルに 50 ppt の CAP を添加することでスパイク実験を実施しました。表 3 に示すスパイク試験では、全 5 サンプルで良好な回収率 (80 ~ 120 %) が得られたことから、本メソッドは蜂蜜中 CAP のルーチン分析に適していることが確認されました。

結論

LOQ は EU-MRPL の 1/6 です。Agilent InfinityLab Poroshell 120 2.7 μm カラムを用いた低圧での UHPLC 分離を行いました。LLE ベースのサンプル前処理は簡単で、時間短縮が可能です。EU の基準に従い、蜂蜜サンプル中の CAP を分析できました。

| Sample | | | CAP Results | | | Qualifi... | Qualifi... | CAP-IS (...) |
|---------------|--------|----------------------|-------------|----|-------------|------------|------------|--------------|
| Name | Type | Acq. Date-Time | RT | MI | Final Conc. | Ratio | Ratio | RT |
| Brand1 | Sample | 8/24/2018 12:12 P... | 2.973 | | 4.55 | | | 2.721 |
| Brand1 | Sample | 8/24/2018 12:18 P... | 2.978 | | 15.36 | 102.6 | | 2.721 |
| Brand1 | Sample | 8/24/2018 12:24 P... | 2.431 | | 23.49 | 63.9 | | 2.726 |
| Brand1_Spike | Sample | 8/24/2018 12:30 P... | 2.732 | | 40.89 | 101.6 | 47.1 | 2.726 |
| Brand1_Spike | Sample | 8/24/2018 12:36 P... | 2.727 | | 41.76 | 95.4 | 54.6 | 2.726 |
| Brand1_Spike | Sample | 8/24/2018 12:42 P... | 2.732 | | 41.39 | 77.4 | 51.9 | 2.726 |
| Brand2 | Sample | 8/24/2018 12:48 P... | 2.978 | | 89.47 | 15.6 | 3.3 | 2.726 |
| Brand2 | Sample | 8/24/2018 12:54 P... | 2.431 | | 67.75 | 55.8 | 146.5 | 2.726 |
| Brand2 | Sample | 8/24/2018 1:00 PM | 2.983 | | 128.01 | 15.8 | 9.6 | 2.726 |
| Brand2_Spike | Sample | 8/24/2018 1:06 PM | 2.732 | | 44.81 | 93.7 | 36.4 | 2.721 |
| Brand2_Spike | Sample | 8/24/2018 1:12 PM | 2.732 | | 42.73 | 87.3 | 57.8 | 2.726 |
| Brand2_Spike | Sample | 8/24/2018 1:18 PM | 2.727 | | 38.41 | 93.1 | 49.7 | 2.726 |
| BrandG | Sample | 8/24/2018 1:24 PM | 2.727 | | 25.90 | 100.0 | 47.1 | 2.726 |
| BrandG | Sample | 8/24/2018 1:30 PM | 2.732 | | 30.59 | 96.2 | 49.4 | 2.726 |
| BrandG | Sample | 8/24/2018 1:36 PM | 2.732 | | 28.61 | 112.0 | 57.6 | 2.726 |
| BrandG_Spi... | Sample | 8/24/2018 1:42 PM | 2.732 | | 74.66 | 90.6 | 49.7 | 2.720 |
| BrandG_Spi... | Sample | 8/24/2018 1:48 PM | 2.727 | | 77.49 | 103.1 | 51.1 | 2.721 |
| BrandG_Spi... | Sample | 8/24/2018 1:54 PM | 2.732 | | 83.27 | 107.3 | 42.1 | 2.726 |
| Local | Sample | 8/24/2018 2:00 PM | 2.743 | | 0.00 | 318.5 | | 2.726 |
| Local | Sample | 8/24/2018 2:06 PM | 2.732 | | 2.10 | | 156.5 | 2.726 |
| Local | Sample | 8/24/2018 2:12 PM | 2.620 | | 0.00 | 390.9 | 72.5 | 2.726 |
| Local_Spike | Sample | 8/24/2018 2:18 PM | 2.732 | | 48.68 | 77.2 | 39.2 | 2.726 |
| Local_Spike | Sample | 8/24/2018 2:24 PM | 2.732 | | 41.78 | 113.2 | 53.8 | 2.726 |
| Local_Spike | Sample | 8/24/2018 2:30 PM | 2.732 | | 51.07 | 75.9 | 55.6 | 2.726 |
| Local2 | Sample | 8/24/2018 2:36 PM | 2.732 | | 130.33 | 95.7 | 40.3 | 2.726 |
| Local2 | Sample | 8/24/2018 2:42 PM | 2.732 | | 142.36 | 99.0 | 41.4 | 2.726 |
| Local2 | Sample | 8/24/2018 2:48 PM | 2.727 | | 164.55 | 88.2 | 47.4 | 2.721 |
| Local2_Spike | Sample | 8/24/2018 2:54 PM | 2.732 | | 193.57 | 100.3 | 44.1 | 2.726 |
| Local2_Spike | Sample | 8/24/2018 3:00 PM | 2.732 | | 207.12 | 83.0 | 45.5 | 2.726 |
| Local2_Spike | Sample | 8/24/2018 3:06 PM | 2.732 | | 197.05 | 96.4 | 44.8 | 2.726 |

図 7. 市場サンプルおよび LOQ レベルでスパイクした市場サンプル

表 3. 種々の蜂蜜サンプル中のクロラムフェニコール

| 市場サンプル | プレスバイク濃度 (a) | ポストスパイク濃度 (b) | 回収率 (%) = 100(b - a)/50 |
|--------|--------------|---------------|-------------------------|
| ブランド 1 | ND | 41.35 ppt | 82.69 % |
| ブランド 2 | ND | 41.98 ppt | 83.96 % |
| ブランド G | 28.37 ppt | 78.47 ppt | 100.20 % |
| ローカル | ND | 47.18 ppt | 94.35 % |
| ローカル 2 | 145.75 ppt | 199.25 ppt | 107.0 % |

参考文献

1. Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed. *EFSA Journal* **2014**, 12(11), 3907.
2. Commission Decision 2003/181/EC.
3. Fang, Y. *et al.* Detection, Confirmation, and Quantification of Chloramphenicol in Honey and Shrimp at Regulatory Levels Using Quadrupole and Ion Trap LC/MS Application. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5988-9920EN, **2007**.
4. Zhao, L. *et al.* Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-3615EN, **2009**.
5. Jin-Lan, S. *et al.* Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC-MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method. *Agilent Technologies Application Note*, publication note 5991-0013EN, **2012**.
6. SANTE/11813/2017.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, September 6, 2019
5994-1317JAJP