

SPE と LC/MS/MS を用いた ロイヤルゼリーと蜂蜜中の クロラムフェニコールおよび代謝物の分析

著者

Jinhui Zhou
China Bee Institute of
Academy of Agricultural
Sciences, Beijing, China
Congcong Zhang, Cuiling Wu,
and Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.
Beijing, China

概要

この研究では、ロイヤルゼリーと蜂蜜中のクロラムフェニコール、チアンフェニコール、フロルフェニコール、およびその代謝物のフロルフェニコールアミンの定量分析用のメソッドを開発して検証しました。Agilent Bond Elut Plexa PCX でサンプルを前処理した後、Agilent 6470 LC/MS/MS で分析を実施しました。今回のメソッドでは、クロラムフェニコールとそれに関連する化合物に対して、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

ターゲット化合物

このアプリケーションでは、クロラムフェニコール、チアンフェニコール、フロルフェニコール、およびその代謝物のフロルフェニコールアミンという 4 種類のターゲット化合物を用いました。

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 6470 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 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
流量	0.4 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	5 μL
移動相	A) 水 + 0.1% 酢酸 B) アセトニトリル
グラジエント	溶媒 B を 7 分間で 10% から 100% まで増大

MS 条件

パラメータ	設定値
ガス温度	250 °C
流量	0.4 mL/min
ガス流量	7 L/min
ネブライザ	40 psi
シースガス流量	12 L/min

表 1. ターゲット化合物の MRM 条件

分析対象物	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	イオン化モード
クロラムフェニコール	321.0	257.0 152.0	100	10 15	ネガティブ
チアンフェニコール	356.0	335.9 184.9	100	8 15	ネガティブ
フロルフェニコール	353.9	289.9 184.9	120	10 15	ネガティブ
フロルフェニコールアミン	248.1	230.1 130.1	70	4 20	ポジティブ

サンプル抽出

ロイヤルゼリーサンプルを正確に 2 g 計量して、50 mL 遠心分離チューブに入れます。0.25 g のトリプシンと 2 mL の水を加え、暗所において 40 °C で 2 時間振とうします。抽出用に 2% 水酸化アンモニウムを含む 8 mL のアセトニトリルを加え、1 分間ボルテックスしてから、4 °C で 10 分間遠心分離します。上澄みを、水だけがなくなるまで 40 °C で窒素ガスにより乾燥させます。純水を加えて容量を 5 mL にし、Bond Elut Plexa PCX、500 mg、6 mL (p/n 12258506) によるクリーンアップを実施します。

蜂蜜サンプルに対しては、5 g の蜂蜜を 20 mL の純水と混合してボルテックスし、4 °C で 10 分間遠心分離します。これで、上澄みを Bond Elut Plexa PCX、200 mg、6 mL (p/n 12108206) でクリーンアップする準備が完了しています。SPE の手順を図 1 に示しています。

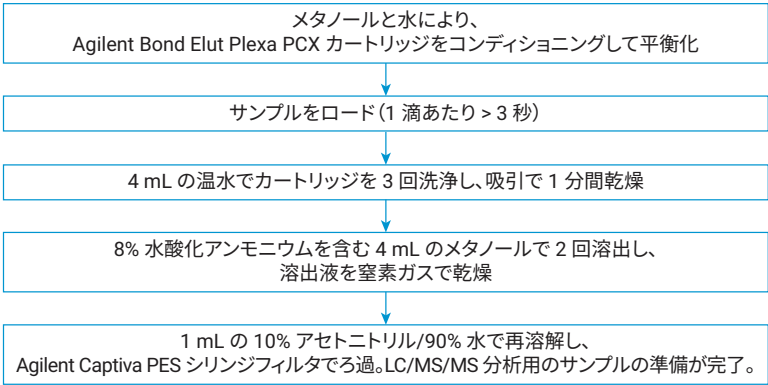


図 1. SPE クリーンアップのワークフロー図

結果と考察

表 2. メソッドの回収率と RSD

マトリックス	分析対象物	1 ng/g スパイク (フロルフェニコールアミンの場合 2 ng/g)		2 ng/g スパイク (フロルフェニコールアミンの場合 4 ng/g)		5 ng/g スパイク (フロルフェニコールアミンの場合 10 ng/g)	
		回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)	回収率 (%)	RSD (%)
ロイヤルゼリー	クロラムフェニコール	100.5	1.0	115.0	4.3	116.9	0.6
	チアンフェニコール	85.0	3.0	72.0	5.7	78.7	3.7
	フロルフェニコール	93.7	4.9	96.7	6.4	105.9	6.9
	フロルフェニコールアミン	87.7	1.8	83.0	4.8	80.2	4.1
蜂蜜	クロラムフェニコール	87.5	3.5	97.8	2.1	106.4	1.8
	チアンフェニコール	99.4	1.3	96.2	1.4	105.6	0.4
	フロルフェニコール	96.4	3.1	93.6	5.3	96.6	3.7
	フロルフェニコールアミン	79.0	0.6	86.3	1.1	92.4	2.8

結論

ポリマー系カチオン交換基と疎水性相互作用を組み合わせた製品である Bond Elut Plexa PCX SPE カートリッジを用いたメソッドを開発しました。このサンプル前処理を LC/MS/MS と組み合わせることにより、ロイヤルゼリーと蜂蜜中のクロラムフェニコール、チアンフェニコール、フロルフェニコール、およびその代謝物のフロルフェニコールアミンの分析において優れた回収率と再現性が得られています。今回のメソッドでは、質量分析のポジティブおよびネガティブモードの両方のターゲットに対して、高い感度を実現しました。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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, May 1, 2020
5994-1944JAJP
DE.5250925926