

LC-MSによるハチミツ中のクロラムフェニコールの分析

Analysis of chloramphenicol in honey using LC-MS

クロラムフェニコールは広い抗菌スペクトルを示す有用な抗生物質ですが、重篤な副作用を有するため、FAO/WHOでは健康危害の観点から食品へのクロラムフェニコールの残留は認められていません。2006年に施行される残留農薬等のポジティブリスト制度においても、“規定する試験法によって試験した場合、食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質”に含まれてい

ます。また、クロラムフェニコールは畜水産物だけでなく、ハチミツやロイヤルゼリーなどからの検出例がしばしば報告されており、平成18年度輸入食品等モニタリング計画の対象成分に指定されています。

ここでは、LC-MSによるハチミツ中のクロラムフェニコールの分析例をご紹介します。

M.Kobayashi

Fig.1にはクロラムフェニコールの負イオンエレクトロスプレーイオン化(ESI)法によるマススペクトルを示しました。m/z 321に脱プロトン分子[M-H]⁻、m/z 357には塩素イオン付加型分子[M+Cl]⁻が観察されます。告示試験法(平成17年11月改正)では、移動相条件として“アセトニトリル及び10 mmol/Lのギ酸アンモニウム水の混液(3:7)を用いる。クロラムフェニコールが約5分間で流出する流速に調整する。”と記載されていますが、夾雑成分との分離を考慮し、移動相をアセトニトリル及び

10 mmol/Lのギ酸アンモニウム水の混液(25:75)に変更して分析を行いました(流量0.2 mL/min)。Fig.2にはm/z 321をモニタイオンとしたクロラムフェニコール(10 µg/L)の選択イオン検出(SIM)クロマトグラムを示しました。この条件では、クロラムフェニコールは7.9分に溶出します。

Fig.4(a)には0.5~10 µg/LのSIMクロマトグラムを示しました。この範囲での検量線は良好な直線性(相関係数0.9999以上)を示し、濃度1 µg/Lにおける再現性(n=5)はRSD% < 5%以下と良好でした。

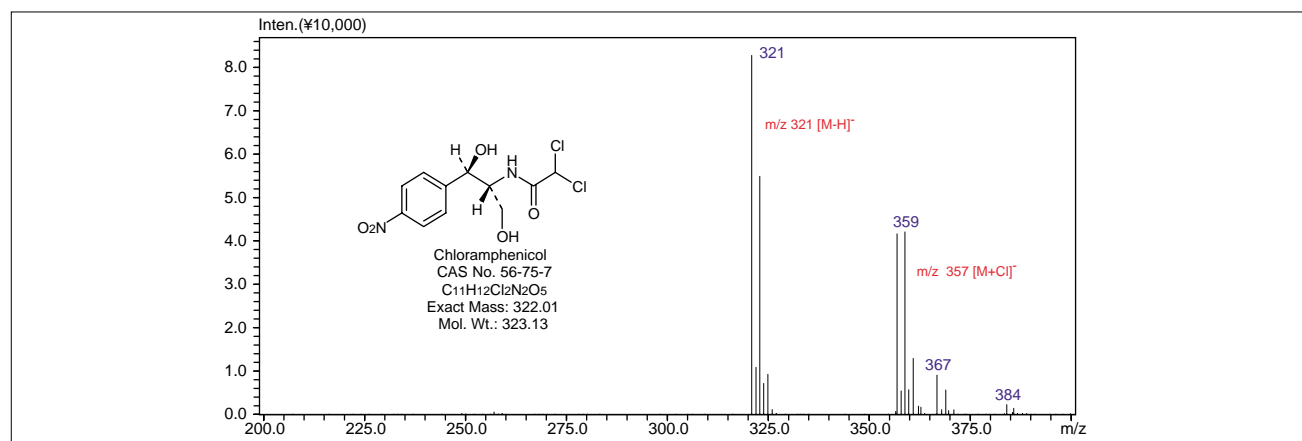


Fig.1 クロラムフェニコールの負イオンESI マススペクトル
ESI mass spectrum (negative-mode) of chloramphenicol

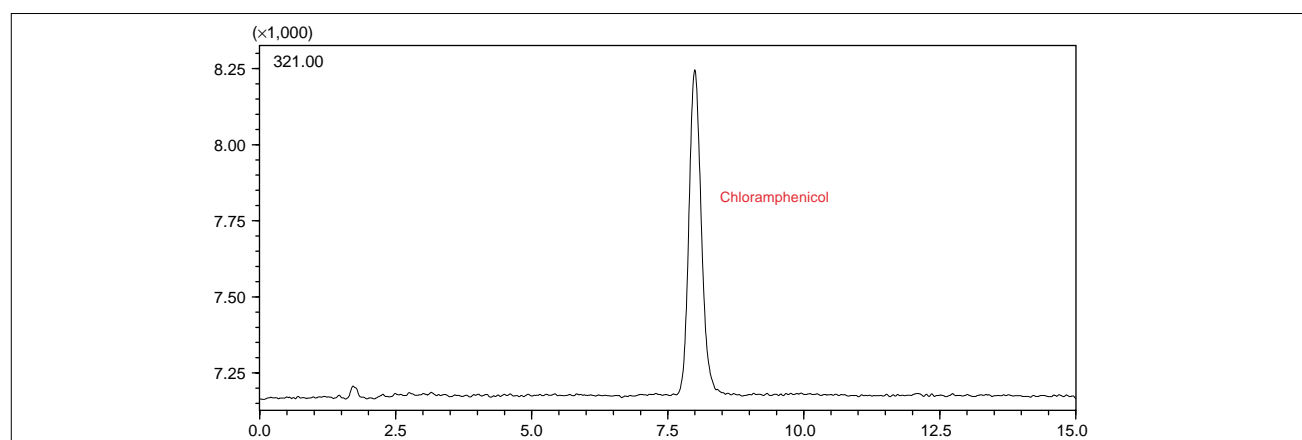


Fig.2 クロラムフェニコールのSIM クロマトグラム(10 µg/L, 3 µL 注入)
SIM chromatogram of chloramphenicol (10 µg/L, 3 µL injected)

ハチミツの精製法をFig.3に示しました。ハチミツ抽出液をジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム (225 mg) により精製するという極めて簡便な前処理方法を用いています。20%メタノールでミニカラムを洗浄後、60%メタノールでクロラムフェニコールを溶出するという方法も検討しましたが、ハチミツに添加したクロラムフェニコールの回収率が76%と低くなりましたので、回収率向上のためにミニカラムを水で洗浄後、メタノール10 mLで溶出するという精製法を用いました。Fig.4(b)には、①:ハチミツ試料(クロラムフェニコール未添加)、②:ハチミツ試料にクロラムフェニコールを10 µg/Lの濃度になるように添加した試料、③:5 gのハチミツに10 ngのクロラムフェニコールを添加したハチミツ試料 (10 µg/L)、④:クロラムフェニコール標準品 (10 µg/L) のLC-MS分析結果を示しました。今回の精製法では、④の精製後のハチミツ試料に添加したクロラムフェニコールの回収率は95%となり顕著なイオン化阻害は認めませんでした。

④のハチミツに添加したクロラムフェニコールの回収率

も94%と良好な結果を示しました。また、④の未添加ハチミツ中にも若干のクロラムフェニコールが観察されますが、定量値としては0.50 µg/L程度となります。LC-MSを用いることで、このような簡易の前処理方法でも、ハチミツ中のクロラムフェニコールを選択的に検出することができます。

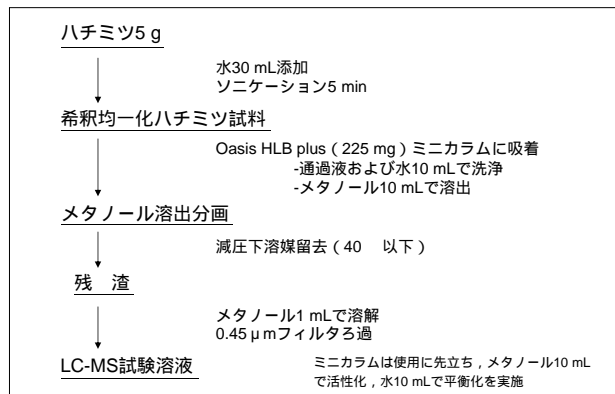


Fig.3 ハチミツ中のクロラムフェニコール前処理手順
Isolation procedure for chloramphenicol in honey

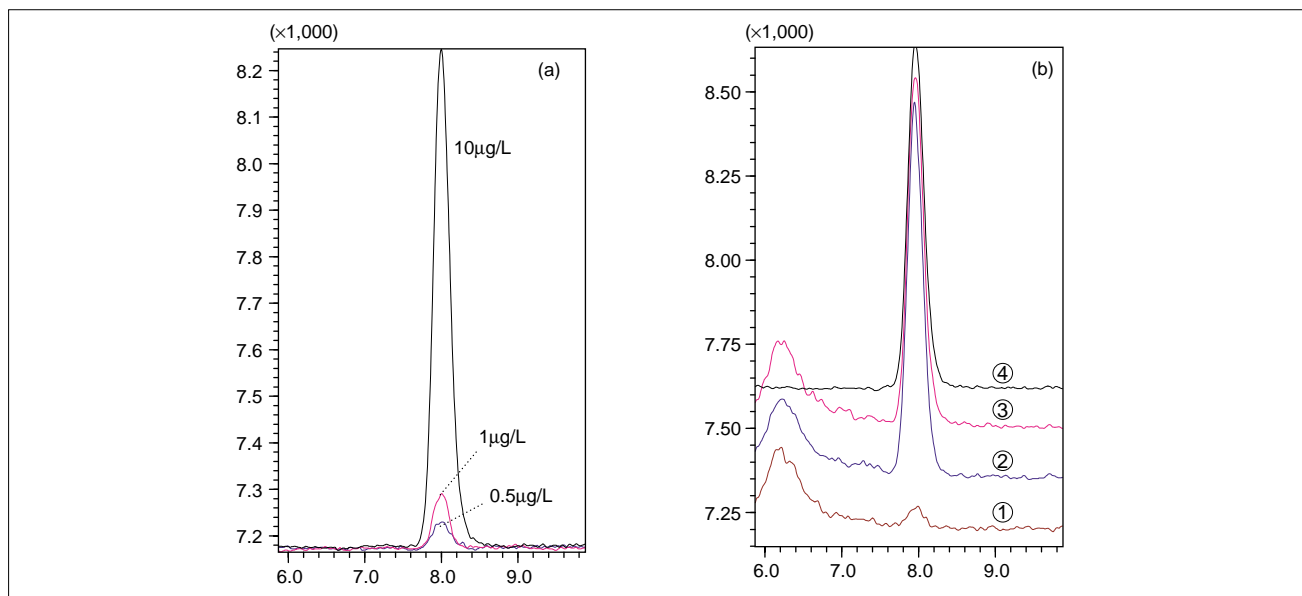


Fig.4 クロラムフェニコール標準品のSIMクロマトグラム(0.5, 1, 10 µg/L) (a)およびハチミツ中のクロラムフェニコール分析結果(①:ハチミツブランク, ②:ハチミツブランク+クロラムフェニコール ③:ハチミツ+クロラムフェニコール ④:クロラムフェニコール標準品) (b)
SIM chromatograms of chloramphenicol standard (0.5, 1 and 10 µg/L) (a) and analytical results of chloramphenicol in honey (1: honey blank, 2: honey blank + chloramphenicol, 3: honey + chloramphenicol, 4: chloramphenicol standard) (b)

Table 1 分析条件
Analytical conditions for LC-MS

Column	: Shimadzu Shim-pack VP-ODS (2.0 mm I.D. × 150 mm L.)	Column temperature	: 40 °C
Mobile phase	: 10 mmol/L ammonium formate water / acetonitrile = 75 / 25	Block heater temperature	: 200 °C
Flow rate	: 0.2 mL/min	Drying gas pressure	: 0.1 MPa
Injection volume	: 3 µL	Q-array RF voltage	: Scan-mode
Probe voltage	: -3.5 kV (ESI-Negative mode)	SIM	: m/z 321 (0.5 sec)
CDL temperature	: 250 °C		
Nebulizing gas flow	: 1.5 L/min		
CDL voltage	: -20 V		

初版発行：2006年6月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津分析コールセンター

●東京 ☎(03)3219-1691
●京都 ☎(075)813-1691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は右に示す島津WEBで閲覧できます。

会員制情報提供サービス「Shim-Solutions Club」にご登録下さい。
<http://solutions.shimadzu.co.jp/>
いろいろな情報提供サービスが受けられます。

3100-06601-11A-IK
2006.6