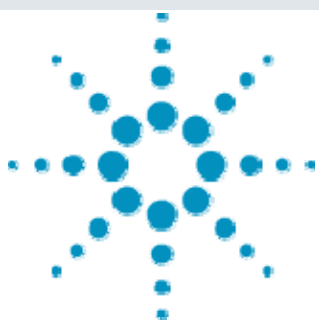




Agilent 6460 による クレンブテロールの 高感度分析



＜要旨＞ 豚肉中クレンブテロールについて LC-MS/MS による高感度分析法を検討しました。その結果、HPLC の移動相条件を最適化することで告示試験法に指定されている定量下限値以下での測定が可能でした。また、タレ付豚カルビ中でもサロゲート物質としてクレンブテロール-d9 を用いることで 0.1ng/g 相当のクレンブテロールの定量が可能でした。

Key Words: クレンブテロール、LC-MS/MS、サロゲート物質、ESI

1. はじめに

クレンブテロールは本来、慢性喘息患者の治療に用いられる気管支拡張剤です。しかし、この医薬品を豚などの家畜に飼料と混ぜて与えると赤身が増加することから肉質改善目的に使用されることがあります。しかし代謝が遅いことから家畜の肉への残留性が高く人が長期にわたり摂取した場合、慢性腫瘍を誘発する危険があることから、わが国では家畜への使用は禁止されています。平成 18 年 11 月から実施されたポジティブリスト制では『食品において「不検出」とされる農薬等の成分である物質』に指定されています。しかし、中国では違法に使用されている場合が多く、昨年 11 月にはクレンブテロールが残留した食品による 70 人もの大量食中毒が発生しています。さらに、検疫所でのモニタリングにより中国産豚串かつからクレンブテロールが検出されたことから、今年 6 月 22 日(食安発第 0622003 号)厚生労働省から命令検査実施に関する通知が出されました。

しかしクレンブテロールの告示試験法では測定が困難であることから”動物用医薬品クレンブテロールに係る試験法について(食安発第 0624004 号)”が厚生労働省から出され、移動相組成、グラジエント条件を変更した試験法を使用しても差し支えないことが通知されました。そこで今回、移動相条件を変更した LC/MS/MS 法を検討しました。さらに回収率の補正のため、サロゲート物質としてクレンブテロール-d9 を使用した内部標準法を使用しました。

2. 装置及び測定条件

分析条件は表.1 に示した通りです。カラムには逆相系カラムを使用し、移動相に 0.1%ギ酸とアセトニトリルを用いたグラジエント条件で測定しました。MS 条件はイオン源に Agilent Jet Stream(AJS)を用

いた正イオンモードで測定し、Sheath gas 温度及び流量は最大の 400℃、12L/min に設定しました。MRM 条件は図.1 に示しました。

添加回収試験にはコントロール及び 0.1ng/g 相当のクレンブテロール及びサロゲート物質としてクレンブテロール-d9(0.4ng/g)を添加したタレ付豚カルビを使用し、告示試験法に従って調製しました。

表.1 LC-MS/MS によるクレンブテロールの分析条件

LC	: 1200LC
Column	: ZORBAX Extend C18(100mm,2.1mm,1.8 μm)
Mobile phase	: A: 0.1%HCOOH, B: ACN 10%B---(10min)---30%B
Column temp	: 25℃
Injection volume	: 3uL
Flow rate	: 0.2mL/min
MS	: Agilent 6460 Triple Quad LC/MS
Ionization	: Agilent Jet Stream (Positive)
Drying gas	: 10L/min at 350C
Nebulizer gas	: 345kPa
Fragmentor	: 100V
Sheath gas	: 12L/min at 350℃
Nozzle voltage	: 0V

No	Precurser	Target	Qualifier	CE1	CE2	
1	Clenbuterol	277	203	259	5	5
2	Clenbuterol-d9	286	204		10	

3. 結果及び考察

図.1 に MRM モードでのクレンブテロール標準液及びクレンブテロール-d9(I. S)の MRM クロマトグラムを示しました。S/N 比は 0.1ng/mL で 52 であり S/N=10 とした定量下限値は 0.02ng/mL となり、告示試験法で定められている定量下限値(0.05ng/g)を満足するものでした。また確認用 MRM トランジションでも 0.1ng/mL でピークの検出が可能で定量用イオンとの比率(41%)は 50ng/mL での比率(43%)と良く一致していました。直線性は内部標準法での検量線を図.2 に示しましたが 0.1-50ng/mL の範囲で決定係数は 0.998 と良好でした。



Agilent Technologies

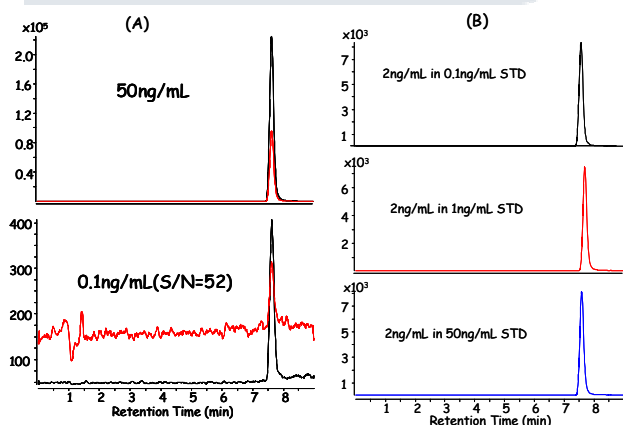


図. 1 クレンブテロール及び I. S の MRM クロマトグラム (A): クレンブテロール (B): I. S

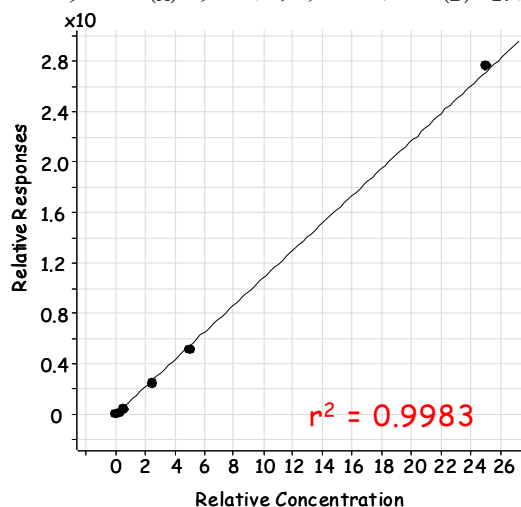


図. 2 クレンブテロールの検量線

タレ付豚カルビのコントロール及び添加試料の MRM クロマトグラムを図. 3 に示しました。その結果、コントロールではクレンブテロールの測定を妨害するピークは定量用、確認用共に認められませんでした。一方、0.1 ng/g 相当のクレンブテロールを添加した試料では定量用、確認用共にピークが検出されました。

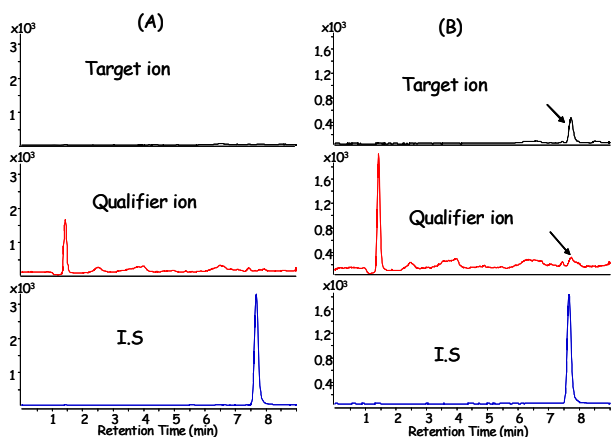


図. 3 タレ付豚カルビ中クレンブテロールの MRM クロマトグラム (A): コントロール 試料

(B): 0.1 ng/g 添加試料

定量結果は表. 3 に示しました。添加試料での回収率は 94%と良好な結果でした。また、装置の再現性は添加試料を 5 回測定することで評価したところ、図. 4 及び表. 3 に示した通り再現性は絶対ピーク面積で 2.8%、I. S で補正したピーク面積で 1.5%と良好な結果でした。

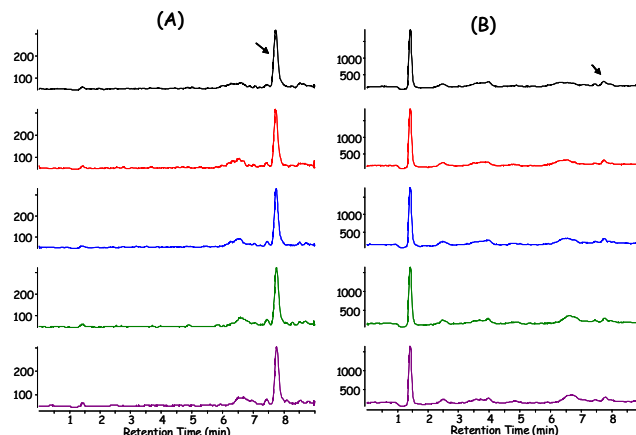


図. 4 タレ付豚カルビ試料中でのクレンブテロールの MRM クロマトグラム (n=5)

表. 2 クレンブテロールの定量結果 (ng/mL)

Name	Clenbuterol					I.S	
	RT	area	Conc.	Accuracy	Ratio	RT	area
50ppb	7.65	2170721	50.96	102	43	7.59	78450
10ppb	7.65	401577	9.60	96	42	7.59	77373
5ppb	7.63	200252	4.61	92	42	7.57	80821
1ppb	7.75	30120	0.84	84	41	7.69	70547
0.5ppb	7.63	17449	0.45	90	44	7.57	81230
0.1ppb	7.62	3622	0.14	136	41	7.57	80957
Control	7.74	ND	NA	NA	NA	7.67	30381
Spiked-1	7.73	2567	0.53	94	34	7.66	9875
Spiked-2	7.72	2399	0.53	95	40	7.67	9308
Spiked-3	7.75	2410	0.53	95	40	7.69	9364
Spiked-4	7.75	2477	0.55	92	37	7.69	9260
Spiked-5	7.76	2426	0.54	93	41	7.70	9188
Average	7.74	2456	1	94	39		
STDEV	0.02	68.8485	0.008	1.39076	2.686		
RSD	0.21	2.80	1.50	1.49	6.97		

4. まとめ

今回、LC-MS/MS を用いた豚試料中クレンブテロールの分析法を検討しましたが、HPLC のグラジエント条件を告示試験法から変更することでタレ付豚カルビ中においても測定が可能であり、さらにクレンブテロール-d9 をサロゲート物質として使用することで添加回収率も 94%と良好な結果でした。

【LCMS-200908TK-001】

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies