

Agilent サンプリーク OPT 固相抽出 カートリッジおよび液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析 (LC/MS/MS) による 豚肉に含まれる β 2 刺激薬の定量

アプリケーションノート

食品安全

著者

Chenhao Zhai
Agilent Technologies Co., Ltd.
412 Ying Lun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131
China

Jianzhong Li and Yue Song
Agilent Technologies Co., Ltd.
11/F Cross Tower
318 Fu Zhou Road
Shanghai 200001
China

概要

豚肉中の 4 種類の β 2 刺激薬残留物、テルブタリン、サルブタモール、クレンブテロール、およびホルモテロールを同時定量するためのメソッドを開発および検証しました。分析対象物を液液抽出 (LLE) および固相抽出 (SPE) で精製し、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 (MRM) モードで操作するエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC-ESI-MS/MS) と組み合わせた液体クロマトグラフィーにより定量しました。このメソッドにより、豚肉中に含まれる 4 種類の β 2 刺激薬すべてで ng/g 未満の検出限界 (LOD) が得られました。これらの化合物のダイナミックキャリブレーションレンジは、0.25 ~ 5 ng/g でした。また、全体の回収率は、78 ~ 101 % の範囲であり、RSD 値は 1.8 ~ 7.2 % でした。

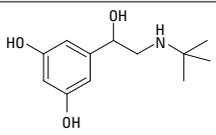
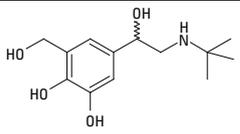
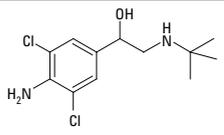
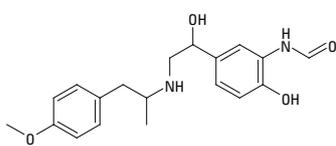


Agilent Technologies

はじめに

β 2 刺激薬は、豚肉生産における違法な成長促進物質として世界中で使用されています。一方で、豚肉中に残留した高レベルの β 刺激薬 (クレンブテロール) が原因で中毒も起きています。本アプリケーションノートでは、アジレントの新しい SPE 製品を使用して、豚肉に含まれる 4 種類の β 刺激薬を抽出および濃縮し、LC/MS/MS により分析した例を紹介します。表 1 に、4 種類の β 刺激薬化合物の名前と構造式を示します。

表 1. 本実験の β 2 刺激薬化合物

化合物名	Log P	構造
テルブタリン	0.55	
サルブタモール	0.44	
クレンブテロール	2.94	
ホルモテロール	1.91	

実験

試薬および化学薬品類

使用した試薬は、すべて MS グレード、HPLC グレードまたは分析グレードのものです。

アセトニトリルと水は Scharlau 社製を使用しました。酢酸エチルとイソプロパノールは Fisher 社製を使用しました。標準試料は中国薬品生物製品検定所 (NICPBP) から購入しました。豚肉は、地元の市場で購入しました。

メタノールで希釈した標準溶液 (1.0 mg/mL) を複数用意し、4 °C で冷蔵保存しました。メタノール溶液 (10:90) で希釈した混合作用液 (10 μ g/mL) を用意し、同様に 4 °C で冷蔵保存しました。さらに、混合希釈標準溶液を水で適切に希釈し、スパイク溶液を毎週作成しました。

装置と薬剤

Agilent 1200 HPLC システム

Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム

Agilent サンプリーク OPT ポリマーカートリッジ 50 \times 3 mL 試験管、60 mg (部品番号 5982-3236)

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、2.1 \times 50 mm、1.8 μ m (部品番号 959741-902)

Agilent 真空マニホールド処理ステーション (部品番号 5982-9120)

サンプル調製

液液抽出

2 g の豚肉 (\pm 0.01 g) を計量し、15 mL のキャップ付きポリプロピレン試験管に入れます。豚肉に 8 mL の 0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 溶液を加え、ボルテックスで攪拌します。次に、100 μ L の β -グルクロニダーゼ (1000 U/mL) を加え、試験管を 2 分間十分に振とうします。サンプルを 37 °C で 16 時間加水分解します。

加水分解物を 15 分間振とうし、4000 rpm で 10 分間遠心分離します。4 mL の上澄み液を別の遠心分離管に移します。5 mL の 0.1 M 過塩素酸溶液を加え、pH を 1 ± 0.3 に調整します。次に、試験管を 4000 rpm で 10 分間遠心分離します。上澄み液を別の試験管に移し、10 M 水酸化ナトリウムで pH を 11 に調整します。

飽和塩化ナトリウム溶液とイソプロパノール-酢酸エチル (60:40) を 10 mL ずつ試験管に加えます。試験管を 5 分間振とうします。試験管を 4000 rpm で 5 分間遠心分離してから、有機相を他の試験管に慎重に移します。イソプロパノール-酢酸エチルの追加、振とう、遠心分離、および有機相の移動を 2 回繰り返して、上澄み液をすべて混合します。

40 °C で窒素を使用してサンプルを乾固させます。残留物を 5 mL の 0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) に溶かします。こうして用意したサンプルを SPE 精製に使用します。

固相抽出

SPE の手順は、図 1 に示すとおりです。Agilent サンプリーク OPT カートリッジは、メタノール 3 mL でプレコンディショニングを行い、次いで水 3 mL で平衡化します。5 mL のサンプル溶液をカートリッジに入れ、自然落下によりカートリッジを通過させます (約 1 mL/min)。2 mL の水と 2 mL の 2 % ギ酸水溶液で試験管を洗浄します。溶出物をすべて破棄します。カートリッジを 3 分間十分な真空に置き、樹脂を完全に乾燥させます。

す。最後に、メタノールで希釈した 5 mL の 5 % アンモニア溶液を 1 mL/min の速度で加え、化合物を溶出します。溶出物を 40 °C で窒素流により乾燥させます。水/アセトニトリル (90:10) で希釈した 1 mL の 0.1 % ギ酸溶液で残留物を再構成します。サンプルを攪拌し超音波振とう器にかけ、残留物を完全に溶かします。サンプルを 1.5 mL の試験管に移し、3000 rpm で 5 分間遠心分離します。サンプルを 2 mL のクロマトグラフィーバイアルに移し、分析にかけます。

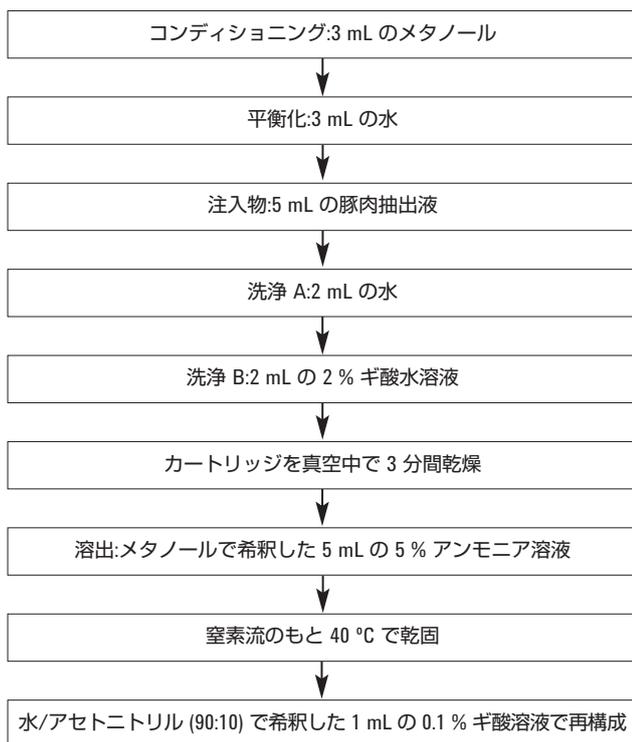


図 1. 豚肉のクリーンアップおよび濃縮 - SPE 手順。

機器設定

HPLC 条件

カラム:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm (部品番号 959741-902)		
流量:	0.4 mL/min		
カラム温度:	40 °C		
注入量:	5 μL		
移動相:	水 (0.1 % FA + 2 mM NH ₄ Ac, A)、 アセトニトリル (0.1 % FA, B)		
グラジエント:	時間 (分)	% A	% B
	0	90	10
	0.5	90	10
	1.8	20	80
	2	90	10
	3.5	90	10

MS 条件

これら 4 種類の化合物をポジティブモードでモニターしました。イオンソース条件は図 2 のとおりです。また、MRM チャンネルを表 2 にまとめます。

図 2. 4 種類の化合物の MS ソースパラメータ。

表 2. MRM でモニターされる質量

化合物名	定量用 MRM	確認用 MRM
テルブタリン	226.1 → 152.1	226.1 → 125
サルブタモール	240.1 → 148.1	240.1 → 222.1
クレンブテロール	227 → 203	227 → 259.1
ホルモテロール	345.1 → 149.1	345.1 → 327.1

結果と考察

線形性と検出限界

外部検量線を求めるために使用した溶液は、混合希釈標準溶液にマトリックスブランクを添加する形で調製しました (0.25、0.5、1.0、2.0、および 5.0 ng/g)。マトリックスブランクは、加水分解物、LLE、および SPE の手順を通して豚肉から作成しました。検量線の結果を表 3 にまとめます。各化合物について S/N 比が 3:1 を超える濃度を検出限界 (LOD) としました。各化合物の LOD も表 3 に示します。

表 3. 各 β2 刺激薬の線形性および LOD

化合物名	回帰式	R ²	豚肉中の LOD (ng/g)
テルブタリン	Y = 3470x + 1325.4	0.9972	0.05
サルブタモール	Y = 13099x + 2900.3	0.9921	0.05
クレンブテロール	Y = 27028x + 1143.7	1	0.02
ホルモテロール	Y = 23251x + 487.44	0.9983	0.02

回収率と再現性

このメソッドの回収率および再現性は、豚肉へのスパイク添加量を変えることによって、3つの濃度レベル (0.5、1.0、および2.0 ng/g) で決定しました。それぞれの濃度レベルの複製を6つずつ作成して分析を行いました。回収率と再現性のデータを表4に示します。スパイクを添加した豚肉抽出液 (1.0 ng/g) に関するクロマトグラムを図3に示します。

表4. SPE を用いた Agilent サンプリーク OPT (部品番号 5982-3236) による豚肉に含まれる β 2 刺激薬の回収率および再現性、平均回収率 90 % および平均 RSD 4.4 %

化合物名	スパイク添加レベル (ng/g 豚肉)	回収率 (%)	RSD (n=6)
テルブタリン	0.5	88.7	5.4
	1	98.0	7.2
	2	100.8	5.9
サルブタモール	0.5	100.6	1.8
	1	92.9	2.1
	2	97.4	3.9
クレンブテロール	0.5	82.3	5.0
	1	91.5	6.3
	2	90.6	4.3
ホルモテロール	0.5	85.1	1.9
	1	83.0	4.0
	2	77.9	2.5

Agilent サンプリーク OPT (部品番号 5982-3236) で SPE クリーンアップした後の 1.0 ng/mL のスパイク添加豚肉サンプルのクロマトグラム

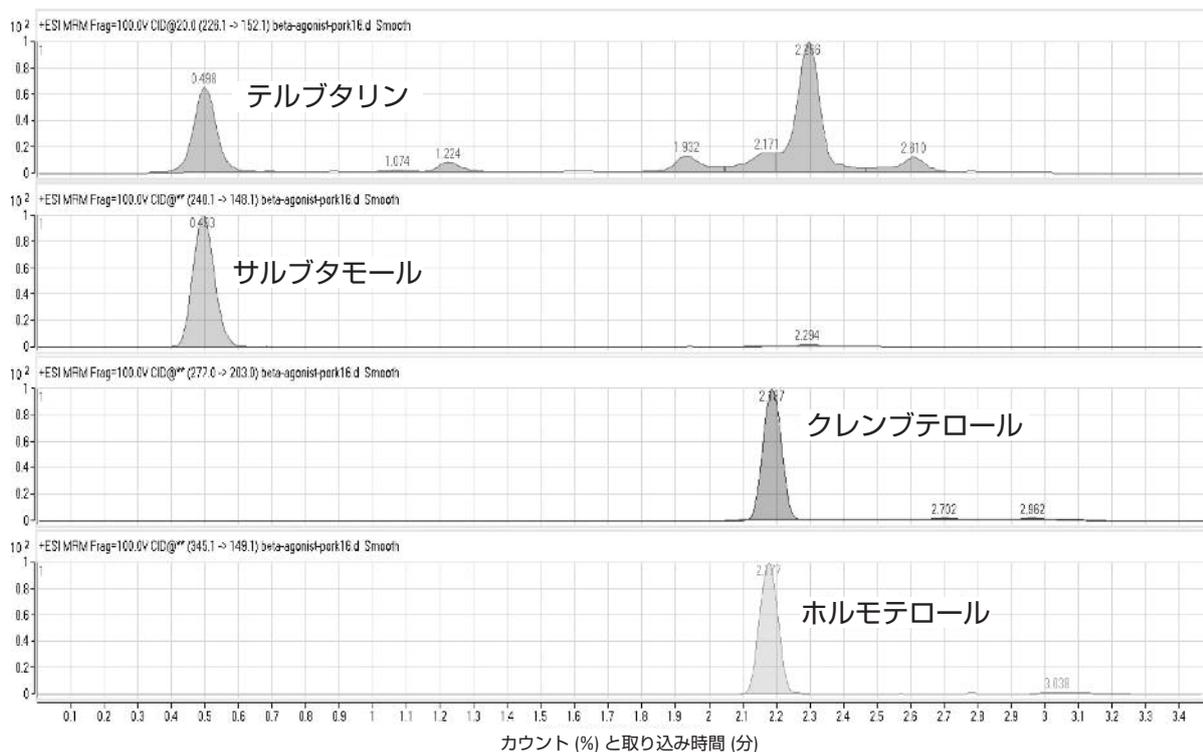


図3. スパイクした豚肉サンプル抽出液 1.0 ng/g のクロマトグラム。

結論

本調査の結果から、Agilent サンプリーク OPT が、豚肉などの複雑なマトリックスに含まれる複数の β 2 刺激薬に対する有効な精製/濃縮メソッドとして利用できることが明らかになりました。マトリックススパイク標準溶液に基づく回収率および再現性に関する実験結果では、豚肉の β 2 刺激薬残留量に関する中国の法定基準を超えない値でした。不純物とマトリックス効果は軽微であり、対象化合物の定量に影響しません。LOQ が、MRL に比べて著しく小さいことが分かりました [1、2]。

参考文献

1. GB/T 21313-2007 "Analysis of β 2-agonists in Foods of Animal Origin by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry"
2. SN/T 1924-2007 "Determination of Clenbuterol, Ractopamine, Salbutamol and Terbutalin Residues in Foodstuffs of Animal Origin for Import and Export -HPLC-MS/MS Method."

詳細情報

アジレントの製品およびサービスの詳細は、弊社ウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
July 20, 2009
5990-4180JAJP



Agilent Technologies