

(別添)

飼料中のクロラムフェニコールの液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による定量法

1 試料

配合飼料は、1 mm の網ふるいを通過するまで粉碎する。

2 試薬

1) クロラムフェニコール標準液

クロラムフェニコール ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) 標準品 (和光純薬工業製, 純度 98.0%) 20 mg を正確に量って 200 mL の全量フラスコに入れ, アセトニトリルを加えて溶かし, 更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製する (この液 1 mL はクロラムフェニコールとして 0.1 mg を含有する.) .

使用に際して, 標準原液の一定量をアセトニトリル-水 (1+1) で正確に希釈し, 1 mL 中に 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 及び 0.1 μ g を含有するクロラムフェニコール標準液を調製する。

2) シリカゲル

カラムクロマトグラフ用シリカゲル (Silica gel 60, Merck 製, 粒径 63~200 μ m) を, 110°C で 2 時間乾燥する。

3) 液体クロマトグラフタンデム型質量分析計に用いるアセトニトリル及び水は, 高速液体クロマトグラフ用を使用する。その他の試薬は特級試薬を用いる。

3 装置及び器具

1) 液体クロマトグラフ: Waters 製 Alliance 2695

2) タンデム型質量分析計: Waters 製 Quattro micro API Mass Analyzer

3) マグネチックスターラー: 柴田科学製 MU-4

4) ロータリーエバポレーター: シバタインテック製 RE121

5) 高速遠心分離器: 日立製作所製 SCT15B

4 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ, 酢酸エチル 100 mL を加え, 20 分間かき混ぜて抽出した後, ろ紙 (5 種 A) でろ過する。ろ液 50 mL を 100 mL のなす型フラスコに入れ, 50°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後, 窒素ガスを送って乾固した。クロロホルム 5 mL を加えて残留物を溶かし, カラムクロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

2) カラムクロマトグラフィー

シリカゲル 5 g をクロロホルムに懸濁させてカラム管 (内径 15 mm) に流し込み, 液面が充てん剤の上端から 3 mm の高さに達するまで流出させ, カラムを調製する。試料溶液をカラムに入れ, 容器をクロロホルム 5 mL で 2 回洗浄し, 洗液を順次カラムに加えた後, 1 分間に 1~2 mL の速さで流出させる。次に, クロロホルム-メタノール (97+3) 30 mL を加えて同様に流出させ, カラムを洗浄した後, 50 mL のなす型フラスコをカラム管の下におき, クロロホ

ルメタノール (7+3) 30 mL を加え，クロラムフェニコールを溶出させる．溶出液を 50°C の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後，窒素ガスを送って乾固する．アセトニトリル-水 (1+1) 1.0 mL を正確に加えて残留物を溶かし，10,000 rpm (5,000×g) で 5 分間遠心分離し，上澄み液を LC-MS/MS による測定に供する試料溶液とする．

3) LC-MS/MS による測定

試料溶液及び各クロラムフェニコール標準液各 10 µL を LC-MS/MS に注入し，マルチプルリアクションモニタリング (MRM) クロマトグラムを作成し，ピーク面積又は高さより検量線を作成し，試料中のクロラムフェニコール量を算出する．

なお，LC-MS/MS の分析条件を表 1 に示す．

表 1 LC-MS/MS 測定条件

カラム	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒径5 µm)
カラム槽温度	40°C
溶離液	A:10 mmol/L酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル
グラジエント	0分 (30%B) →15分 (30%B) →15.1分 (100%B) →25分 (100%B) →25.1分 (30%B) →40分 (30%B)
流速	0.35 mL/min
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
モード	ネガティブ
ネブライザーガス	N ₂ (600 L/h)
コーンガス	N ₂ (10 L/h)
キャピラリー電圧	3.0 kV
モニターイオン	<i>m/z</i> 321.2 (プレカーサーイオン) , 152.1 (プロダクトイオン)

5 添加回収試験

添加回収試験の結果は，表 2 のとおりである．

表 2 添加回収試験結果

試料の種類	(%)	
	分析値 ^{a)}	RSD ^{b)}
2 µg/kg	102	(1.5)
5 µg/kg	94.8	(6.2)

a) *n*=3 の平均回収率

b) 相対標準偏差

6 定量下限及び検出下限

本法における定量下限は，飼料中で 2 µg/kg，検出下限は，SN 比が 3 となる濃度から，飼料中で 0.6 µg/kg と見積られる．

(参考)

飼料分析基準（平成20年4月1日付け19消安14729号消費・安全局長通知）抜粋

第9章 抗生物質

第1節 微生物学的試験法通則

第2節 各条

10 クロラムフェニコール

10.1 微量定量試験法

10.1.1 液体クロマトグラフ法

（適用範囲：脱脂粉乳）

A 試薬の調製

- 1) クロラムフェニコール標準液　クロラムフェニコール〔 $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ 〕20 mg を正確に量って200 mL の褐色全量フラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、更に標線まで同溶媒を加えてクロラムフェニコール標準原液を調製する（この液1 mL は、クロラムフェニコールとして0.1 mg を含有する。）。

使用に際して、標準原液の一定量をアセトニトリル-水（1+1）で正確に希釈し、1 mL 中にクロラムフェニコールとして0.025~0.5 μg を含有する数点のクロラムフェニコール標準液を調製する。

- 2) シリカゲル　カラムクロマトグラフ用シリカゲル（粒径63~200 μm （230~70メッシュ））^{注1}を110°Cで2時間乾燥する。

B 定 量

抽 出　分析試料10.0 gを量って200 mLの共栓三角フラスコに入れ、酢酸エチル100 mLを加え、20分間かき混ぜて抽出した後、抽出液をろ紙（5種A）でろ過する。ろ液50 mLを100 mLのなす形フラスコに入れ、50°C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

クロロホルム5 mLを加えて残留物を溶かし、カラム処理に供する試料溶液とする。

カラム処理　シリカゲル5 gをクロロホルムに懸濁させてカラム管（内径15 mm）に流し込み、液面が充てん剤の上端から3 mmの高さに達するまで流出させ、カラムを調製する。

試料溶液をカラムに入れ、試料溶液の入っていたなす形フラスコをクロロホルム5 mLずつで2回洗浄し、洗液を順次カラムに加える。液面が充てん剤の上端から3 mmの高さに達するまで流速1~2 mL/minで流出させた後、クロロホルム-メタノール（97+3）30 mLをカラムに加え、同様に流出させ、カラムを洗浄する。

50 mLのなす形フラスコをカラムの下に置き、クロロホルム-メタノール（7+3）30 mLをカラムに加え、先の流速でクロラムフェニコールを溶出させる。溶出液を50°C以下の水浴でほとんど乾固するまで減圧濃縮した後、窒素ガスを送って乾固する。

アセトニトリル-水 (1+1) 1 mL を正確に加えて残留物を溶かし、メンブレンフィルター (孔径 0.5 μm 以下) でろ過し、液体クロマトグラフィーに供する試料溶液とする。

液体クロマトグラフィー 試料溶液及び各クロラムフェニコール標準液各 20 μL を液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを得る。

測定条件 例

検 出 器：紫外吸光光度検出器 (測定波長：278 nm)

カ ラ ム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム (内径 6.0 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm) 注²

溶 離 液：水-アセトニトリル (29+11)

流 速：1.0 mL/min

カラム槽温度：40°C

計 算 得られたクロマトグラムからピーク面積を求めて検量線を作成し、試料中のクロラムフェニコール量を算出する。

注 1 Silica gel 60 (Merck 製) 又はこれと同等のもの

2 YMC-Pack ODS-AM (ワイエムシィ製) 又はこれと同等のもの

(参考) 分析法バリデーション

- ・添加回収率及び繰返し精度

試料の種類	添加濃度 (μg/kg)	繰返し	添加回収率 (%)	繰返し精度 RSD (%以下)
脱脂粉乳1	10~50	3	96.0~101.9	3.8
脱脂粉乳2	10~50	3	96.3~96.5	10.0

- ・共同試験

試料の種類	試験室 数	添加濃度 (g(力価)/t)	添加回収率 (%)	室内繰返し精度 RSD _r (%)	室間再現精度 RSD _R (%)	HorRat
脱脂粉乳	9	10	98.1	4.7	6.4	0.29

- ・定量下限 試料中 5 μg/kg