[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

ACQUITY UPLC I-Class/ACQUITY QDa 検出器による牛乳中クロラムフェニコールの選択的・高感度スクリーニング

Eimear McCall,[1] Sara Stead,[1] Dominic Roberts,[1] and Jennifer A. Burgess[2]
[1] Waters Corporation, Manchester, UK
[2] Waters Corporation, Milford, MA, USA

ソリューションのメリット

- 牛乳中クロラムフェニコールの迅速スクリーニング
- 規制下限値以下の検出による定量的スクリーニング
- シンプルで高感度な規制抗生物質の検出
- 現行の LC 分析工程はそのままに簡便に MS 検出を実現

ウォーターズのソリューション

Oasis® HLB

ACQUITY UPLC® HSS C_{18} カラム

ACQUITY UPLC® I-Class システム

ACQUITY QDa® 検出器

キーワード

クロラムフェニコール、抗生物質、ACQUITY QDa、牛乳

はじめに

クロラムフェニコールは安価な広域抗生物質ですが、一部の感受性が高い人については毒性を伴うことがあり、発ガン性、遺伝毒性両方の疑いが持たれ、致命的な再生不良性貧血（骨髄の損傷）の症例も広く確認されています。このため、EU、カナダ、アメリカでは動物、昆虫、養殖水産物から製造される食品への使用が禁止されており、一部のアジア、南アメリカ諸国もこれに追随しています。EU では、Commission Decision 2003/181/EC で、食品中のクロラムフェニコールを検出するすべての分析法について、最低限必要な性能限界（MRPL）を 0.3 µg/kg と定めています。

乳製品を検査するラボでは、製品の保管寿命が短いために、大量のサンプルの迅速な分析が求められることから、伝統的に免疫学的な測定法（ELISA）が選択されています。ELISA は感度も良く迅速な分析法ですが、顕著なレベルで偽陽性が出現するという欠点があり、その頻度は、場合によっては 16% に上るという報告もあります。[1]

クロラムフェニコールは、免疫吸着材と阻害マトリックスの交差反応により牛乳中でしばしば誤検出され、不必要な製品の廃棄を招いています。これに対し、MS 検出ではより高感度な検出が可能で、クロラムフェニコールと夾雑物との識別を容易にします。さらに、液体クロマトグラフィー（LC）を組み合わせることにより、ガスクロマトグラフィーによるスクリーニングで必要な時間のかかる誘導体化も不要となります。このようなメリットをラボに採り入れていただくため、ここでは技術の進歩、特に装置の操作性と頑健性の改良に焦点を当てて ACQUITY QDa 検出器をいかに容易に従来からの LC 分析業務に組み込むことができるのか、また質量分析の知識をもつ専門家を必要としない高い操作性についてご紹介します。

実験方法

UPLC 条件

LC システム： ACQUITY UPLC I-Class

分析時間： 5 分

カラム：： ACQUITY UPLC HSS C_{18}、1.8 µm、2.1×100 mm

移動相： 10 mM 酢酸アンモニウム含有メタノール / 水＝45：55

注入量： 10 µL

検出器条件

検出器： ACQUITY QDa

イオン化モード：ESI -

SIR チャンネル： 321.0

コーン電圧： 15 V

プローブ温度： 600℃

パージ液： 水 / メタノール＝ 90：10

キャピラリー電圧：0.8 kV

サンプリングレート：5 ポイント / 秒

試料調製

低脂肪乳を 5 g 秤量し 25 mL 遠沈管に移し 0.3 µg/kg となるようクロラムフェニコールを添加。ヘキサン 5 mL、70% アセトニトリル 15 mL を加え脱脂およびタンパク沈殿を行いました。試料を振り混ぜ 3,900 G で 10 分遠心分離（4℃）した後、下層のアセトニトリル層 5 mL を採り 10% メタノールで 15 mL になるよう希釈しました。

Oasis HLB 3 cc（60 mg）カートリッジをメタノール 2 mL、水 4 mL でコンディショニングし、希釈した試料 15 mL をロードしました。5% メタノール 6 mL で洗浄した後、100% メタノール 6 mL でクロラムフェニコールを溶出しました。続いて、溶出液を窒素ガスで乾固し 10% メタノール 300 µL に再溶解し LC-MS 分析に用いました。

標準試料調製

ブランクの低脂肪乳（クロラムフェニコール無添加）を上記と同様に処理し、乾固後 0.075 -1 µg/kg の 6 濃度の標準品溶液で再溶解しました。

結果および考察

牛乳抽出物の分析の前に、最も効率的かつ高感度な検出ができるよう事前に最適化されている MS 条件（デフォルト）を使用してクロラムフェニコールの MS 条件を微調整しました。その結果、ネガティブモード、コーン電圧 15 V（デフォルト値）で最も高い感度が得られ、この条件を用いてマトリックス添加検量線を作成し、EU の MRPL と同濃度のクロラムフェニコールを添加した牛乳試料を精密に定量することができました。検量線では、図 1 に示したように、0.075 -1 µg/kg の範囲において R^2>0.995 の優れた直線性が得られました。

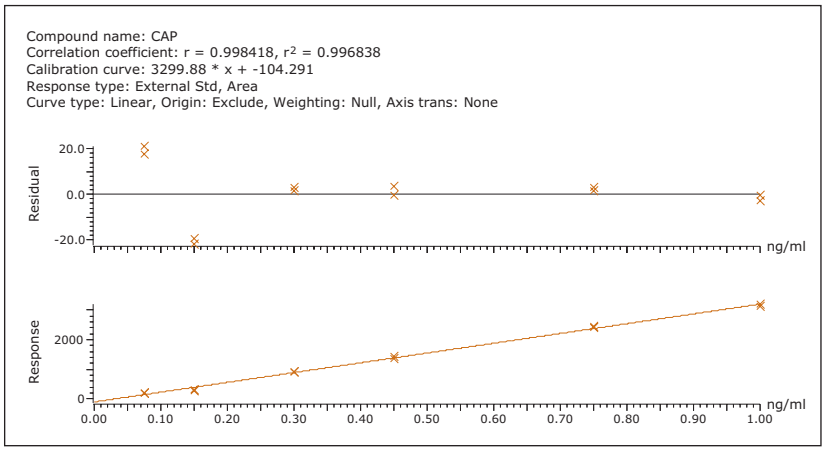

図 1. 0.075 -1 µg/kg、2 回注入によるマトリックス添加検量線

マトリックス効果を評価するため、マトリックスを含む標準品による検量線とマトリックスを含まない標準品による検量線を同じ濃度範囲で比較しました（図 2）。両検量線の重ね書きからマトリックス効果（イオン化促進）が明らかであり、それぞれの検量線の傾き（$\frac{\text{Slope sample}}{\text{Slope standard}} \times 100$）を用いて統計的に示すとマトリックス効果は 177% となりました。このようにマトリックス効果は認められましたが、マトリックス添加検量線を用いることにより、牛乳中クロラムフェニコールの定量スクリーニングを正確に実施することが可能でした。

さらに、クロラムフェニコールを添加していない牛乳のブランク試料を n=2 で分析したところ、図 3A に示したようにベースラインノイズが見られたのみで偽陽性は検出されませんでした。今回は重水素を利用した高価な内部標準物質は使用せず、EU の MRPL と同濃度のクロラムフェニコールを添加したサンプルの調製（クロラムフェニコールの添加および抽出）を n=4 で行い、1 検体につき 2 回ずつ計 n=8 で分析し、マトリックス添加検量線を使用して定量しました。図 3B に示したように n=8 で分析したクロラムフェニコールピークは、ピーク間ノイズ法で S/N50 以上と良好な感度が得られました。

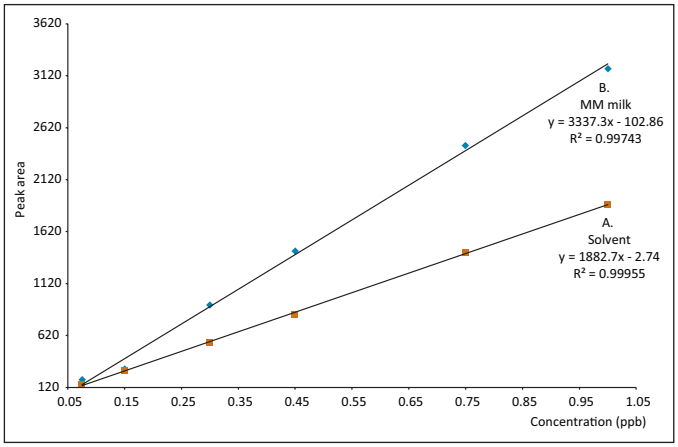

図 2. 0.075 -1 µg/kg クロラムフェニコールの検量線の重ね書き
2A：溶媒（10% メタノール）溶解標準試料の検量線
2B：マトリックス（牛乳）添加検量線

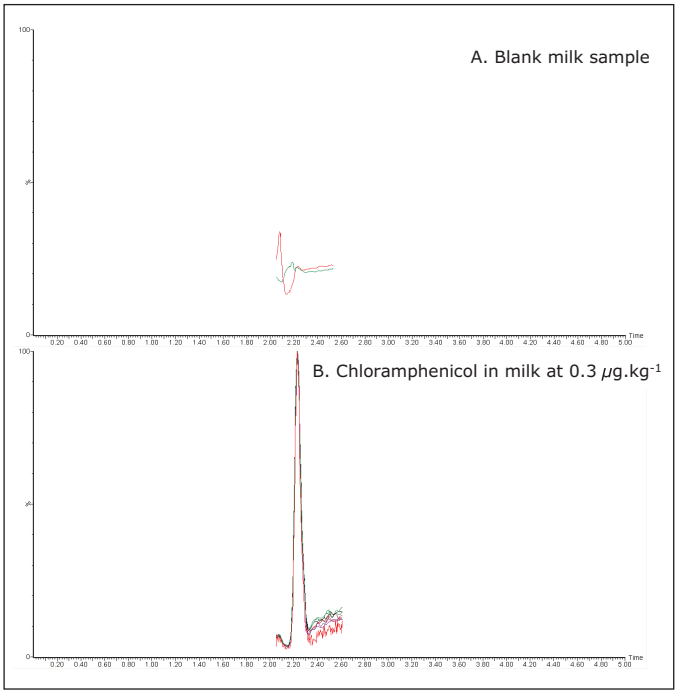

図 3. クロラムフェニコールの Selected ion recording（SIR）クロマトグラム（m/z 321）
3A：ブランク　牛乳抽出物（n=2）
3B：MRPL（0.3 µg/kg）クロラムフェニコール添加牛乳試料
n=8 の重ね書き（S/N ≧ 50）

図 3B に示したように、良好な保持時間再現性が得られました。回収率とともに統計計算結果をテーブル 1 に示しました。平均回収率は 72.7% であり、EU の Commission Decision 2002/657/EC の基準を充たしており、規制下限値また n=8 での相対標準偏差（RSD）は 4.6% 未満と優れた再現性が確認されました。以上より、本分析法が、規制下限値における牛乳中クロラムフェニコールの定量的スクリーニング法に要求される頑健性と感度の両方を充たすものであることが示されました。

表 1. 固相抽出による回収率（n=8） サンプル抽出および装置の良好な再現性

番号	% 回収率	保持時間（分）
1	77.0	2.23
2	69.7	2.23
3	76.3	2.23
4	71.7	2.23
5	72.3	2.23
6	67.3	2.23
7	75.0	2.24
8	72.3	2.23
平均	**72.7**	**2.231**
標準偏差	**3.3**	**0.004**
%RSD	**4.5**	**0.158**

結論

信頼性の高い牛乳中クロラムフェニコールの定量的スクリーニング法として正確で頑健な分析法を構築しました。本法により、容易に、しかも内部標準物質の使用なしで規制の要求に適合する検出レベルに到達できること、EU MRPL である 0.3 µg/kg での優れた再現性を示しました。質量検出がもたらすさらなる情報により、選択性の向上、すなわち目的成分と夾雑物との識別が実現され、偽陽性を排除することが可能となります。

参考文献

1. V Gaudin, N Cadieu, O Maris O. IVth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Belgium, 2002.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
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 サムティ新大阪フロントビル 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 札幌 富山

Waters、ACQUITY UPLC、ACQUITY QDa および
The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2014 Waters Corporation. Printed in Japan. 2014年5月 720004993JA PDF