

Bond Elut Plexa を用いた サンプル前処理と LC/MS/MS による 豚肉中ホルモン測定

アプリケーションノート

食品試験・農業

著者

Chen-Hao (Andy) Zhai
Agilent Technologies Shanghai Ltd.

はじめに

食品に添加される多くの化学物質は健康に害を及ぼす可能性があるため、食品の安全性は世界規模で検討が必要な重要事項です。ホルモンは一般的な食品添加物です。グルココルチコイドを長期間摂取すると、高血糖症、骨粗鬆症、先天性異常、免疫機能低下を引き起こすことがあります。エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロンなどのその他のホルモンは発癌性があり、乳ガン、卵巣癌、細胞癌の原因となることがあります。多くの国の規制では、食品に含まれるこれらの化合物の残留限界値を明確に定義しています。このような化合物の最大残留限界値は国によって異なりますが、一般的には ppb レベルに収まっています。多くの場合、このような濃度では、肉類などの製品に含まれるホルモンの分析は、サンプルが複雑なため非常に困難になります。

このアプリケーションノートでは、Agilent Bond Elut Plexa ポリマー SPE によるシンプルな SPE メソッド、Agilent Poroshell 120 LC カラムによる高効率の分離、また Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムによる高感度の検出を使用して、豚肉を前処理し、ppb レベルでホルモンを分析しました。



Agilent Technologies

材料とメソッド

LC 条件

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm (p/n 699775-902)
溶離液:	A: 水, B: アセトニトリル
注入量:	10 μL
流量:	0.4 mL/min
グラジエント:	20 % B, 5 分間で直線的に 40 % B まで、3 分間で直線的に 90 % B まで、10 分間保持
温度:	周囲温度
サンプルバイアル:	アジレント認定バイアル (p/n 5183-2072)
システム:	Agilent 1260 Infinity LC

MS 条件

イオン化モード:	ESI + Agilent Jet Stream
ガス温度:	325 °C
ガス流量:	10 L/min
ネブライザ:	50 psi
シースガス温度:	400 °C
シースガス流量:	12 L/min
キャピラリ:	4,500 V (ESI+), 3,500 V (ESI-)
ノズル電圧:	1,500 V (ESI+), 1,500 V (ESI-)
システム:	Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS

この実験のホルモンに合わせて最適化した MRM トランジション、フラグメンタ、およびコリジョンエネルギーを表 1 に示します。

表 1. ホルモンの MRM トランジションとその他の条件

化合物名	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグ メンタ	CE	極性
トリアムシノロン アセトニド	435.4	415.2	100	2	ポジティブ
	435.4	397.2	100	5	ポジティブ
ナンドロロン	407.4	257.2	150	10	ポジティブ
プロピオン酸フェニル	407.4	105.1	150	25	ポジティブ
デキサメタゾン	393.3	373.2	100	2	ポジティブ
	393.3	355.1	100	2	ポジティブ
メチルプレドニゾン	375.4	357.2	100	2	ポジティブ
	375.4	161.2	100	15	ポジティブ
ヒドロコルチゾン	363.4	327.2	125	8	ポジティブ
	363.4	121.1	125	20	ポジティブ
プレドニゾン	361.4	343.2	100	2	ポジティブ
	361.4	147.2	100	20	ポジティブ
プレドニゾン	359.3	341.2	125	2	ポジティブ
	359.3	147.1	125	20	ポジティブ
メチルテストステロン	303.4	109.1	125	25	ポジティブ
	303.4	97.2	125	25	ポジティブ
エストリオール	287.3	171.2	125	30	ネガティブ
	287.3	145.3	125	40	ネガティブ
トレンボロン	271.4	253.2	150	15	ポジティブ
	271.4	199.1	150	20	ポジティブ
ヘキサステロール	269.3	134.1	125	4	ネガティブ
	269.3	119	125	35	ネガティブ
ジエチルスチル ベストロール	267.3	251.2	150	15	ネガティブ
	267.3	237.2	150	20	ネガティブ

サンプル前処理

サンプルを前処理するために、5 g の豚挽肉を 50 mL の遠心管に入れ、次に 5 mL のメタノールと 20 mL の水を加えました。遠心管を 1 分間強く攪拌しました。次に、遠心管を 5,000 rpm、4 °C で 5 分間遠心分離し、SPE クリーンアップのためにすべての上澄みを別の試験管に移しました。

サンプルを抽出するために、図 1 に示した手順を使用しました。Agilent Bond Elut Plexa カートリッジ (60 mg, 3 mL, p/n 12109603) を最初に 3 mL のメタノールで、次に 3 mL の水でプレコンディショニングしました。抽出物 (5 g のサンプルに相当) を 1 mL/min の速度でカートリッジに通しました。サンプルが完全に通過した後、カートリッジを 3 mL の 35 % メタノール水溶液で洗浄し、すべての流出物を廃棄しました。カートリッジを陰圧 (2.0 kPa 未満) で 5 分間乾燥させました。サンプルを 5 mL のメタノールで溶出しました。溶出物を集め、40 °C 以下の窒素流で乾燥させました。20 % (v/v) メタノール水溶液でサンプル残留物を溶解して 1.0 mL の一定体積にし、0.2 μm フィルタメンブラン (Agilent Captiva Polyethersulfone, p/n 5190-5096) でろ過した後、LC/MS/MS で分析しました。

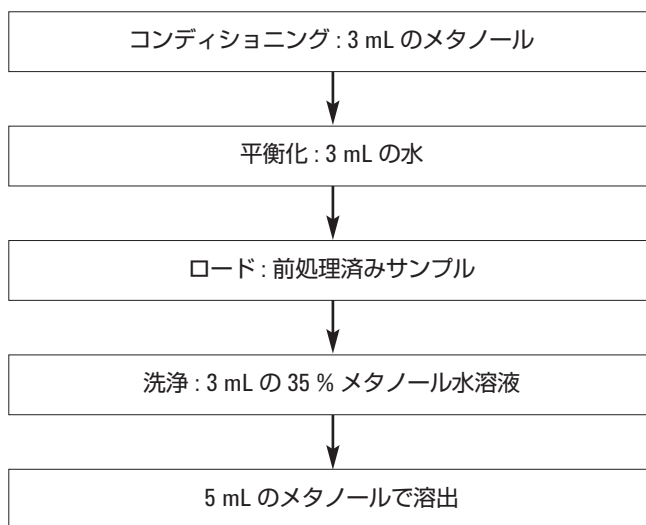


図 1. 豚肉サンプルの SPE 手順

結果と考察

各ホルモンの回収率を低濃度レベルと高濃度レベルの両方で測定しました(表 2)。回収率の計算は、SPE 抽出前にスパイクしたサンプルの MRM ピーク面積を、SPE 抽出後にスパイクしたサンプル(ポストスパイクサンプル)の MRM ピーク面積と比較することで行いました。図 2 に、低濃度のホルモンをスパイクした豚肉ブランクサンプルの分析で得られたクロマトグラムを示します。図 3 はサンプルブランクです。

表 2. SPE を使用した豚肉からのホルモン抽出の回収率

ホルモン	% 回収率 (%RSD) n = 6 低濃度 (1 ppb)	% 回収率 (%RSD) n = 6 高濃度 (10 ppb)
トリアムシノロンアセトニド	67.2 (5.4)	78.3 (7.9)
ナンドロロンフェニル プロピオネート	66.7 (9.8)	70.3 (6.3)
デキサメタゾン	86.9 (4.5)	91.4 (3.9)
メチルプレドニゾン	95.8 (5.2)	94.3 (8.3)
ヒドロコルチゾン	102.3 (7.1)	98.7 (4.4)
プレドニゾン	82.8 (3.7)	75.3 (3.9)
プレドニゾン	77.2 (4.3)	86.9 (1.4)
メチルテストステロン	80.1 (1.7)	87.6 (2.2)
エストリオール	53.7 (4.9)	67.5 (8.7)
トレンボロン	98.0 (3.5)	103.5 (3.2)
ヘキサステロール	34.7 (10.7)	46.8 (8.4)
ジエチルスチルベストロール	42.3 (5.1)	36.2 (5.8)

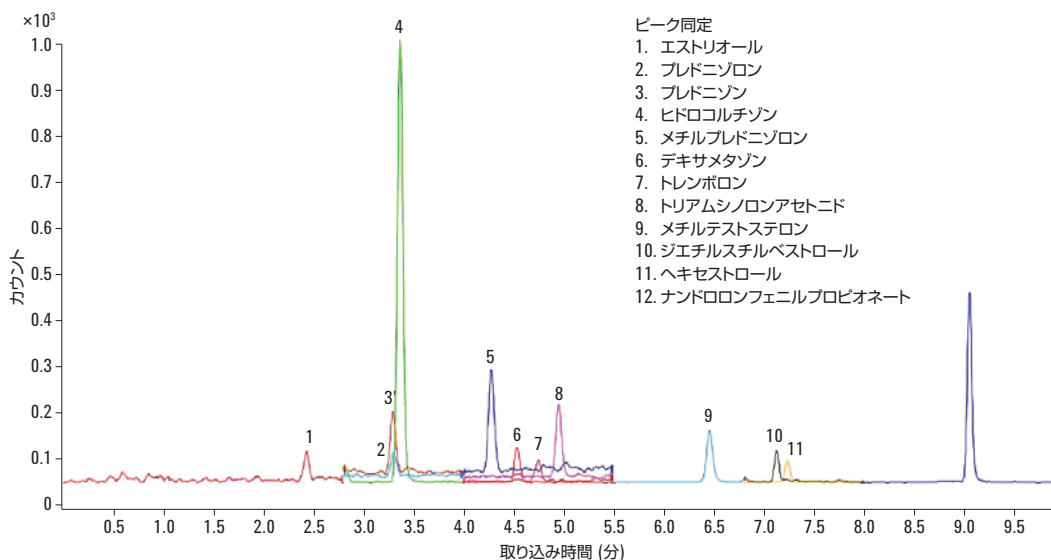


図 2. 低濃度サンプルをスパイクした豚肉から得られたホルモンのクロマトグラム

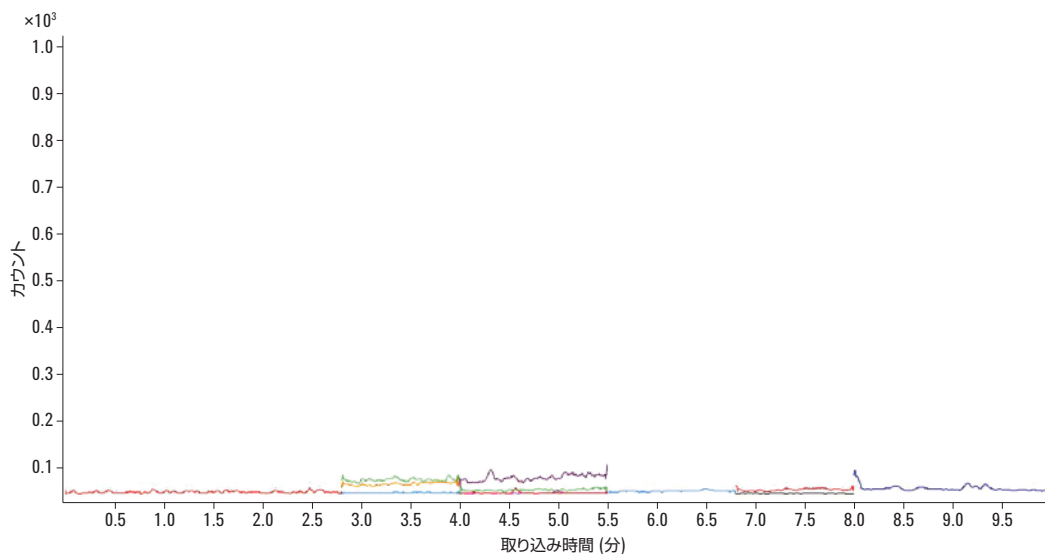


図 3. 豚肉ブランクサンプルから得られたホルモンのクロマトグラム

結論

豚肉マトリックス中のほとんどのホルモンについて、Agilent Bond Elut Plexa SPE で良好な回収率と再現性が得られました。ただし、ヘキサストールとジエチルスチルベストロールでは、結果がマトリックス効果の影響を受けたため、回収率を上げるために、これらの 2 つの化合物に同位体内部標準を使用する必要があります。

Bond Elut Plexa SPE を LC/MS/MS と組み合わせることで、肉サンプル中ホルモンの低 ppb 濃度での高感度定量が可能になります。

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) 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。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

November 21, 2013

5991-3660JAJP



Agilent Technologies