

Application News

No. C199

LC/MS

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた エビおよび鶏卵抽出液中の クロラムフェニコール分析

クロラムフェニコールは、広範な抗菌スペクトルを有する抗生物質であり、家畜の病気の予防および治療に動物用医薬品として幅広く利用されています。

ポジティブリスト制度が導入された際に、このクロラムフェニコールは、食品中に不検出とする成分として設定されましたが平成 26 年の見直しの際には、遺伝毒性を有し、発がん性の可能性を否定できないことなどから、許容一日摂取量 (ADI) を設定すべきでない成分として再評価され、引き続き食品に含有されるものであってはならない成分とされました。

また、生体内でクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体が加水分解され、クロラムフェニコールを生成することも確認されたことから、クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体も測定対象に追加されることとなり、平成 29 年にクロラムフェニコールの試験方法が改正されました (平成 29 年厚生労働省告示第 49 号)。今回は、改正された試験法に準拠し、エビおよび鶏卵中のクロラムフェニコールを定量した分析例を紹介いたします。

H.Horiike

■ 試料の前処理

エビは細切り均一化し、10g を量り採りました。また、鶏卵は、よく混合し均一化し 10g を量り採りました。

それぞれにメタノールを加え、細切均一化した後、遠心分離して上澄みを取り出す操作を 2 回行った後、メタノールにて 100 mL に定容しました。4 mL を採取し、溶媒除去後、リン酸緩衝液 9 mL、β-グルクロニターゼ溶液 1 mL を加え加水分解した後、更に酢酸エチルを加え遠心分離し酢酸エチル層を取り出しました。酢酸エチルによる抽出を 2 回行った後、ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体カラムを用いて精製し、測定用試料としました。

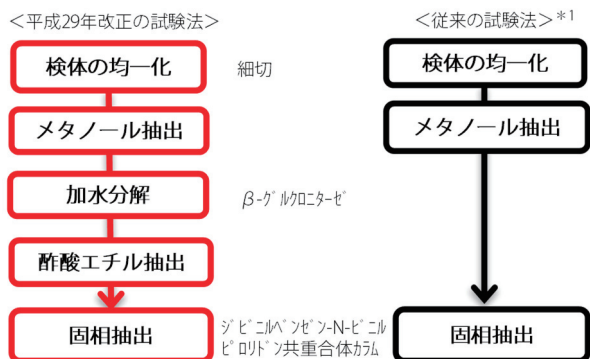


図1 前処理操作

■ クロラムフェニコールおよびクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体混合標準液の分析

クロラムフェニコールおよびクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体混合標準液 1 μg/L 濃度を測定し得られた MRM クロマトグラムを図 2 に示しました。クロラムフェニコールの保持時間が 4 min になるように分析条件を設定しました。

試験法の改正と同時に留意事項が通知されており、酵素由来の妨害ピークが定量に影響を及ぼさないこと、またクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体が前処理で十分加水分解されていることを予め確認しておく必要があります (生食基発 0223 第 3 号、平成 29 年 2 月 23 日)。

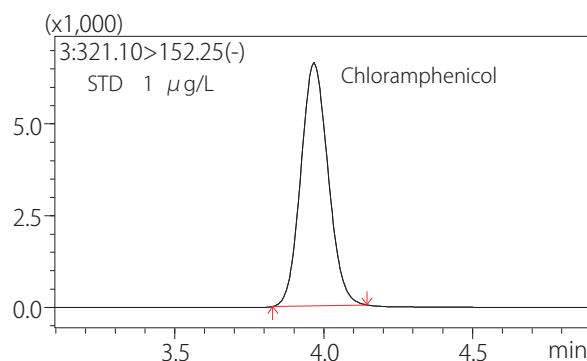
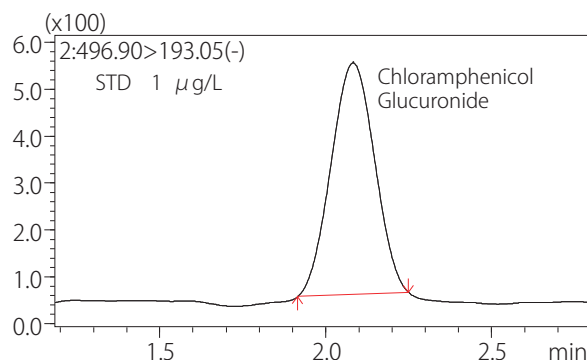


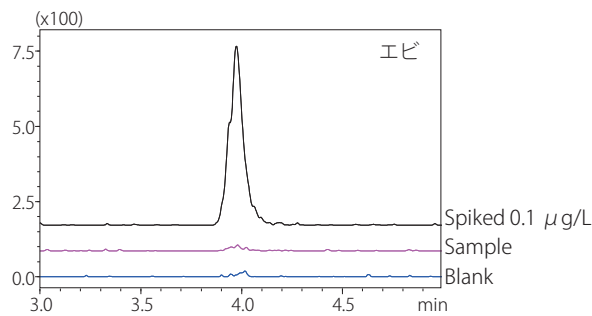
図2 クロラムフェニコールおよびクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体混合標準液の各 MRM クロマトグラム

*1 平成 17 年厚生労働省告示第 499 号
昭和 34 年厚生省告示 370 号

表1 分析条件

Column	: Shim-pack™ HR-ODS (150 mmL×2.1 mm.i.d., 3 μm, Shimadzu Corp.)
Mobile phases	: 10 mmol/L ammonium acetate water / Acetonitrile = 70 / 30 (v/v)
Flow rate	: 0.35 mL/min
Column temperature	: 40 °C
Injection volume	: 5 μL
Probe voltage	: -1.0 kV (ESI-Negative)
DL temperature	: 300 °C
Block heater temperature	: 500 °C
Interface temperature	: 400 °C
Nebulizing gas flow	: 3 L/min
Drying gas flow	: 10 L/min
Heating gas flow	: 10 L/min
MRM transition	: Chloramphenicol m/z 321.10>152.25 (定量) 321.10>257.05 (確認) Chloramphenicol glucuronide m/z 496.90>193.05 (定量) 496.90>113.00 (確認)

■ エビおよび鶏卵の分析



Chloramphenicol	0.1 μg/L添加
回収率	87.9 %
%RSD	7.6 %

図4 添加回収試験結果 (n=3、エビ)

■ 検量線の直線性

クロラムフェニコール 0.1~2 μg/L、クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体 0.5~10 μg/L の各濃度範囲における5点の検量線を作成しました。

LC/MS 法としてクロラムフェニコールの畜農産物における検出下限は 0.005 mg/kg とされており図3に示す通り、定量下限として 0.1 μg/L から良好な直線性が得られました。

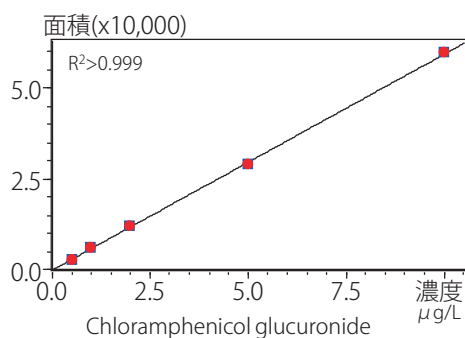
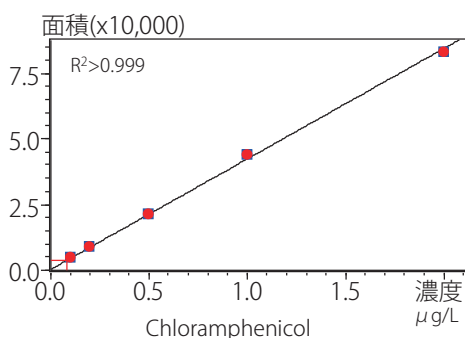
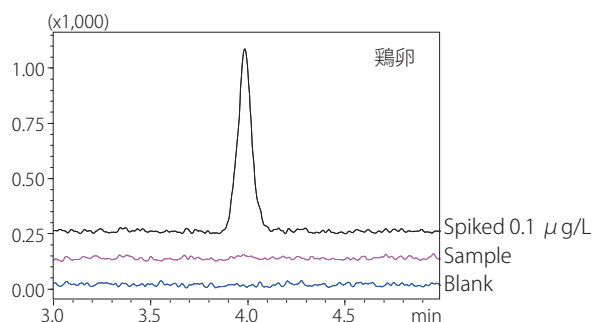


図3 検量線



Chloramphenicol	0.1 μg/L添加
回収率	95.5 %
%RSD	13.5 %

図5 添加回収試験結果 (n=3、鶏卵)

測定の結果、市販のエビ（インド産ブラックタイガー）および鶏卵（日本国産）の両ブランク試料において、クロラムフェニコールは検出されませんでした。よって、両ブランク試料に、それぞれ 0.1 μg/L 濃度になるようクロラムフェニコール標準溶液のみを添加し測定を行い、回収率 85%以上得られることが確認できました。

また、ブランク溶媒にクロラムフェニコールグルクロン酸抱合体のみを添加し、同前処理を行い測定した結果、クロラムフェニコールグルクロン酸抱合体は不検出となり、一方でクロラムフェニコールが検出されたことから、今回実施した前処理によって十分に加水分解できていることが確認できました。

このように LCMS™-8050 を用いることで、0.1 μg/L 濃度より精度良く分析が可能です。

Shim-pack および LCMS は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年9月

島津コールセンター ☎0120-131691
(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。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。