

# SPE 精製および LC/MS/MS 検出による 豚肉中 $\beta 2$ アゴニストの定量

## アプリケーションノート

食品安全

### 著者

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

### 要約

豚肉中に残留している 11 種類の  $\beta 2$  アゴニスト (クレンブテロール、サルブタモール、ラクトパミン、テルブタリン、サルメテロール、プロプラノロール、ツロブテロール、シマテロール、マブテロール、マペンテロール、ジルパテロール) を同時に測定するメソッドを開発し、有効性を確認しました。分析対象物を液液抽出 (LLE) および固相抽出 (SPE) で抽出し、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィ (LC-ESI-MS/MS) を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) モードで使用して定量しました。本メソッドの検出下限 (LOD) は、豚肉中のすべての  $\beta 2$  アゴニストで pg/g レベルでした。ダイナミックレンジは 0.25~5 ng/g でした。回収率は 82~105 %、RSD 値は 1.6~8.4 % でした。

### 緒言

$\beta 2$  アゴニストは、食肉生産における不法な成長促進剤として、世界中で用いられています。代謝リックモディファイヤーとして機能し、通常は脂肪産生に使われるエネルギーを、肉を産生するエネルギーに変換します。最近では、豚肉に含まれる高濃度の  $\beta$  アゴニスト (クレンブテロール) に起因する食中毒事例が生じています。このアプリケーションノートでは、アジレントの Bond Elut Plexa PCX 固相抽出を用いて、豚肉に含まれる 11 種類の  $\beta$  アゴニストを抽出および濃縮し、LC-MS/MS により分析しました。表 1 に、11 種類の  $\beta$  アゴニストの化合物名と構造を示しています。



Agilent Technologies

表 1. 本研究で用いた  $\beta_2$  作動薬の化合物名

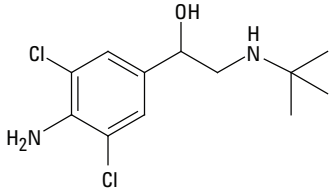
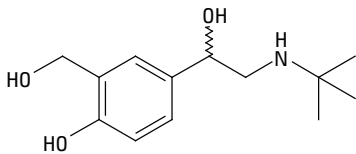
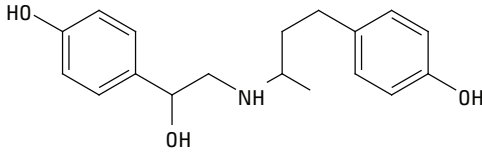
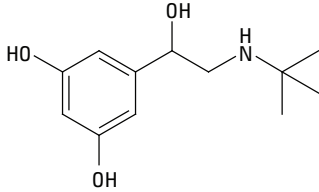
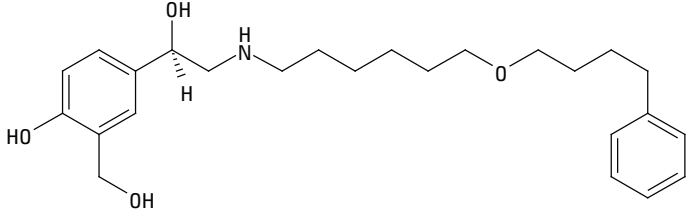
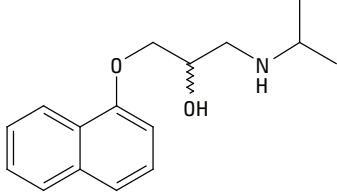
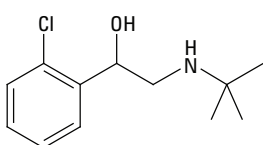
化合物	CAS ナンバー	構造
クレンブテロール	21898-19-1	
サルブタモール	18559-94-9	
ラクトバミン	90274-24-1	
テルブタリン	23031-32-5	
サルメテロール	94749-08-3	
プロプラノロール	318-98-9	
ツロブテロール	56776-01-3	

表 1. 本研究で用いた  $\beta$ 2 作動薬の化合物名 (続き)

化合物	CAS ナンバー	構造
シマテロール	54239-37-1	
マブテロール	54240-36-7	
マベンテロール	54238-51-6	
ジルパテロール	117827-79-9	

## 実験手法

### 試薬

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 から入手しました。標準物質は中国食品薬品検定研究院 (NICPBP) から購入しました。豚肉は地元のスーパーマーケットで購入しました。

個別の標準溶液 (1.0 mg/mL) をメタノール溶液として作成し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保管しました。混合標準溶液 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) はアセトニトリル-水 (10:90) を用いて作成し、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保管しました。添加試験用溶液は、混合標準溶液を水で必要な濃度に希釈し、毎週作成しました。

### 分析機器

Agilent 1200 HPLC システム

Agilent 6460 トリプル四重極 LC-MS/MS システム

Agilent Bond Elut Plexa PCX カートリッジ、60 mg/3 mL (p/n 12108603)

Agilent Poroshell 120 EC-C18、ナローポア、 $2.1 \times 100\text{ mm}$ 、 $2.7\text{ }\mu\text{m}$  (p/n 695775-902)

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

### サンプル前処理

#### 液液抽出

豚ひき肉 5 g ( $\pm 0.01\text{ g}$ ) を計量し、50 mL の蓋付きポリプロピレン遠沈管に入れました。0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 溶液 20 mL を加え、ボルテックスミキサーで混合しました。その後、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (1000 U/mL) 250  $\mu\text{L}$  を添加し、2 分間ボルテックスミキサーで混合し、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 16 時間加水分解しました。

加水分解物を 15 分間よく振とうし、4000 rpm で 10 分間遠心分離したのち、上清 4 mL を別の遠沈管に移しました。0.1 M 過塩素酸溶液 5 mL を添加し、pH を  $1 \pm 0.3$  に調整しました。

その後、遠沈管を 4000 rpm で 10 分間遠心分離してから、上清を別の遠沈管に移しました。10 M 水酸化ナトリウムで pH を 11 に調整しました。

飽和塩化ナトリウム溶液 10 mL とイソプロパノール-酢酸エチル (60:40) 混合液 10 mL を遠沈管に添加し、5 分間振とうしました。遠沈管を 4000 rpm で 5 分間遠心分離してから、有機溶媒層を慎重に別の試験管に移しました。イソプロパノール-酢酸エチル混合液の添加、振とう、遠心分離、有機溶媒層の回収を 2 回繰り返す、すべての上清を合わせました。

サンプルを窒素気相下で 40 °C で蒸発乾固させました。残留物を 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.2) 5 mL に溶解しました。その後、サンプルを SPE により精製しました。

### 固相抽出

SPE 手順を図 1 に示します。Agilent Bond Elut Plexa PCX カートリッジをメタノール 3 mL でコンディショニングしたのち、水 3 mL で平衡化しました。サンプル溶液 5 mL をカートリッジに負荷し、自然落下によりカートリッジを通過させました (流速約 1 mL/min)。カートリッジを水 2 mL と 2 % ギ酸水溶液 2 mL で洗浄しました。カートリッジを 3 分間減圧して、充てん剤を完全に乾燥させました。5 % アンモニア含有メタノール 5 mL を用いて、目的化合物を 1 mL/min の流速で溶出しました。溶出物を 40 °C で窒素気相下で乾燥させました。残留物を 0.1 % ギ酸水溶液/アセトニトリル (90:10) 1 mL に再溶解しました。サンプルをボルテックスミキサーおよび超音波にかけて残留物を完全に溶解させ、0.45 μm フィルターでろ過しました。サンプルを 1.5 mL 試験管に移し、3000 rpm で 5 分間遠心分離しました。その後、サンプルを 2 mL サンプルバイアルに移し、分析しました。

### 機器条件

#### HPLC 条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm		
流速	0.4 mL/min		
カラム温度	40 °C		
注入量	2 μL		
移動相	水 (0.1 % ギ酸+2 mM 酢酸アンモニウム、A 液)、アセトニトリル (0.1 % ギ酸、B 液)		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	98	2
	0.5	98	2
	4	65	35
	5	20	80
	6	10	90
	6.5	98	2
	7	98	2

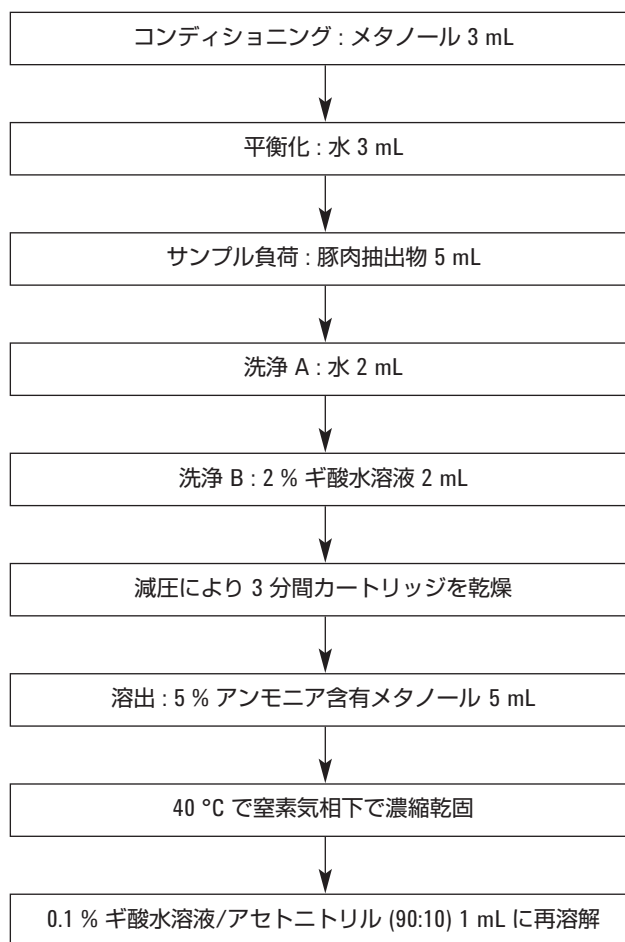


図 1. 豚肉の抽出と濃縮 – SPE 手順

### MS 条件

11 種類の化合物をポジティブモードでモニタリングしました。MS のイオン源条件を表 2 に、MRM 条件を表 3 に示します。

表 2. 11 種類の化合物に適用した MS イオン源パラメータ

ガス温度	350 °C
ガス流速	5 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	400 °C
シースガス流速	12 L/min
ノズル電圧	ポジティブ：0 V ネガティブ：1000 V
キャピラリ	ポジティブ：4000 V ネガティブ：3500 V

表 3. 11 種類の化合物の MRM における質量モニタリング

化合物	MRM チャンネル (m/z)	フラグメンター (V)	CE (V)
クレンブテロール	1) 277.2>203.1	100	12
	2) 277.2>259.1		5
サルブタモール	1) 240.2>148.2	100	15
	2) 240.2>222.1		5
ラクトバミン	1) 302.2>164.2	110	12
	2) 302.2>284.1		6
テルブタリン	1) 226.1>152.2	100	12
	2) 226.1>170.2		6
サルメテロール	1) 416.3>380.3	130	17
	2) 416.3>398.4		10
プロプラノロール	1) 260.2>116.2	120	15
	2) 260.2>183.2		15
ツロブテロール	1) 228.1>154.1	100	12
	2) 228.1>172.2		5
シマテロール	1) 220.1>160.2	90	12
	2) 220.1>202.1		3
マブテロール	1) 311.2>237.1	110	13
	2) 311.2>293.2		7
マベンテロール	1) 325.3>237.1	110	12
	2) 325.3>307.2		5
ジルバテロール	1) 262.2>244.2	100	7
	2) 262.2>202.2		17

## 結果および考察

### 直線性と検出限界

マトリックスブランクに混合標準溶液 (0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 ng/g) を添加し、外部検量線の作成に用いる溶液を調製しました。加水分解、LLE、SPE を含む全工程で豚肉を処理し、マトリックスブランクを作成しました。検量線の結果を表 4 に示します。検出下限 (LOD) については、シグナル/ノイズ比 (S/N) が 3:1 を上回る化合物濃度としました。LOD も表 4 に示しています。

表 4. β2 アゴニストの直線性と LOD

化合物	回帰方程式	R <sup>2</sup>	豚肉中での LOD (ng/g)
クレンブテロール	Y = 0.5576x - 0.0045	0.998	0.03
サルブタモール	Y = 0.5804 - 0.0266	0.997	0.01
ラクトバミン	Y = 0.6780x - 0.0278	0.999	0.01
テルブタリン	Y = 0.6121x - 0.0143	0.999	0.02
サルメテロール	Y = 0.1657x - 0.0056	0.996	0.05
プロプラノロール	Y = 0.2017x + 0.0055	0.999	0.03
ツロブテロール	Y = 0.6985x - 0.0080	0.998	0.02
シマテロール	Y = 1.0993x + 0.0169	0.999	0.03
マブテロール	Y = 0.9587x - 0.0088	0.995	0.03
マベンテロール	Y = 0.8206x - 0.0102	0.995	0.02
ジルバテロール	Y = 0.0620x + 0.0069	0.999	0.08

### 回収率と再現性

濃度 0.5、1.0、2.0 ng/g の 3 濃度段階で添加した豚肉サンプルにおける本方法での回収率と再現性を評価しました。各濃度につき、6 回繰り返して分析しました。回収率と再現性を表 5 に示します。添加 (1.0 ng/g) した豚肉の抽出物のクロマトグラムを図 2 に示します。

表 5. 豚肉中 β2 アゴニストの回収率と再現性

化合物	添加濃度 (豚肉 1 g あたりの ng)	回収率 (%)	RSD (n=6)
クレンブテロール	0.5	88.4	2.3
	1.0	95.1	5.4
	2.0	93.7	1.9
サルブタモール	0.5	98.6	7.3
	1.0	95.3	4.1
	2.0	90.2	6.7
ラクトバミン	0.5	95.9	6.8
	1.0	103.6	2.9
	2.0	100.9	7.3
テルブタリン	0.5	102.7	8.4
	1.0	96.9	2.7
	2.0	89.1	5.4
サルメテロール	0.5	93.5	6.2
	1.0	92.7	3.5
	2.0	87.8	5.0
プロプラノロール	0.5	104.9	6.8
	1.0	97.3	6.7
	2.0	104.2	2.7
ツロブテロール	0.5	82.8	6.1
	1.0	89.3	4.4
	2.0	93.6	5.9
シマテロール	0.5	88.7	8.0
	1.0	90.6	3.3
	2.0	96.4	4.6
マブテロール	0.5	92.7	6.0
	1.0	103.8	7.6
	2.0	100.5	4.9
マベンテロール	0.5	98.9	8.5
	1.0	92.1	2.5
	2.0	96.3	4.7
ジルバテロール	0.5	103.7	5.2
	1.0	89.6	4.3
	2.0	92.4	3.9

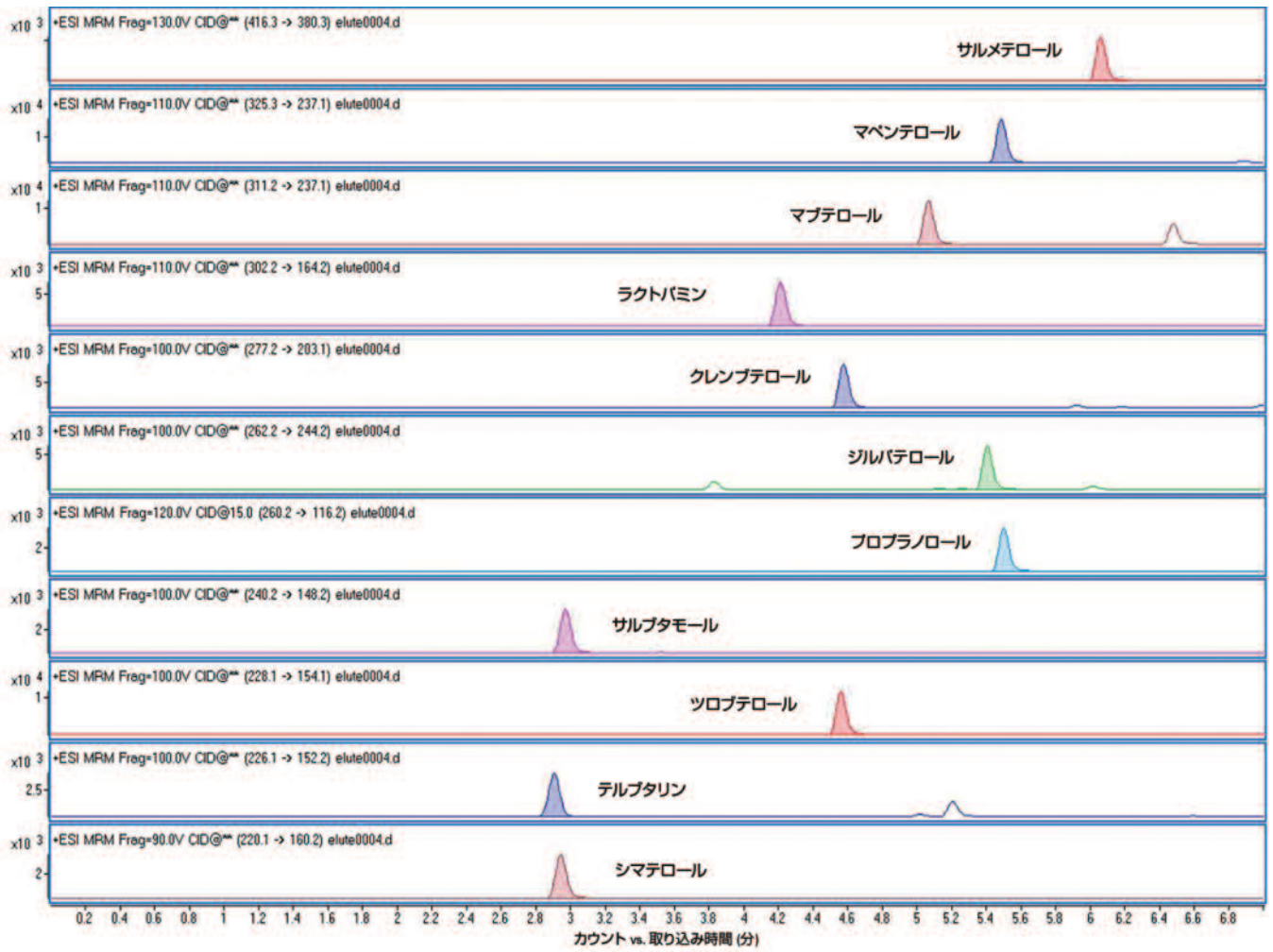


図 2. 1.0 ng/g で添加した豚肉サンプル抽出物のクロマトグラム

## 結論

この研究の結果は、Agilent Bond Elut Plexa PCX が、豚肉などの複雑なマトリックスに含まれる複数の  $\beta 2$  アゴニストを精製および濃縮する効果的な手法として使用できることを示しています。標準物質をマトリックスに添加して得られた回収率と再現性の値は、 $\beta 2$  アゴニストの豚肉中の残留規制分析に適しています。不純物およびマトリックスの効果は最小限に抑えられ、ターゲット化合物の定量において干渉は一切生じません。定量限界は残留基準を大幅に下回っています<sup>[1,2]</sup>。

## 参考文献

1. GB/T 21313-2007 “Analysis of  $\beta 2$ -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 –HPLCMS/MS Method.”

## 詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [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。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., 2011

Printed in Japan

August 17, 2011

5990-8788JAJP



**Agilent Technologies**