

# Agilent Bond Elut Plexa SPE、 Agilent Poroshell 120 カラム、 LC/タンデム MS を使用した ウシ筋肉中のアミノグリコシドの分析

## アプリケーションノート

食品と農業

### 著者

Andy Zhai  
Agilent Technologies  
Shanghai Co. Ltd.

### 要旨

ウシ筋肉に含まれるスペクチノマイシン、ハイグロマイシン B、ストレプトマイシン、ジヒドロストレプトマイシン、アミカシン、カナマイシン、アブラマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、ネオマイシンの残留アミノグリコシドを同時分析するためのメソッドを開発し、バリデーションしました。これらの対象化合物を固相抽出法により抽出し、精製した後、ポジティブイオンマルチプルリアクションモニタリングモードで動作させたエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析装置に結合した液体クロマトグラフィにより定量しました。このメソッドは、ウシ筋肉中のすべての残留アミノグリコシドについて ng/g レベルの検出下限を提供します。これらの化合物のダイナミックレンジは 10~500 ng/g でした。全体的な回収率の範囲は 71~98 %、RSD 値は 1.4~11.2 % でした。

### はじめに

アミノグリコシド (AG) は、一部の好気性グラム陽性およびグラム陰性細菌に対する細菌活性を持つ、薬効範囲が広い抗生物質です。AG は、細菌感染症の治療や生育促進のために畜産で広く使用されています。毒性が高く、耐性菌が発生する可能性があるため、健康に対する潜在的リスクに大きな注目が集まっています。欧州連合 (EU)、中国、米国、日本、およびその他の国では、動物由来のさまざまな食品について厳しい AG 最大残留レベル (MRL) を設定しています [1, 2]。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートの目的は、動物組織に含まれる残留アミノグリコシドのルーチン規制分析用に、簡単に迅速な多成分残留分析メソッドを開発することです。このメソッドでは、ポリマー系充てん剤を使用した簡単な SPE 手順 (Agilent Bond Elut Plexa) を使用します。表 1 にアミノグリコシドの詳細を示します。

## 実験方法

### 試薬および薬品

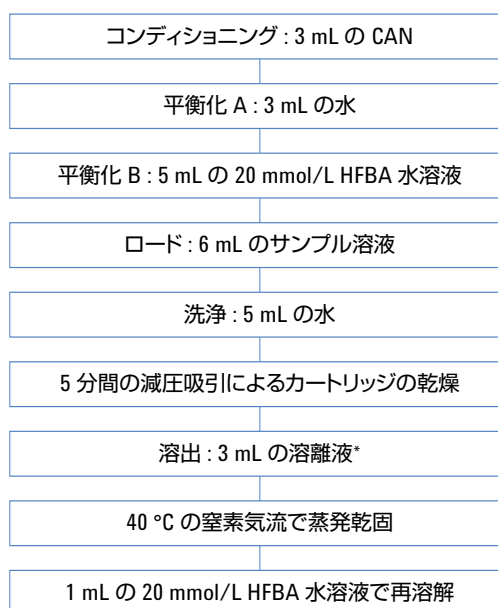
すべての試薬は、MS、HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリルと水は Honeywell から購入しました。標準品は Dr. Ehrenstorfer (アウグスブルク、ドイツ) から購入しました。ウシ筋肉は地元のスーパーマーケットで購入しました。標準溶液 (1.0 mg/mL) を水を使用して個別に調製し、冷凍庫で 4 °C で保存しました。混合標準溶液 (10 µg/mL) をアセトニトリル:水 (10:90) を使用して調製し、これも 4 °C で保存しました。次に、混合標準溶液を水で希釈し、スパイク用溶液を作成しました。

### サンプル前処理

キッチンブレンダーを使用してウシ筋肉 (500 g) を細かく切り刻み、-20 °C で保管しました。ホモジナイズした筋肉のうち 5 g を 50 mL のキャップ付きポリプロピレン製チューブに測り取り、10 mL の 5 % トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液を加えました。Ultra-Turrax T-18 ホモジナイザ (IKA-Labortechnik、シュタウフェン、ドイツ) を使用してこの混合物を 1 分間十分にホモジナイズし、4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上澄みを別のチューブに移しました。10 mL の 5 % TCA 水溶液を使用して同じ抽出手順を繰り返し、上澄みを同じチューブに加えました。5 mL 量の 0.2 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) 水溶液を抽出物に加えました。ボルテックスミキサで 1 分間混合し、4,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、5 % アンモニア水で上澄みを pH 4.0 に調整しました。SPE 手順で使用できるように、水を加えてサンプル抽出溶液を 30 mL にしました。

### 固相抽出

図 1 に SPE 手順を示します。Bond Elut Plexa カートリッジを 3 mL のアセトニトリル (ACN) を使用してプレコンディショニングし、3 mL の水と 5 mL の 20 mmol/L HFBA 水溶液で平衡化しました。6 mL のサンプル溶液をカートリッジにロードし、自然落下で通過させました (約 1 mL/min)。次に、カートリッジを 5 mL の水で洗浄しました。カートリッジを 5 分間減圧吸引で脱水し、樹脂を完全に乾燥させました。3 mL の ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液 (8:2) 混合液を使用し、1 mL/min の速度で化合物を溶出しました。溶出液を 40 °C の窒素で乾燥させました。残留物を 1 mL の 20 mmol/L HFBA 水溶液で再溶解しました。次に、ボルテックスミキサを使用してサンプルを混合し、超音波処理して残留物を完全に溶解し、0.22-µm のメンブレンでろ過しました。最後に、分析用の 2 mL クロマトグラフィバイアルにサンプルを移しました。



\* 溶離液 ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液 (8:2)

図 1. ウシ筋肉のクリーンアップと濃縮 – SPE 手順

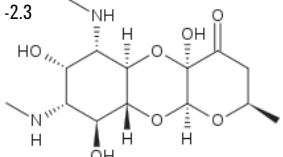
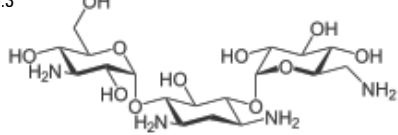
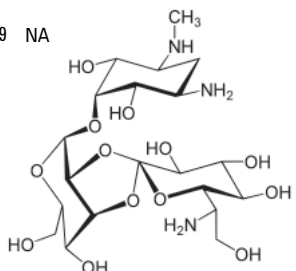
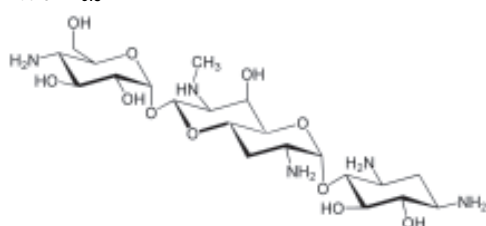
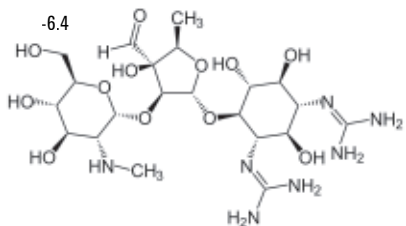
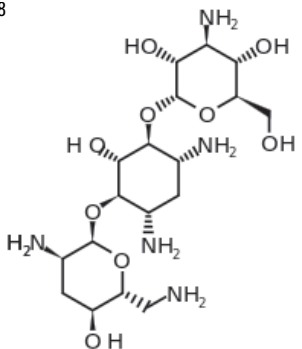
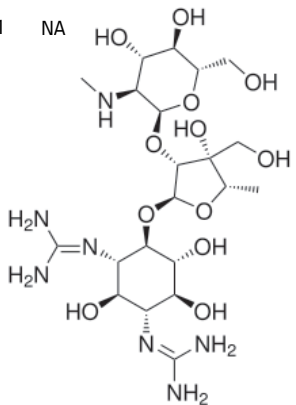
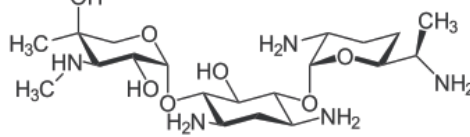
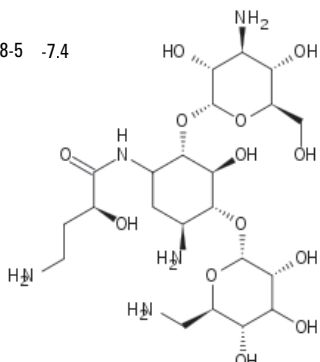
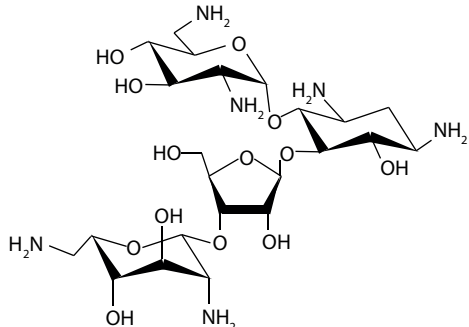
化合物	CAS 番号	Log P	構造	化合物	CAS 番号	Log P	構造
スペクチノマイシン	1695-77-8	-2.3		カナマイシン	59-01-8	-6.3	
ハイグロマイシン	31282-04-9	NA		アブラマイシン	37321-09-8	-6.5	
ストレプトマイシン	57-92-1	-6.4		トブラマイシン	32986-56-4	-5.8	
ジヒドロストレプトマイシン	128-46-1	NA		ゲンタマイシン	1403-66-3	NA	
アミカシン	37517-28-5	-7.4		ネオマイシン	1404-04-2	-7.8	

表 1. この実験で使用したアミノグリコシド化合物

## 条件

カラム: Agilent Poroshell 120 SB-C18、2.1 × 100 mm、  
2.7 μm (p/n 685775-902)

サンプル前処理: Agilent Bond Elut Plexa カートリッジ、  
500 mg/6 mL (p/n 12259506)

移動相: A: 水:アセトニトリル (950:50、20 mmol/L HFBA)、  
B: アセトニトリル:水 (800:200、20 mmol/L HFBA)

注入量: 20 μL

流量: 0.3 mL/min

グラジエント:	時間 (分)	%A	%B
	0	85	15
	3	85	15
	9.5	25	75
	9.55	85	15
	10	85	15

温度: 室温

マニホールド: Agilent Vac Elut 20 マニホールド (p/n 12234101)

機器: Agilent 1200 Infinity シリーズ LC システム  
Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS/MS システム

## MS の条件

AG をポジティブモードでモニタしました。表 2 にマルチプルリアクションモニタリングの詳細を示します。

## MS イオン源のパラメータ

ガス温度: 350 °C

ガス流量: 5 L/min

ネブライザ: 45 psi

ソースガス温度: 400 °C

ソースガス流量: 11 L/min

ノズル電圧: ポジティブ、0 V

キャピラリ: ポジティブ、3500 V

化合物	プリカーサイオン	プロダクトイオン	フラグメンタ (V)	コリジョンエネルギー (V)	リテンションタイム (分)
スペクチノマイシン	351.2	333.2	170	15	4.64
		207.1	170	18	
ハイグロマイシン B	528.3	177.1	170	25	6.77
		352	170	20	
ストレプトマイシン	582.4	263.2	180	30	6.98
		245.8	180	35	
ジヒドロストレプトマイシン	584.4	263.3	180	30	7.06
		246.2	180	40	
アミカシン	586.4	163.1	170	30	7.68
		425.2	170	15	
カナマイシン	485.3	163.1	150	20	7.8
		324.2	150	10	
アブラマイシン	540.3	217.1	140	25	8.32
		378.2	140	12	
トブラマイシン	468.3	163.2	125	20	8.42
		324.2	125	8	
ゲンタマイシン	478.3	322.3	125	8	8.64
		157.2	125	15	
ネオマイシン	615.3	161.1	175	30	8.74
		293.1	175	20	

表 2. マルチプルリアクションモニタリングにより監視した質量

## 結果と考察

### 直線性と検出下限

外部検量線の作成に使用した溶液は、混合標準溶液を使用して調整し、マトリクスブランクをスパイクしました (10、20、50、100、および 500 ng/g)。マトリクスブランクは、前処理と SPE 手順を含む全手順をウシ筋肉で実施して作成しました。検出下限 (LOD) は、S/N 比が 3:1 を超えるときの各化合物の濃度として決定しました。検量線と LOD の結果を表 3 に示します。

化合物	回帰方程式 Regression equation	R <sup>2</sup>	筋肉中の LOD (ng/g)
スペクチノマイシン	Y=293.4698x-325.2314	0.9998	2
ハイグロマイシン B	Y=270.2367x-424.6557	0.9999	0.5
ストレプトマイシン	Y=28.7892x+10.1849	0.9999	5
ジヒドロストレプトマイシン	Y=458.6225x-1320.7826	0.9999	0.1
アミカシン	Y=572.3138x-923.7852	0.9999	0.2
カナマイシン	Y=508.1929x-905.1314	0.9998	0.5
アブラマイシン	Y=239.2452x-646.2071	0.9999	0.5
トブラマイシン	Y=696.8031x-1922.6636	0.9999	0.1
ゲンタマイシン	Y=1076.2438x-3690.8511	0.9996	0.1
ネオマイシン	Y=196.7006x-534.5063	0.9997	2

表 3. ウシ筋肉中アミノグリコシドの直線性と LOD

### 回収率および再現性

このメソッドの回収率と繰り返し再現性は、3 つのレベル (濃度 20、100、500 ng/g になるようにウシ筋肉にスパイク) で測定しました。各レベルで分析を 6 回繰り返し行いました。表 4 に、回収率と再現性のデータを示します。図 2 に、スパイクしたウシ筋肉抽出物 (20 ng/g) のクロマトグラムを示します。

化合物	スパイク (ng/g)	回収率 (%)	RSD (n=6、%)
スペクチノマイシン	20	87.7	2.1
	100	79.7	2.4
	500	91.2	3.2
ハイグロマイシン B	20	75.9	3.9
	100	82.1	3.4
	500	85.6	4.0
ストレプトマイシン	20	71.5	11.2
	100	80.0	9.4
	500	74.5	8.0
ジヒドロストレプトマイシン	20	89.1	4.5
	100	91.2	2.3
	500	93.3	3.6
アミカシン	20	85.9	1.8
	100	90.1	2.4
	500	96.5	3.8
カナマイシン	20	86.7	1.4
	100	90.0	2.2
	500	97.6	2.8
アブラマイシン	20	84.6	4.9
	100	87.6	3.1
	500	95.4	5.4
トブラマイシン	20	89.3	4.4
	100	88.1	3.4
	500	97.7	5.8
ゲンタマイシン	20	82.4	3.5
	100	81.2	4.6
	500	95.8	6.8
ネオマイシン	20	72.1	2.6
	100	82.8	5.6
	500	90.3	5.5

表 4. ウシ筋肉中アミノグリコシドの回収率と再現性

## 結論

LC/MS/MS は、ウシ筋肉に含まれるアミノグリコシドを同時に定量し、確認するための、信頼性の高い、パワフルな技術です。さらに、この実験の結果は、ウシ筋肉などの複雑なマトリクスに含まれる複数のアミノグリコシドの精製と濃縮において、Agilent Bond Elut Plexa が有用であることを示しています。標準品をスパイクしたマトリクスに基づく回収率と再現性の結果は、国際規制に従ったウシ筋肉中残留アミノグリコシドの測定として十分なものでした。不純物とマトリクス効果は最小限に抑えられ、どの対象化合物の定量とも干渉はありませんでした。定量下限は MRL よりも大幅に低くなりました [3]。

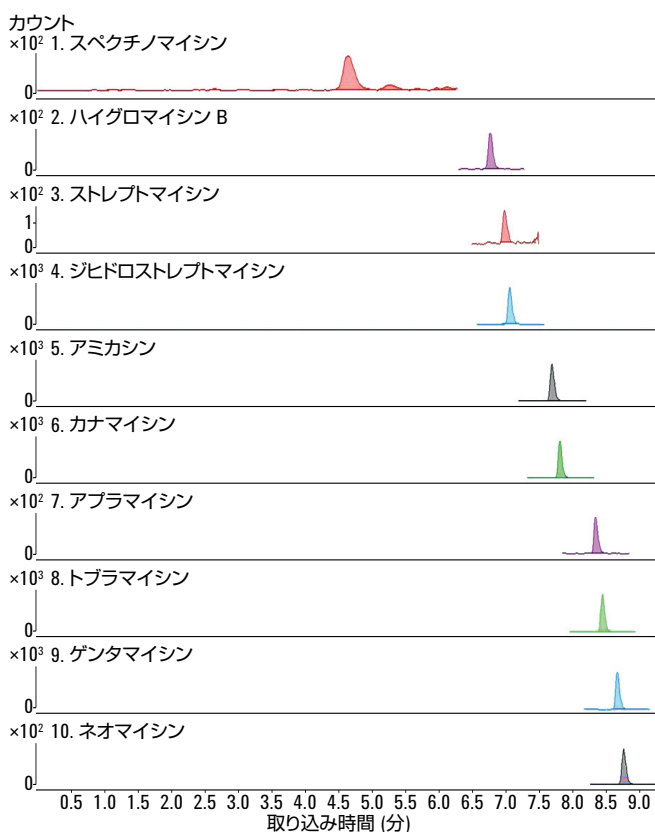


図 2. 20 ng/g でスパイクしたウシ筋肉サンプル抽出物のクロマトグラム

## 参考文献

- [1] W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. L. S. Zhang. *J. Chromatography A*, 1207, 29 (2008).
- [2] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden. *Anal. Chim. Acta* 711, 46 (2012).
- [3] Anon. GB/T 21323-2007 Determination of aminoglycosides residues in animal tissues - HPLC-MS/MS method. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.

## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2012

Printed in Japan

October 25, 2012

5991-1321JAJP



Agilent Technologies