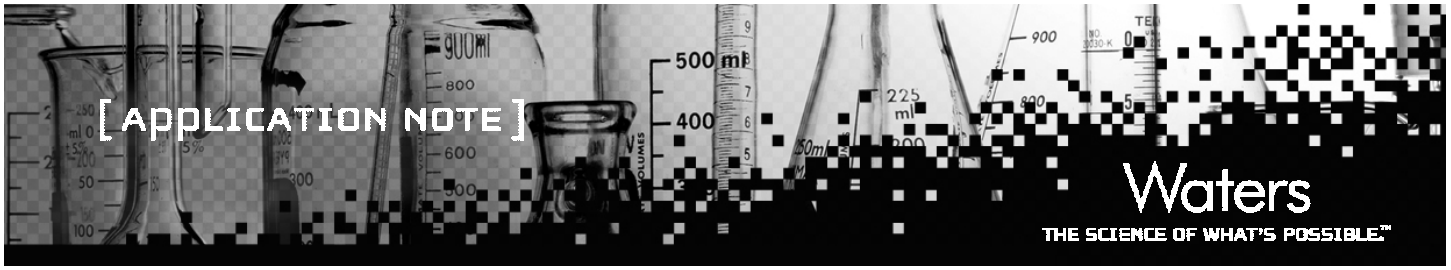


ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XE による 鶏肉中のクロラムフェニコールの分析

No.720001483J

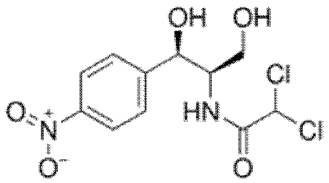
概要

クロラムフェニコール(CAP)は安価で広範囲に使用されている抗生物質です。1947年に土壌中のバクテリアであるStreptomyces venezuelaeから分離され、その後合成によって製造されるようになりました。再生不良性貧血や薬物に対する過敏症などの副作用をもたらす可能性があるため、[1]人間に対する使用は、その効果がリスクに勝る場合においてのみ許可されています。

EUでは、肉製品などに対するCAPのMRL(Maximum Residue Limit)は設定されていませんでしたが、EU Council regulation 2377/90/EECに掲載されています。1994年からは加工に用いられる動物への使用が禁止されました。EU Decision 2003/181/EC では CAP に対する MRPL(Minimum Required Performance Limit)を0.3ppbとしています。しかしながら使用が禁止された1994年以降もCAPはエビ、蜂蜜、鶏肉などから検出されています。[2)3)]

CAPの分析においては可能な限り低濃度レベルでの定量と確認手法が要求されます。このアプリケーションノートではWaters ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XEを用いた鶏肉中のCAP分析のための前処理法と分析条件について説明します。

構造式



クロラムフェニコール(CAP)

分析条件

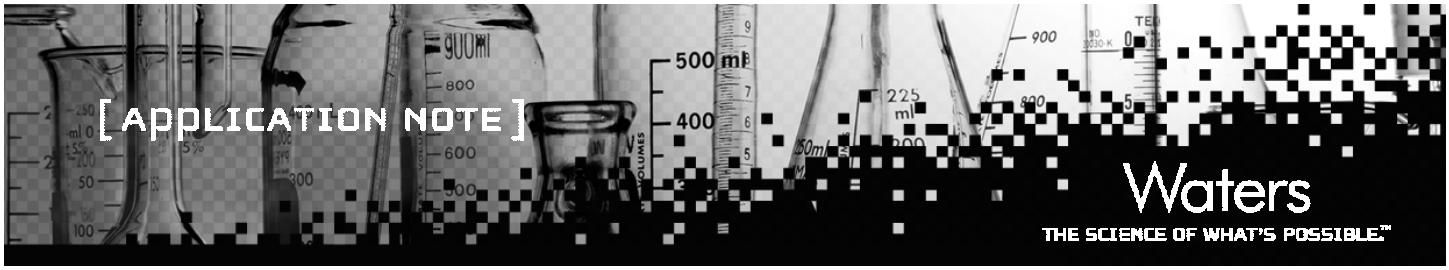
ACQUITY UPLC™ システム
カラム:ACQUITY UPLC™ BEH C_{18}
2.1×50 mm , 1.7 μm
カラム温度:55℃
移動相:A)水
B)メタノール
グラジェント:5%B(0分)
→100%B(1分)→100%B(1.5分)
サイクルタイム:3.0分
流速 :0.5 ml/min
注入量:10 μl

Quattro Premier™ XEタンデム四重極型質量分析計
イオン化 :ESI/ネガティブ
MRMパラメータ:

Transition	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Quantification	321	152	0.04	25	18
1st Confirmatory	321	257	0.04	25	12
IS (D_5-CAP)	326	157	0.04	25	18

ソフトウエア
MassLynx™4.1
TargetLynx™アプリケーションマネージャー

Acquity™
Ultra Performance LC



サンプルの前処理

鶏肉中のCAPの抽出手順

－細かく刻まれた鶏肉3±0.1gを正確に量り、30mLのスクリューキャップガラスバイアルに移します。

－200μLのD5-CAP(内部標準；ISTD)を加えて10分放置します。

－4mLのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を加えて1分間均質化します。

－1mLの塩化ナトリウム溶液を加えて15秒混ぜます。

－4mLのアセトニトリルを加えてボルテックスと超音波に10分間かけ、2200rpmで20分遠心分離します。

－上澄み液を35mLのスクリューキャップチューブに移し、10mLの水を加えます。

－10mLのヘキサンを加えて30秒間静かに振ります。

－このチューブを2200rpmで20分間遠心分離し、上側のヘキサン相を廃棄して酢酸エチル8mLを加えます。

－チューブを逆さにしながら1分間混ぜ、2200rpmで20分遠心分離します。

－上部の有機相を9mLのチューブに移し、65℃で窒素ガスを用いて溶媒除去します。

－5mLの水を加えてC18の固相抽出カートリッジに通します。

－溶出液を65℃で窒素ガスで乾燥させ、100μLの50%メタノール水溶液を加えて分析用のバイアルに移します。

－標準品は200μLの50%メタノール水溶液で希釈し分析します。

図1. 標準試料0.01pg/μLのS/N(マトリクスなし)

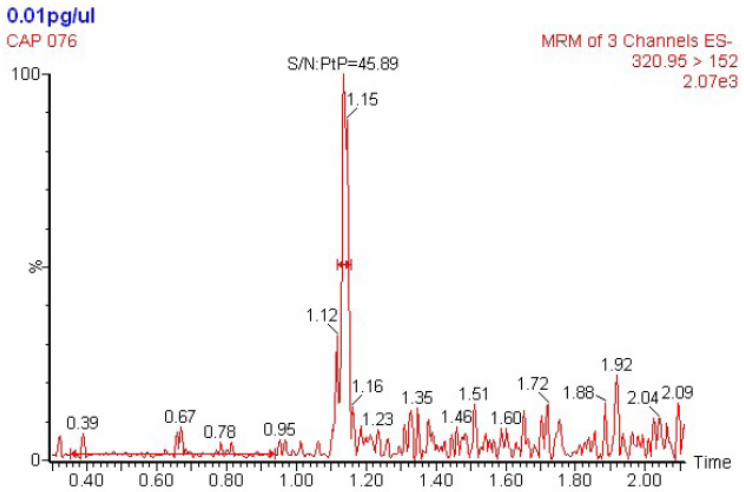


図1に0.01pg/μLのクロラムフェニコール標準溶液を分析したときのシグナル-ノイズ比(S/N)を示します。約45:1になっています。

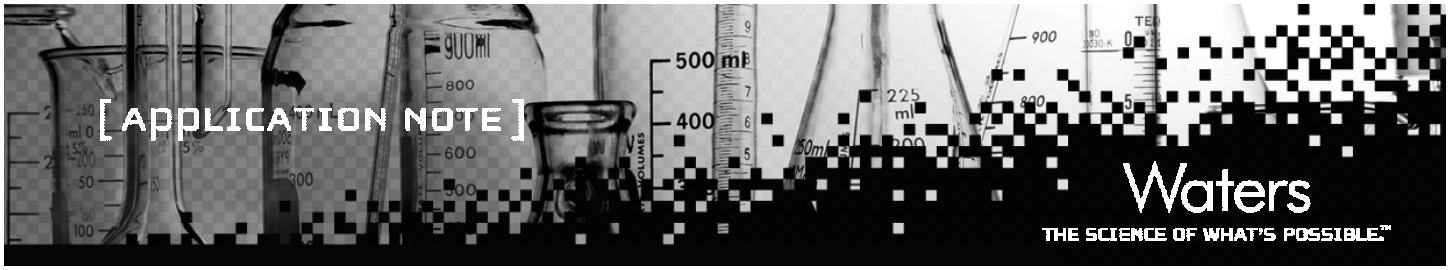
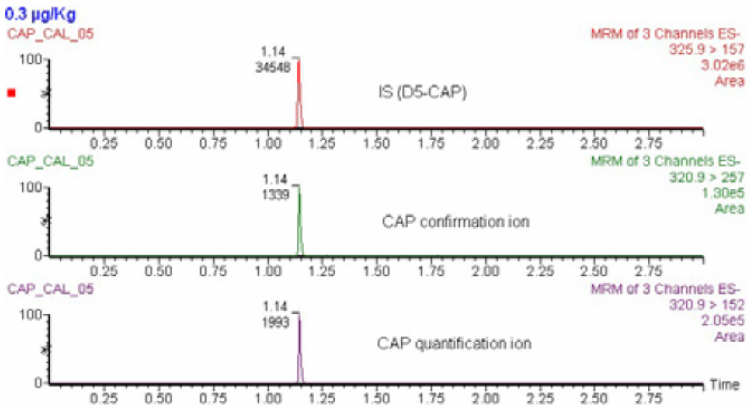


図2. 0.3μg/kgにおけるCAPとD_5-CAPの感度



CAPとD_5-CAPに用いられたMRMトランジションを図2に示します。内部標準であるD5-CAPには325.9＞157、CAP確認用として320.9＞257、CAP定量用として320.9＞152を使用しました。0.3μg/kg は MRPL(Minimum Required Performance Limit)に相当しますが、感度良く検出されていることがわかります。

図3. CAPの検量線

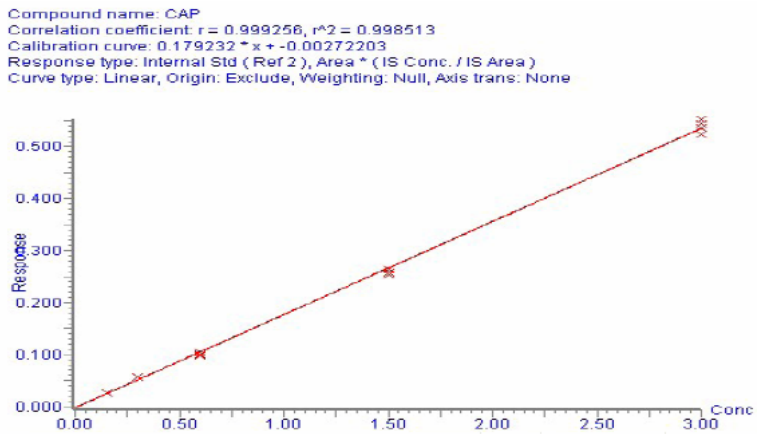
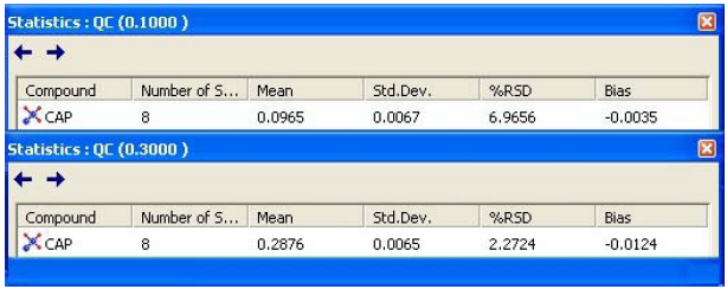


図3にCAPの検量線を示します。直線性は良好です。

図4. 鶏肉にスパイクしたCAPの再現性



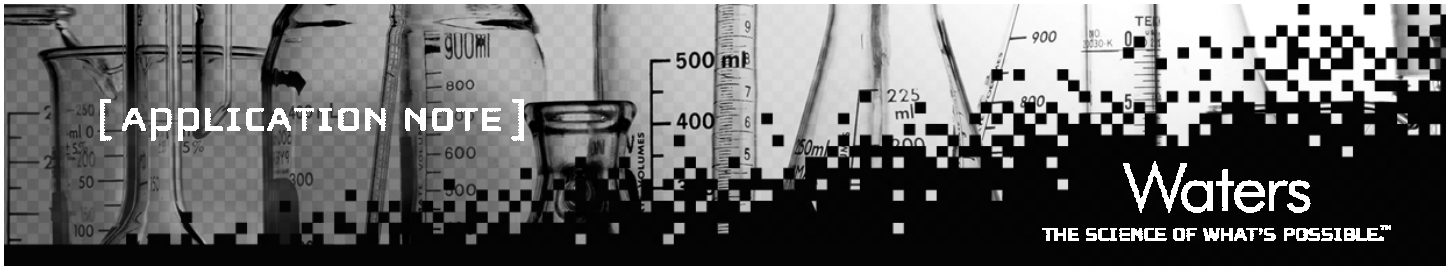
Statistics : QC (0.1000)

Compound	Number of S...	Mean	Std.Dev.	%RSD	Bias
CAP	8	0.0965	0.0067	6.9656	-0.0035

Statistics : QC (0.3000)

Compound	Number of S...	Mean	Std.Dev.	%RSD	Bias
CAP	8	0.2876	0.0065	2.2724	-0.0124

図4は0.1μg/kgと0.3μg/kgの2つの濃度におけるCAPの結果の再現性を示します。8回測定の平均値が0.0965と0.2876、標準偏差が0.0067と0.0065、%RSDが6.9656と2.2724となっており、良好な結果でした。



まとめ

鶏肉中のクロラムフェニコールの検出と定量のための条件を開発しました。Waters ACQUITY UPLC™とQuattro Premier™ XEの組み合わせは高感度かつ高選択的で再現性のある結果を生み出します。ここで得られた検出下限値はEU諸国の規制で要求されているレベルをクリアしています。

※このアプリケーションノートの内容は、DARDNI(UK)とWaters Corporation(UK)の共同研究によるものです。

参考文献

1. Roybal, J., in: Turnipseed, S. and Long, A (Eds.), *Analytical Procedures for Drug Residues in Food of Animal Origin*, Science Technology System, West Sacramento, CA (1998) 227-260.
2. The New York Times. World Briefing: Asia. P-6A, March 20, 2002.
3. www.foodproductiondaily.com/news/ng.asp?id=27078.
4. Commission Decision (EC) 96/23, Official Journal of the European Communities, No. **L221** (2002) 8.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡