

Bond Elut QuEChERS dSPE EMR—Lipid と Poroshell 120 による 豚肉中のマクロライド系抗生物質分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Rong-jie Fu and Chen-Hao (Andy) Zhai
Agilent Technologies Shanghai Co. Ltd.

概要

このアプリケーションノートでは、QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) サンプル前処理法を用いた、豚肉中の 7 種類のマクロライド系抗生物質残留物の抽出およびクリーンアップについて説明します。スピラマイシン、チルミコシン、オレアンドマイシン、エリスロマイシン、タイロシン、ロキシスロマイシン、ジョサマイシンの残留物を分析しました。分析対象物は Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid を用いて抽出し、Agilent Poroshell 120 EC-C18 HPLC カラムで分離しました。液体クロマトグラフィーと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のエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を使用して定量しました。このメソッドは、豚肉中のすべてのマクロライド系抗生物質について低い検出下限を実現しました。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 5~250 µg/kg の間で得られました。全体の回収率は 63.9~98.4 % の範囲で RSD 値は 3.8~10.3 % の間でした。



Agilent Technologies

はじめに

食用動物の生産における抗生物質の使用は食品業界全体に利益をもたらしています。しかし、これらの使用は動物や人の健康の安全性への懸念を招いています。マクロライド系抗生物質は、動物の多くの呼吸器および腸の細菌感染症の治療に広く使用されている抗生物質のグループです。よく使用されているマクロライド系抗生物質の中に、スピラマイシン、チルミコシン、オレアンドマイシン、エリスロマイシン、タイロシン、ロキシスロマイシン、ジョサマイシンがあります。

国内機関や国際機関は動物由来の食品に含まれる抗生物質の残留物の濃度に規制値を設けています [1, 2]。残留物の規制値は 0~15 mg/kg とさまざまです。アプリケーションがハチミツ中の微量なマクロライド系抗生物質残留物の分析用に以前開発されました [3]。このメソッドでは、Agilent Bond Elut Plexa をサンプル前処理で、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを分離で使用しました。マトリックス添加標準を用いて評価した回収率と再現性は、ハチミツ中の規制対象のマクロライド系抗生物質残留物の測定における許容範囲内でした。

本実験の目的は、豚肉中のマクロライド系抗生物質残留物のルーチン規制分析用にシンプルで高速な複数残留物メソッドを開発することです。最新の充填剤の Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid は、成分損失なしに豚肉などの脂質含有量の高いマトリックスから主要な脂質成分を選択的に除去します。複雑なマトリックスからの脂質干渉の除去は質量レスポンスを向上させるマトリックス効果の低減などのたくさんの利点があり、LC カラムの寿命を延ばします。また、表面多孔質粒子 Poroshell 120 HPLC カラムは高速で高効率な分析を低背圧で実現します。

表 1 は、マクロライド系抗生物質の詳細を示しています。

表 1. 今回の実験で使用したマクロライド系抗生物質 (次ページへ続く)。

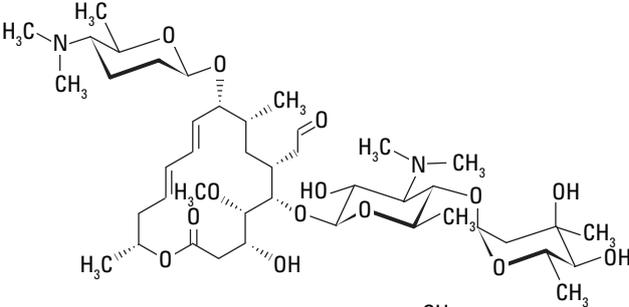
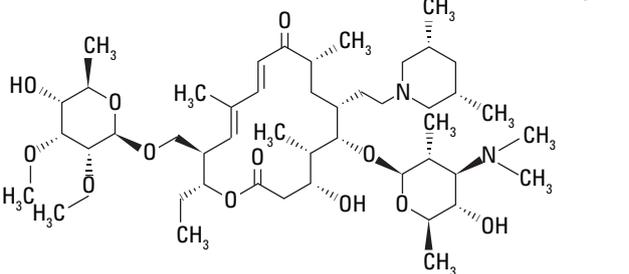
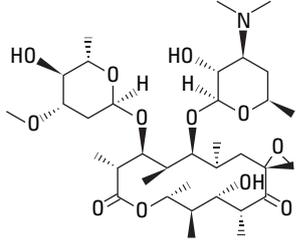
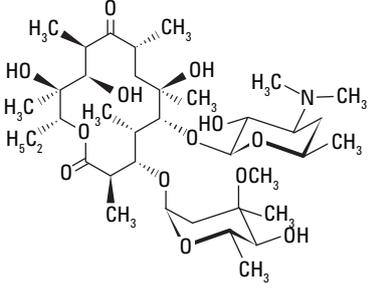
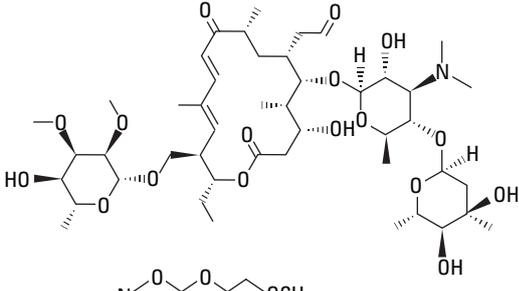
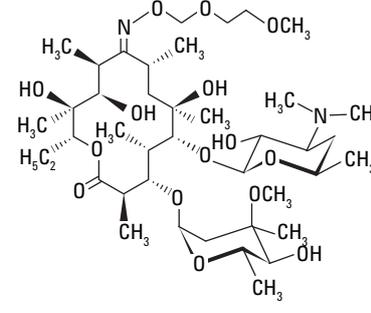
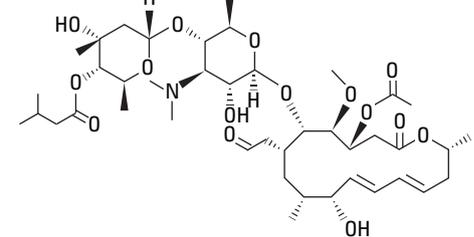
化合物	CAS No.	構造
スピラマイシン	8025-81-8	
チルミコシン	108050-54-0	

表 1. 今回の実験で使用したマクロライド系抗生物質。

化合物	CAS No.	構造
オレアンドマイシン	3922-90-5	 <p>The structure of Oleandomycin is a complex macrolide consisting of a 14-membered macrolide ring with a 16-membered ketolide ring fused to it. It features a trimethylammonium group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a hydroxyl group on the ketolide ring.</p>
エリスロマイシン	114-07-8	 <p>The structure of Erythromycin is a 14-membered macrolide ring with a 14-membered ketolide ring fused to it. It features a trimethylammonium group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a hydroxyl group on the ketolide ring.</p>
タイロシン	1401-69-0	 <p>The structure of Tylosin is a 14-membered macrolide ring with a 14-membered ketolide ring fused to it. It features a trimethylammonium group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a hydroxyl group on the ketolide ring.</p>
ロキシスロマイシ	80214-83-1	 <p>The structure of Roxithromycin is a 14-membered macrolide ring with a 14-membered ketolide ring fused to it. It features a trimethylammonium group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a hydroxyl group on the ketolide ring.</p>
ジョサマイシン	16846-24-5	 <p>The structure of Josamycin is a 14-membered macrolide ring with a 14-membered ketolide ring fused to it. It features a trimethylammonium group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a hydroxyl group on the ketolide ring.</p>

材料とメソッド

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 International, Inc. から購入しました。標準は、Dr. Ehrenstorfer (アウクスブルク、ドイツ) から購入しました。豚肉は地域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) はメタノールで個別に作成し、-20 °C で保管しました。混合作業溶液はアセトニトリル:水 (20:80) で作成し、-20 °C で保管しました。添加した溶液は、混合作業溶液を水で希釈することによって適切に毎日作成しました。

装置と材料

- Agilent 1290 Infinity LC
- Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム、エレクトロスプレーイオン源搭載
- Agilent Bond Elut QuEChERS 抽出キット EN (p/n 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid (p/n 5982-1010)
- Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid 脱水キット (p/n 5982-0101)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
- エッペンドルフ 5810 R 遠心分離機 (Brinkmann Instruments、ウェストベリ、ニューヨーク州、米国)
- デジタルボルテックスミキサー (VWR International, LLC、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

サンプル前処理

最終のサンプル前処理手順は、次のステップを使用して最適化しました。

- ホモジナイズした豚肉 2.5 g (±0.1 g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
- 水 8 mL を加えて 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- アセトニトリル 10 mL を加える
- QuEChERS 抽出キット EN メソッドの塩を加える
- サンプルを 1 分間振とうして混合する
- 4,000 rpm で 5 分間遠心分離する
- 水 5 mL を 15 mL EMR—Lipid dSPE チューブに加える
- 上澄み 5 mL を EMR—Lipid dSPE チューブに移す
- 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを攪拌して分散した後、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- 4,000 rpm で 3 分間遠心分離する
- 上澄み 5 mL を塩 (1:4 NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL EMR Lipid 脱水キットに移し 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- 4,000 rpm で 3 分間遠心分離する
- アセトニトリル層の上部 200 μL と水 800 μL を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで攪拌する

HPLC 条件

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
移動相:	A: 10 mM 酢酸アンモニウムおよび 0.1 % ギ酸水溶液 B: アセトニトリル
注入量:	2 μL
流量:	0.5 mL/min
グラジエント:	時間 (分) %B 0 20 5 65 6 65 8 20
温度:	30 °C

MS 条件

マクロライド系抗生物質はポジティブモードでモニタリングしました。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:	300 °C
ガス流量:	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、4,000 V

表 2. マルチプルリアクションモニタリングによってモニターした質量。

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)	リテンション タイム (分)
スピラマイシン	843.4	540.0	270	35	2.178
スピラマイシン	843.4	174.1	270	40	2.178
チルミコシン	869.5	696.4	320	44	2.749
チルミコシン	869.5	174.1	320	49	2.749
オレアンドマイシン	688.3	544.3	170	15	2.99
オレアンドマイシン	688.3	158.2	170	25	2.99
エリスロマイシン	734.4	576.3	180	14	3.204
エリスロマイシン	734.4	158.2	180	30	3.204
タイロシン	916.4	772.4	280	30	3.421
タイロシン	916.4	174.2	280	40	3.421
ロキシスロマイシン	837.4	679.3	200	16	4.087
ロキシスロマイシン	837.4	158.1	200	34	4.087
ジョサマイシン	828.4	174.1	250	35	4.461
ジョサマイシン	828.4	109.1	250	46	4.461

結果と考察

直線性と検出下限

外部検量線を作成するために使用した溶液は、混合作業溶液をマトリックスブランクに添加して調整しました (5、10、20、50、250 µg/kg)。マトリックスブランクは、前処理と QuEChERS 手順を含む手順全体を豚肉に適用することによって作成しました。検出限界 (LOD) のデータは、0.1 µg/kg でポスト添加した豚肉マトリックスを注入することによって S/N 比 3 を用いて計算しました。すべての S/N 比は 3:1 を超えました。このため、化合物のすべての LOD は 0.1 µg/kg 未満で、規制メソッドに合致しました。表 3 に、検量線の結果を示します。

表 3. 豚肉中のマクロライド系抗生物質の直線性。

化合物	回帰方程式	R ²
スピラマイシン	Y = 386.144x + 19.317	0.9994
チルミコシン	Y = 133.272x + 8.018	0.9999
オレアンドマイシン	Y = 317.284x + 43.963	0.9998
エリスロマイシン	Y = 848.506x + 119.918	0.9996
タイロシン	Y = 274.158x + 22.703	0.9997
ロキシスロマイシン	Y = 477.739x + 53.019	0.9997
ジョサマイシン	Y = 625.922x + 58.918	0.9998

回収率と再現性

このメソッドでの分析対象物の回収率と再現性は、10、20、100 µg/kg の 3 つのレベルの濃度で添加した豚肉のサンプルをレベルごとに 6 回分析して求めました。表 4 に分析対象物の回収率と再現性のデータを示します。図 1 に 20 µg/kg で添加した豚肉抽出物のクロマトグラムを示します。

表 4. 豚肉中のマクロライド系抗生物質の回収率と再現性 (n = 6)。

化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
スピラマイシン	10	89.7	10.3
	20	94.0	8.3
	100	95.2	3.8
チルミコシン	10	98.4	9.5
	20	90.0	9.7
	100	95.3	7.1
オレアンドマイシン	10	92.4	5.7
	20	96.4	7.1
	100	97.5	6.2
エリスロマイシン	10	64.5	8.8
	20	63.9	8.1
	100	68.7	5.1
タイロシン	10	84.1	10.2
	20	93.3	7.4
	100	94.6	5.5
ロキシスロマイシン	10	89.9	9.8
	20	91.6	7.7
	100	92.6	5.1
ジョサマイシン	10	87.9	7.4
	20	92.4	5.6
	100	93.2	4.9

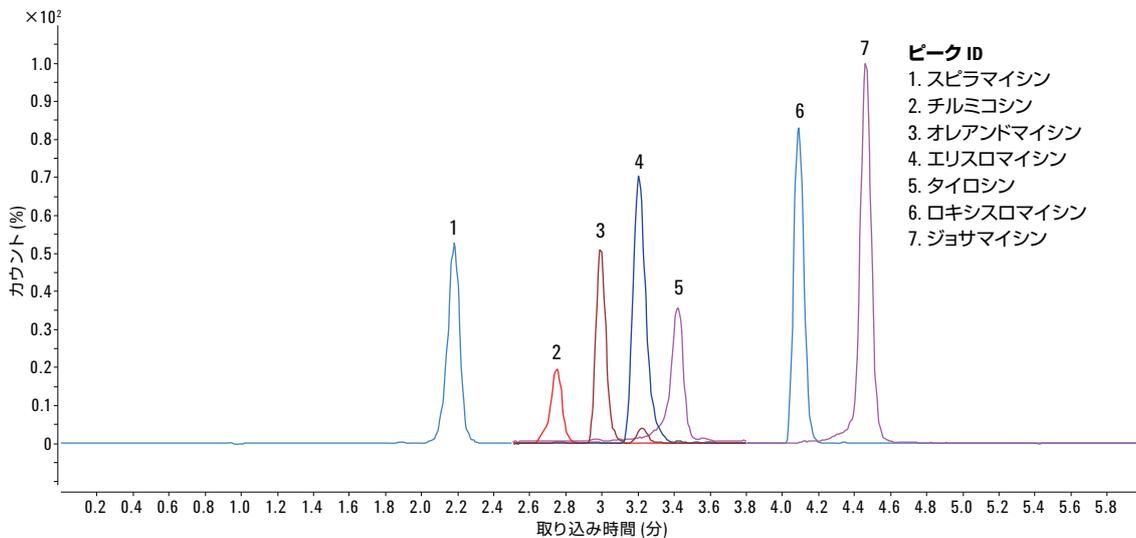


図 1. 20 µg/kg で添加した豚肉サンプルの抽出物のクロマトグラム。

結論

このアプリケーションノートでは、豚肉中のマクロライド系抗生物質の定量と確認を同時に実行できる迅速かつ堅牢で信頼性の高いメソッドを説明しました。EMR—Lipid と脱水キットにより、分析対象物の回収に大きな影響を与えることなく、優れたマトリックスクリーンアップを可能にしてほとんどのマトリックス、特に脂質を除去できます。Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムは、複数のマクロライド系抗生物質の迅速な分離を左右対称のピーク形状および高い感度で実現します。

参考文献

1. Anon. GB/T 23408-2009. *Determination of macrolides residues in honey – LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
2. SN/T 1777.2-2007. *Determination of macrolide antibiotic residues in animal-derived food – part 2: LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
3. Chen-Hao Zhai, Rong-jie Fu. *Macrolides in Honey Using Agilent Bond Elut Plexa SPE, Poroshell 120, and LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-3190EN, **2013**.

詳細

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. 2015

Printed in Japan

November 12, 2015

5991-6442JAJP



Agilent Technologies