

# Agilent Bond Elut Plexa SPE、 Agilent Poroshell 120、および LC/Tandem MS を使用した 牛乳中のアミノグリコシド系抗生物質 の分析

## アプリケーションノート

食品試験および農業

### 著者

Andy Zhai  
Agilent Technologies, Inc.  
Shanghai Co. Ltd.

### 概要

牛乳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系抗生物質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 Agilent Bond Elut Plexa 固相抽出法 (SPE) 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 (LC/タンデム MS) により定量しました。このメソッドは、牛乳中のすべての残留アミノグリコシド系抗生物質について ng/g レベルの検出下限を提供します。これらの化合物の検量線の直線範囲は 10~500 ng/g でした。全体的な回収率の範囲は 67~107 %、RSD 値は 1.7~10.1 % でした。

### はじめに

アミノグリコシド系抗生物質 (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業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]。

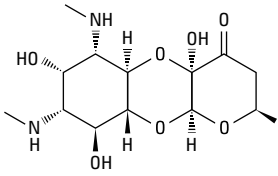
この実験の目的は、牛乳に含まれる残留アミノグリコシド系抗生物質のルーチン規制分析用に、容易で迅速な多成分残留分析メソッドを開発することです。このメソッドでは、ポリマー系充填剤を使用した簡単な SPE 手順 (Bond Elut Plexa) を使用します。表 1 にアミノグリコシド系抗生物質の詳細を示します。



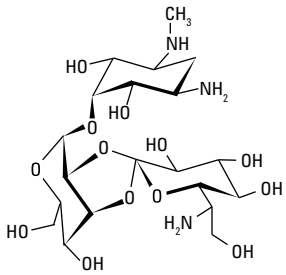
Agilent Technologies

表 1. この実験で使用したアミノグリコシド系抗生物質

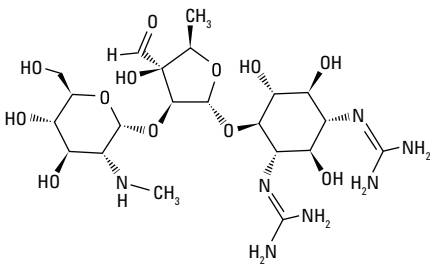
化合物 CAS 番号 LogP



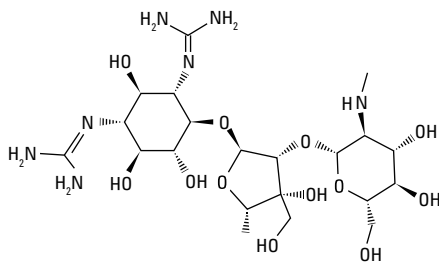
スペクチノマイシン 1695-77-8 -2.3



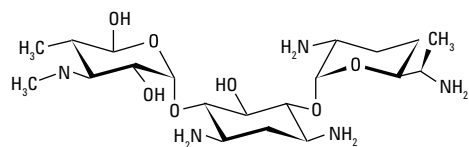
ハイグロマイシン B 31282-04-9 NA



ストレプトマイシン 57-92-1 -6.4

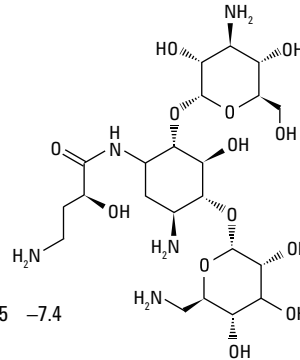


ジヒドロストレプトマイシン 128-46-1 NA

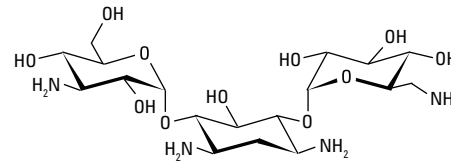


ゲンタマイシン 1403-66-3 NA

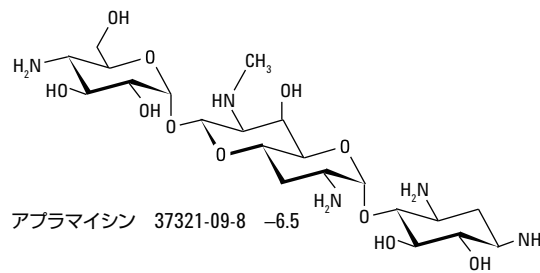
化合物 CAS 番号 LogP



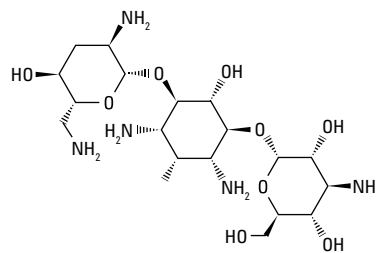
アミカシン 37517-28-5 -7.4



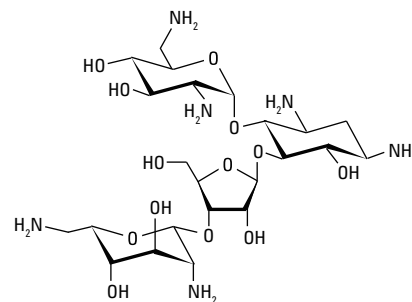
カナマイシン 59-01-8 -6.3



アプラマイシン 37321-09-8 -6.5



トブラマイシン 32986-56-4 -5.8



ネオマイシン 1404-04-2 -7.8

## 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でした。アセトニトリルと水は Honeywell International, Inc. から購入しました。標準物質は Dr. Ehrenstorfer (ドイツ、アウグスブルク) から購入しました。牛乳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) を水溶液として個別に作成し、冷凍庫で 4 °C で保存しました。混合作業用溶液 (10 µg/mL) をアセトニトリル:水 (10:90) を使用して作成し、これも 4 °C で保存しました。スパイク溶液は、混合作業溶液を水で相当濃度に希釈して 1 週間に一度生成しました。

### サンプル前処理

牛乳 (5 g) をポリプロピレン製遠心分離チューブに計量しました。10 mL の抽出溶液 (5 % トリクロロ酢酸、0.6 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA、15 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) をチューブに加えました。この混合物を 5 分間十分に振とうし、4,000 rpm で 5 分間、4 °C で遠心分離しました。上澄みを別のチューブに移しました。5 mL の抽出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 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 mol/L NaOH 水溶液で上澄みを pH 4.0 ± 0.5 に調整しました。これで、サンプル抽出溶液を SPE 処理に使用する準備が整いました。

### 固相抽出

図 1 に SPE の手順を示します。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。サンプル抽出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)。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 分間吸引し、充填剤を完全に乾燥させました。3 mL の ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液を使用し、1 mL/min の速度で化合物を溶出しました。溶離液を 40 °C の窒素気流下で乾燥させました。残留物を 1 mL の 20 mmol/L HFBA 水溶液に再溶解しました。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。

コンディショニング : 3 mL の CAN
平衡化 A : 3 mL の水
平衡化 B : 5 mL の 20 mmol/L HFBA 水溶液
ロード : サンプル抽出溶液
洗浄 : 5 mL の水
5 分間の吸引によるカートリッジの乾燥
溶出 : 3 mL の溶離液*
40 °C の窒素流で蒸発乾固
1 mL の 20 mmol/L HFBA 水溶液で再溶解

\*溶離液 : ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液 (8:2)

図 1. 牛乳のクリーンアップと濃縮 – Agilent Bond Elut Plexa SPE 手順

## 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 Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS/MS システム

## MS 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:	正、0 V
キャピラリ:	正、3,500 V

表 2. マルチプルリアクションモニタリングによりモニタした質量

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)
スペクチノマイシン	351.2	333.2	170	15
		207.1	170	18
ハイグロマイシン B	528.3	177.1	170	25
		352	170	20
ストレプトマイシン	582.4	263.2	180	30
		245.8	180	35
ジヒドロストレプトマイシン	584.4	263.3	180	30
		246.2	180	40
アミカシン	586.4	163.1	170	30
		425.2	170	15
カナマイシン	485.3	163.1	150	20
		324.2	150	10
アブラマイシン	540.3	217.1	140	25
		378.2	140	12
トブラマイシン	468.3	163.2	125	20
		324.2	125	8
ゲンタマイシン	478.3	322.3	125	8
		157.2	125	15
ネオマイシン	615.3	161.1	175	30
		293.1	175	20

## 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、混合作業溶液を使用して調整し、マトリックスブランクをスパイクしました (0.01、0.02、0.05、0.1、および 0.5 mg/kg)。マトリックスブランクは、前処理と SPE 手順を含む全手順を牛乳で実行して作成しました。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設定しました。検量線と LOD の結果を表 3 に示します。

表 3. 牛乳に含まれるアミノグリコシドの直線性と LOD

化合物	回帰方程式	R <sup>2</sup>	牛乳の LOD (ng/g)
スペクチノマイシン	$Y = 13790.2955x + 39429.2957$	0.996	0.1
ハイグロマイシン B	$Y = 891.7225x - 1190.5976$	0.998	0.2
ストレプトマイシン	$Y = 1197.4506x - 2934.9645$	0.994	2
ジヒドロストレプトマイシン	$Y = 2240.1902x - 1236.0908$	0.998	0.2
アミカシン	$Y = 1393.7561x - 1742.7928$	0.999	0.2
カナマイシン	$Y = 1107.6982x - 1720.5534$	0.998	0.2
アブラマイシン	$Y = 288.9123x - 207.5481$	0.999	0.5
トブラマイシン	$Y = 804.6063x - 1295.9858$	0.999	0.2
ゲンタマイシン	$Y = 1494.7223x - 894.2355$	0.999	0.2
ネオマイシン	$Y = 183.7889x - 240.7272$	0.994	0.5

## 回収率および再現性

このメソッドの回収率と再現性は、3つのレベル(濃度 0.01、0.02、0.05 mg/kg になるように牛乳にスパイク)で測定しました。各レベルで分析を6回繰り返して行いました。表4に、回収率と再現性のデータを示します。図2に、スパイクした牛乳抽出物(0.02 mg/kg)のクロマトグラムを示します。

表4. 牛乳に含まれるアミノグリコシドの回収率と再現性

化合物	スパイクレベル (mg/kg)	回収率 (%)	RSD (n = 6, %)
スペクチノマイシン	0.01	78.7	3.8
	0.02	82.5	5.6
	0.1	87.3	4.1
ハイグロマイシン B	0.01	73.1	8.7
	0.02	69.7	6.3
	0.1	77.3	5.9
ストレプトマイシン	0.01	78.1	7.7
	0.02	66.5	10.1
	0.1	71.8	7.1
ジヒドロストレプトマイシン	0.01	84.2	2.1
	0.02	88.2	3.1
	0.1	91.5	5.4
アミカシン	0.01	102.3	2.4
	0.02	97.2	2.7
	0.1	99.4	3.6
カナマイシン	0.01	98.7	4.5
	0.02	92.1	3.9
	0.1	93.6	6.8
アブラマイシン	0.01	97.1	4.8
	0.02	101.9	6.6
	0.1	89.6	7.1
トブラマイシン	0.01	92.5	2.9
	0.02	98.5	4.9
	0.1	94.8	1.7
ゲンタマイシン	0.01	107.3	3.9
	0.02	101.4	3.1
	0.1	105.8	4.5
ネオマイシン	0.01	88.2	6.7
	0.02	97.4	7.2
	0.1	87.6	5.4

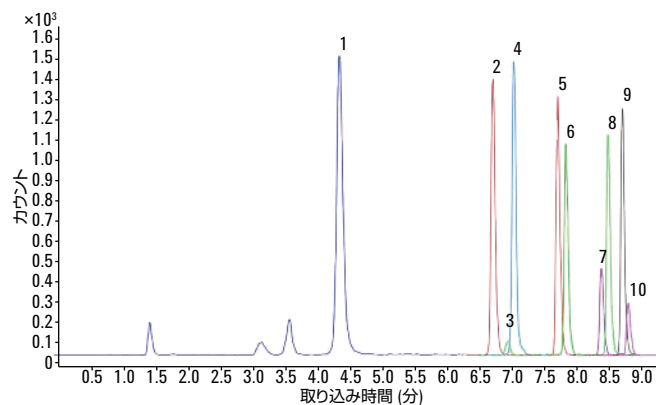


図2. 0.02 mg/kg でスパイクした牛乳サンプル抽出物のクロマトグラム。

1. スペクチノマイシン、2. ハイグロマイシン B、
3. ストレプトマイシン、4. ジヒドロストレプトマイシン、
5. アミカシン、6. カナマイシン、7. アブラマイシン、
8. トブラマイシン、9. ゲンタマイシン、10. ネオマイシン

## 結論

LC/MS/MS は、牛乳に含まれるアミノグリコシド系抗生物質を同時に定量し、確認するための信頼性の高い、パワフルな技術です。このアプリケーションノートの結果は、牛乳などの複雑なマトリックスに含まれる複数のアミノグリコシドの精製と濃縮のための有効なメソッドとして Agilent Bond Elut Plexa を使用できることを示しています。マトリックスをスパイクした標準に基づく回収率と再現性の結果は、国際規制に従った牛乳中残留アミノグリコシドの測定として十分なものです。不純物とマトリッ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しません。定量下限は MRL よりも大幅に低くなります [3]。

## 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。

本資料に記載の情報は、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. 2013

Printed in Japan

January 18, 2013

5991-1758JAJP



**Agilent Technologies**