

SPE と LC/MS/MS を用いた鶏肉と鶏卵中の リバビリンおよびアマンタジンの分析

著者

Congcong Zhang, Cuiling Wu,
Jianzhong Li, and Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.

概要

この研究では、鶏肉と鶏卵中のリバビリンおよびアマンタジンの定量分析用のメソッドを開発して検証しました。メソッドでは、SPE と LC/MS/MS を組み合わせて使用しました。5 % トリクロロ酢酸によりサンプルを抽出した後、Agilent Bond Elut PBA/PCX SPE カートリッジでクリーンアップしました。今回のメソッドでは、リバビリンとアマンタジンの同時測定において、回収率と再現性に優れた信頼性の高いソリューションが実現しています。

実験方法

機器メソッド

サンプルの分析には、Agilent 1260 Infinity II LC システムと、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース搭載の Agilent G6470 トリプル四重極 LC/ MS システムを連結して使用しました。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

HPLC 条件

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-Aq, 100 × 2.1 mm, 2.7 μm (p/n 685775-914)		
カラム温度	35 °C		
注入量	10 μL		
移動相	A) 0.5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (0.1 % 酢酸を含む) B) ACN		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	100	0
	2.0	100	0
	4.0	88	12
	5.0	88	12
	5.1	2	98
	9.0	2	98
	9.1	100	0

MS 条件

パラメータ	設定値
ガス温度	250 °C
ガス流量	7 L/min
ネブライザ	35 psi
データ取り込み	MRM (表 1 参照)

サンプル抽出

最初に、正確に 2 g のサンプルを計量して 50 mL の遠心分離チューブに入れ、40 μL の内部標準 (1 ppm リバビリン-¹³C₅、200 ppb アマンタジン-D₁₅) を加えてから、5 mL の 0.5 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.8) と 40 μL の酸性フォスファターゼ (0.25 U/μL) を加えます。30 秒間ボルテックスしてから、暗所において 37 °C で 2 時間振とうして酵素加水分解します。終了したら、4 mL の 5 % トリクロ

ロ酢酸を加えて 30 秒間ボルテックスします。10,000 rpm で 10 分間遠心分離します。上澄みを新しい遠心分離チューブに移し、5 % の水酸化アンモニウムで pH 8.5 に調整します。水を加えて容量を 10 mL にしてから再度遠心分離し、SPE によるクリーンアップに備えて 5 mL の上澄みを取ります。

図 1 は、SPE の手順を示しています。

表 1. ターゲット化合物の MRM 条件

分析対象物	プリカー Сайオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)
リバビリン- ¹³ C ₅	250.1	113	70	5
アマンタジン-D ₁₅	167.2	150.1	100	20
リバビリン	245.1	113	70	5
		96	70	30
アマンタジン	152.2	135	100	18
		93	100	30

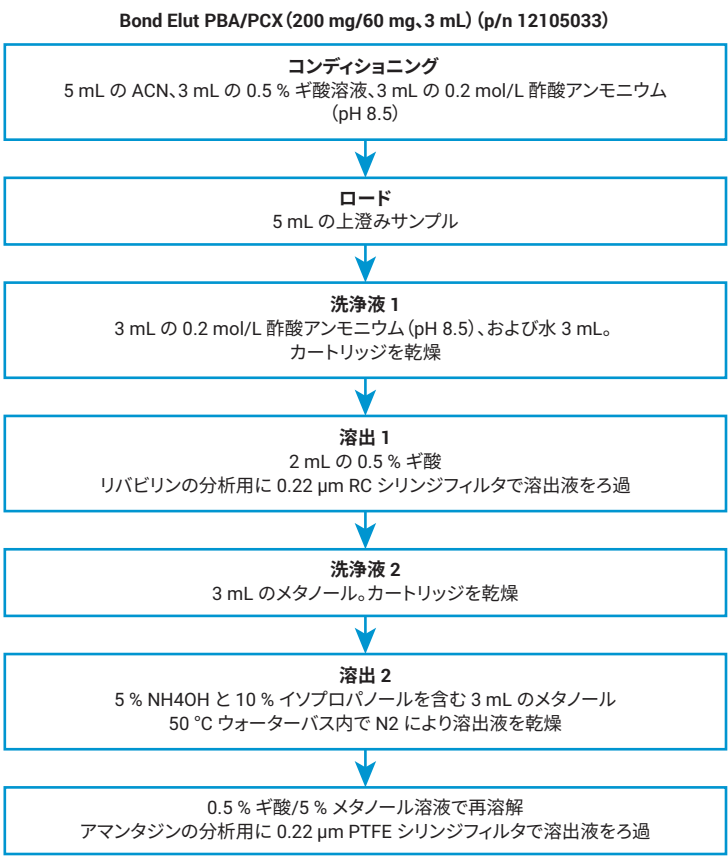


図 1. サンプル前処理のワークフロー図

結果と考察

今回のメソッドでは、リバビリンとアマンタジンの両方に対して良好な直線性が得られています（表 2 および図 2 ～ 4）。リバビリンのスパイクレベルを 1.5 ～ 15 µg/kg にして、アマンタジンのスパイクレベルを 0.3 ～ 3 µg/kg にした場合、回収率はそれぞれ 94 ～ 110 % および 85 ～ 112 % でした。また、RSD < 4 で、定量下限はそれぞれ 0.08 µg/kg および 0.03 µg/kg でした。

表 2. メソッドの回収率と RSD

マトリックス	成分	スパイクレベル (µg/kg)	回収率 (%)	RSD% (n = 3)
鶏肉	リバビリン	1.5	108.50	2.26
		5	94.67	3.26
		15	94.90	2.68
	アマンタジン	0.3	94.71	2.94
		1	86.66	2.19
		3	92.12	3.75
鶏卵	リバビリン	1.5	96.21	2.50
		5	94.26	1.78
		15	96.73	0.09
	アマンタジン	0.3	105.14	3.47
		1	96.78	1.06
		3	111.90	2.64

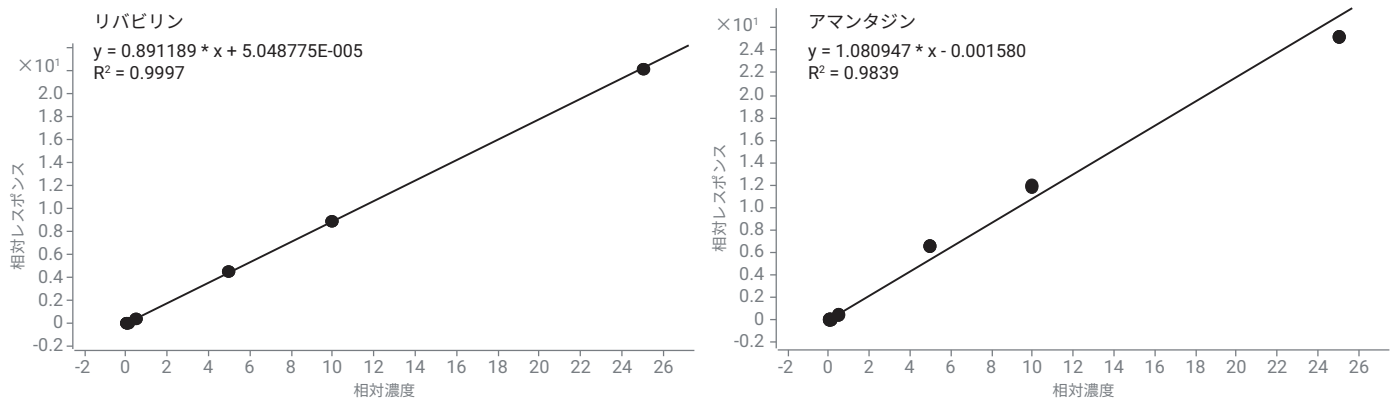


図 2. リバビリンとアマンタジンの検量線

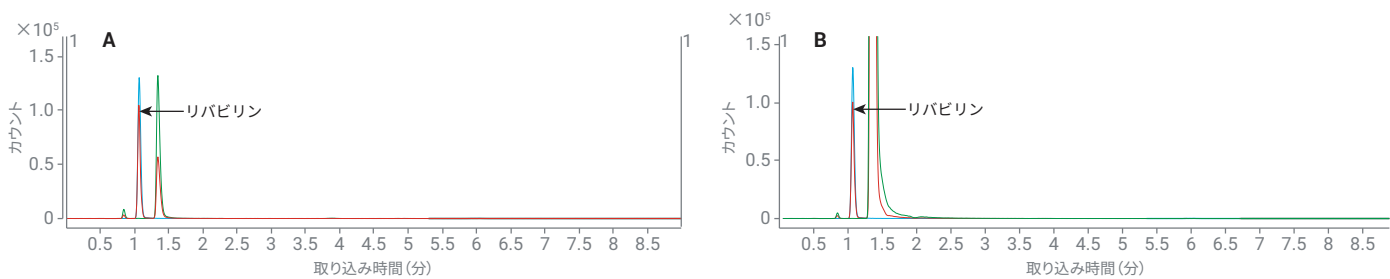


図 3. 標準原液 (青)、プレスバイクしたサンプル (赤)、マトリックスブランク (緑) 中のリバビリンの MRM クロマトグラム (A: 鶏肉、B: 鶏卵)

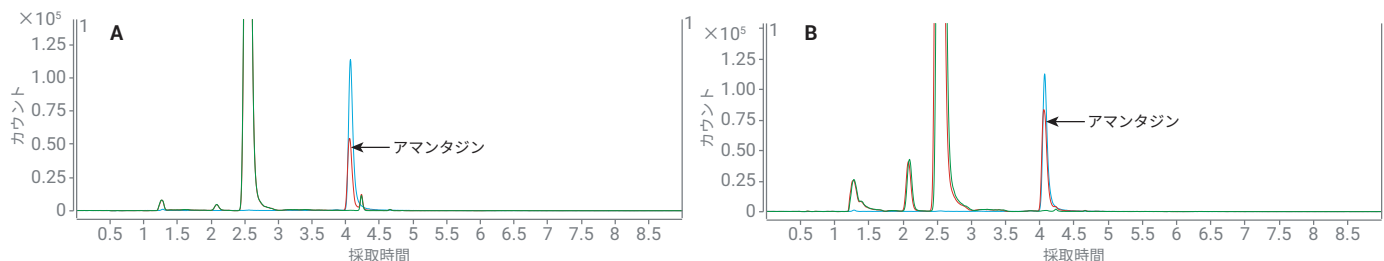


図 4. 標準原液 (青)、プレスバイクしたサンプル (赤)、マトリックスブランク (緑) 中のアマンタジンの MRM クロマトグラム (A: 鶏肉、B: 鶏卵)

結論

Bond Elut PBA/PCX は、フェニルボロン酸機能を持つシリカベースの充填剤およびポリマーベースのミックスモード溶媒カチオン交換基製品であり、このメソッドにおいて良好な回収率を実現しています。また、2つの抽出メカニズムを備えた Bond Elut SPE は、鶏肉と鶏卵中のリバビリンおよびアマンタジンの両方に対して、信頼性の高いソリューション、優れた回収率と再現性を実現しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2020
Printed in Japan, April 30, 2020
5994-1941JAJP
DE.5206365741