Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

畜水産物中の動物用医薬品のスクリーニング分析

No. 720003189J

目的

畜水産物中の150種を超える残留動物用医薬品スクリーニングの効率的なソリューションを紹介させていただきます。

概要

動物用医薬品は、動物の疾病の治療と予防に幅広く使用されており、肉、魚、乳、卵、蜂蜜などの畜水産物に残留する可能性があります。そのため食物連鎖における残留薬剤によるヒトの健康への影響が問題視されています。実際に、畜水産物中に薬剤が残留すると、菌耐性の発現の原因となり、アレルギー反応や臨床治療における二次的問題を引き起こす可能性があります。消費者の健康を守り、畜水産物の品質を維持するために、畜水産物中の残留薬剤に対して許容レベルを定める最大残留基準値（MRL）が世界的に制定されています[1-3]。

従来から、生体マトリックス中の残留動物用医薬品は、微生物学的または免疫化学的な手法によって分析されていました[4]。これらの試験は、特定の化合物群に対しては迅速で経済的なスクリーニング手法です。しかし、個々の試験キットは一般的に単一の化合物群にしか適応せず、また定量の正確性の点でも問題となる場合があります。
日本では、平成18年にポジティブリスト制度が施行され、残留薬剤に対する規制がより厳しくなってまいりました。偽陽性を最小限に抑え、正確な定量及び定性を行うための分析技術として現在ではタンデム型四重極質量分析計が広く用いられるようになってまいりました。

また最近では、飛行時間型質量分析計（TOF MS）によるスクリーニング分析法が報告されており、 TOF MSの網羅的なデータ取り込み手法と、対象化合物数が増加した場合においてもパフォーマンスの低下が少ないといった利点が注目されています。しかし、従来のTOFスクリーニングにおいては、まずピークを同定し、その後その化合物の定量を行う場合、複雑で非常に時間のかかる解析作業が必要でした。また定性的プロセスから定量的プロセスへの移行が手動で行われるため、解析操作に時間がかかるだけでなく、誤操作の可能性も高まります。よってシンプルなワークフローで、迅速且つ正確なスクリーニング分析及び解析手法が必要とされてきました。

このアプリケーションノートでは、ウォーターズACQUITY UPLC®/四重極-飛行時間型質量分析計Xevo™ QTof MSを用いた、150種を超える残留動物用医薬品とその代謝物のターゲットスクリーニング分析例を紹介します。ターゲットとする化合物には、アベルメクチン、ベンズイミダゾール、β-アゴニスト、β-ラクタム、副腎皮質ステロイド、マクロライド、ニトロイミダゾール、キノロン、スルホンアミド、テトラサイクリン等幅広い動物用医薬品を含んでいます。分析には高分離能を維持しながら高速な分析が可能なACQUITY UPLC®及び高感度、高分解能であり、精密質量データを取得可能なXevo™ QTof MSを用いました。またデータ処理にはPOSI±IVE™ソフトウェアを用いました。このソフトウェアは、 Xevo™ QTof MSで得られた精密質量データからたった一度の解析プロセスで定性及び定量結果を得る事ができます。つまり、得られたデータ中から今回は150種を超える動物用医薬品の有無を確認し、その結果陽性として検出された成分のみの定量分析結果までを自動で解析することが可能となり、従来複雑であったワークフローを簡便化することが可能です。

実験

サンプル前処理

肝臓、血液、魚、肉のサンプル前処理では、5gのサンプルを20mLのアセトニトリルおよび5gの無水硫酸ナトリウム（Na_2SO_4）と混合し、遠心分離を行いました。その後、4mLの上澄みに0.4mLのDMSO（ジメチルスルホキシド）を添加しました。その後アセトニトリルを乾固し、サンプルが0.8 gになるように水を加え、遠心分離し、注入サンプルとしました。スクリーニングを行った動物用医薬品のリストをAppendix1に記載します。

UPLC®条件

LCシステム:	ACQUITY UPLC®
カラム:	ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 µm, 2.1x100 mm
カラム温度:	40℃
移動相A:	0.1%ギ酸
移動相B:	アセトニトリル+0.1%ギ酸

グラジエント

時間(分)	%A	%B
0.00	95	5
0.25	95	5
6.00	5	95
7.00	5	95
7.20	95	5
9.00	95	5

流速:	0.40 mL/min
注入量:	20 µL フルループ

MS条件

MSシステム:	XEVO™ QTof MS
分析モード:	MS^E
イオン化モード:	ESIポジティブ
キャピラリー電圧:	2.4 kV
コーン電圧:	30 V
コリジョンエネルギー:	6 V
MS^Eコリジョンエネルギ:	20-35 V(ランプ)
ソース温度:	120 ℃
脱溶媒温度:	400 ℃
脱溶媒ガス量:	800 L/hr
コーンガス量:	20 L/hr
取り込みレンジ:	m/z 50-1000/0.1 s

データの取り込みと処理

データはウォーターズMassLynx™ソフトウェア(Ver.4.1)を用いて取り込み、解析はPOSI±IVE ™ソフトウェアを用いました。データ取り込みは、MS^Eモードで行い、常時2つのチャンネルを取り込みました(分子イオン情報に対して低CE(Collision Energy :コリジョンエネルギー)、プロダクトイオン情報に対して高CE)。TOFスクリーニングワークフローを図1に、MS^Eの詳細を図2に示します。

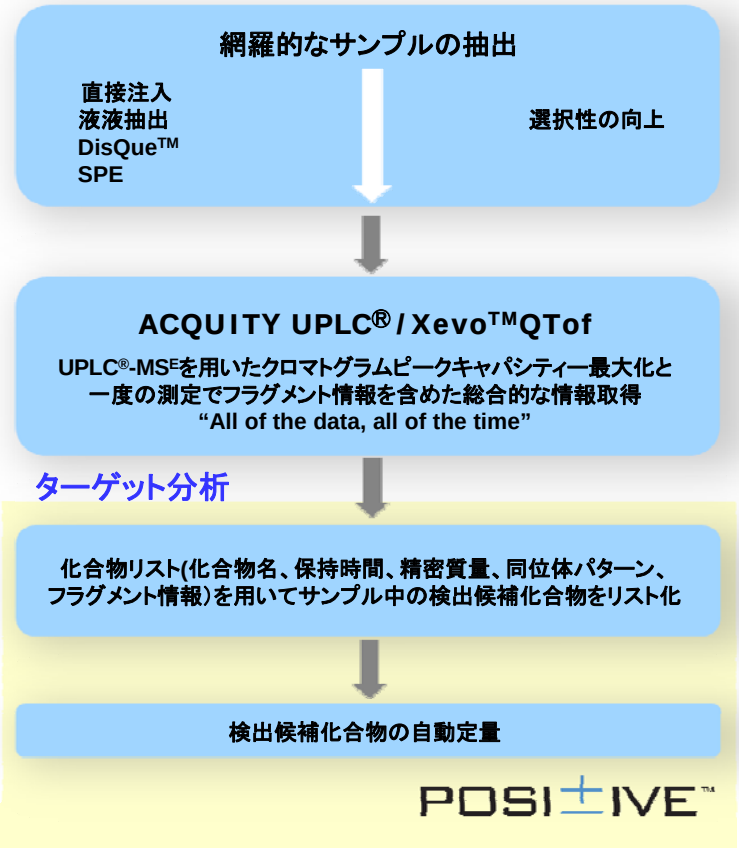

図1. 一般的なサンプル前処理からデータ解析までのTOFスクリーニングのワークフロー

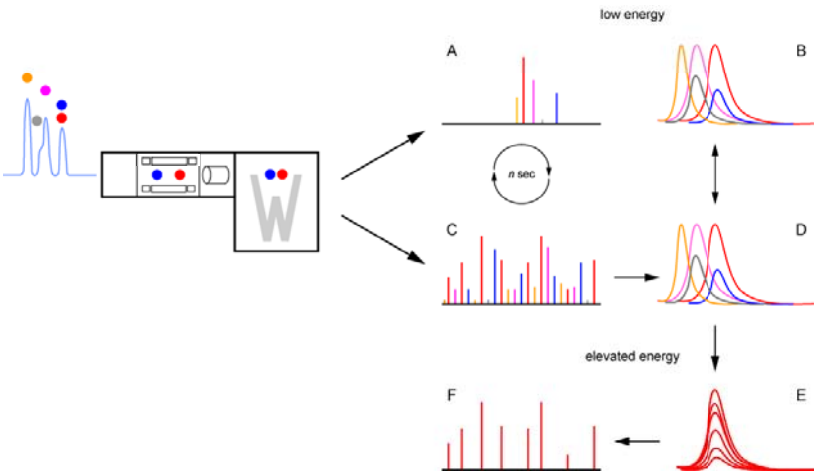

図2. MS^E並列データ取り込み

ガスセルのコリジョンエネルギーを、低(5 V)と高 エネルギー (20 から 35 Vにランプ) の2つの状態に交互に切り替えるため、取り込み条件設定がシンプルで、LCの分離全体にわたってデータ取得が同時並行でかつ、途切れません。

結果と考察

ACQUITY UPLC®の高いクロマトグラフ分離能と、 精密質量を取得可能なXevo™ QTof MSの高い質量スペクトル分離能により、複雑なマトリックスにおいても高い選択性が得られました。牛の肝臓抽出物のトータルイオンクロマトグラム(TIC)と、肝臓抽出物中のダノフロキサシンの精密マスクロマトグラムの抽出例を図3に示します。

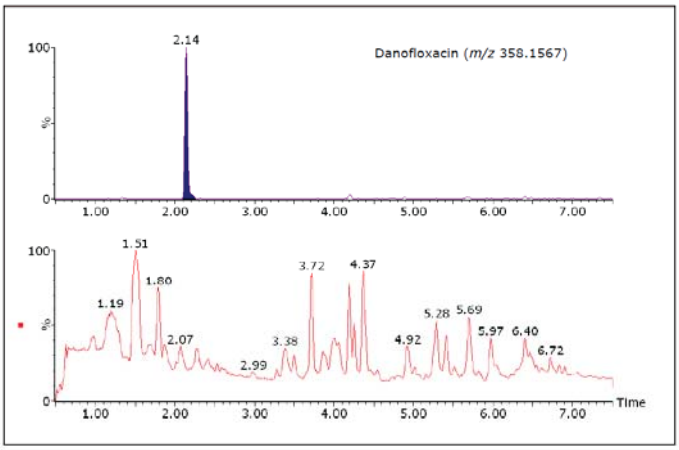

図3. 肝臓抽出物中のダノフロキサシンのマスクロマトグラム(上図)とトータルイオンクロマトグラム(下図)

UPLC®の高分離クロマトグラフィ及びXevo™ QTof MSの高い分離能は、選択性を高め結果の信頼性を向上させます。さらに、プロダクトイオンの情報が、化合物を明確に同定するために極めて有益となります。
キシラジンとモランテルの分析における信頼性向上の例を図4に示します。キシラジンとモランテルは同一の元素組成(C12H16N2S)を持つため、精密質量(m/z 221.1112)が同一であり、保持時間(2.44と2.52min)も非常に類似した化合物です。つまり、両化合物は元素組成が同一であるため、分子量由来の質量スペクトルで化合物を同定する事はできません。しかし両化合物は同一のプロダクトイオン(m/z 164.0536)も検出されますが、異なるプロダクトイオン(m/z 90.0366と150.0381)が検出されるため、このプロダクトイオンを用いて各化合物を同定することが可能です。
このような場合は構造情報(プロダクトイオン)を用いて化合物を正確に同定する事が重要となります。

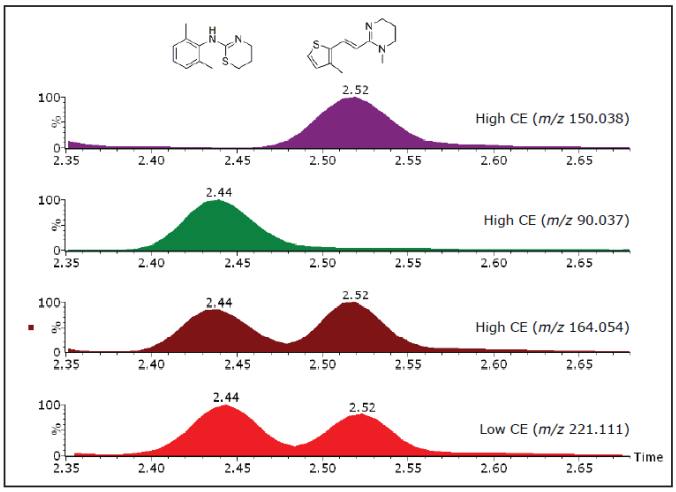

図4. キラジンとモランテルのマスクロマトグラム 精密質量が同じであり且つ保持時間の類似した2化合物をMS^{E}によるフラグメントイオンで同定

プロダクトイオンスペクトル情報を得る方法としてインソースフラグメンテーション、MS/MS、MS^{E}があります。

- インソースフラグメンテーションは、プロダクトイオンが得られる直接的な方法ですが、MSモードに比べて感度が低下し、移動相とマトリックス条件により、ソース条件が変化するためコントロールが難しい場合があります。

- MS/MSは、クオリティの高いプロダクトイオンスペクトルが得られますが、マトリックス等サンプルの複雑さにデータの質が影響を受ける場合があるため、使用に際してはサンプルに対する知識が必要です(データディペンディッドアナリシス(DDA))。

- MS^{E}は、ウォーターズが特許取得を取得した、データに依存しない手法です。一回のインジェクションで、検出可能な全ての化合物に対して、分子イオン情報(MS)とプロダクトイオン情報(MS^E)をパラレルに得られる、シンプルで連続的なデータ取り込み手法です。

この情報は、プロダクトイオンがマトリックス内である一定のレベルで検出可能な場合に有効です。
図5に、牛の血液抽出物中のスルファドキシンのMS^E での低CEと高CEマスクロマトグラムを示します。この例では、プロダクトイオンがマトリックス内である一定レベル以上であり、スルファドキシンのプロダクトイオンが検出可能であることが示されています。

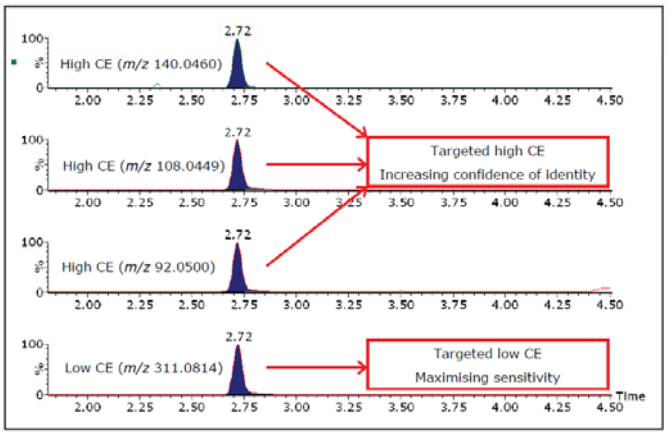

図5. 牛の血液中のスルファドキシンのマスクロマトグラム MS^{E}による高CEにおいて、プロダクトイオンが高感度で検出

図6は、MS^{E}モードで得られた低CEと高CEのスペクトルの違いを示しています。低CEスペクトルでは分子イオンが非常に感度良く検出されているのに対し、高CEスペクトルには化合物同定の信頼性を高めるプロダクトイオン情報が含まれています。

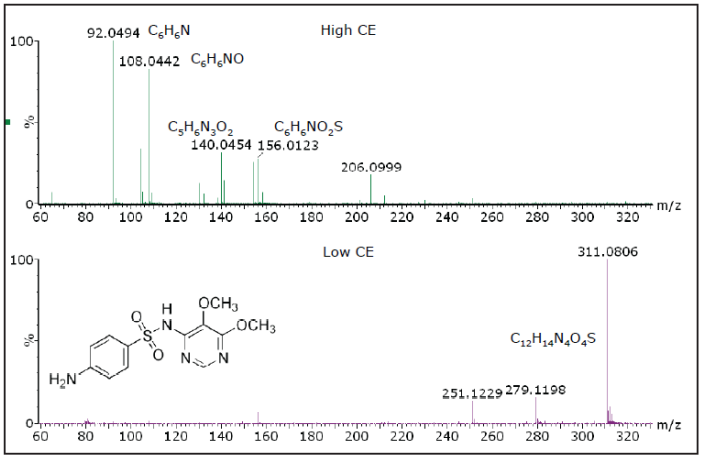

図6. 牛の血液中の高CE(上図)及び低CE(下図)条件におけるスルファドキシンのマススペクトル

サンプルの分析時間は9分(平衡時間を含む)のため、1日あたり100サンプル以上の分析が可能です。
しかし、各サンプルについて150種の動物用医薬品のスクリーニング解析を行う場合は、従来の解析方法では解析のスループットの点も問題となります。
POSI±IVE™ソフトウェアは、TOF MSスクリーニングデータ[5]の解析処理時間の短縮を目的として開発されました。このソフトウェアは、リスト化された化合物に対して、陽性(精密質量と保持時間が許容範囲内)、暫定的陽性(保持時間は許容範囲内だが、精密質量が許容範囲外)、または陰性かを判定し、検出化合物(陽性及び暫定的陽性)のみを自動的に定量解析を行います。化合物リストには、化合物の名称、化学式、保持時間情報を入力し、化合物数の制限はありません。

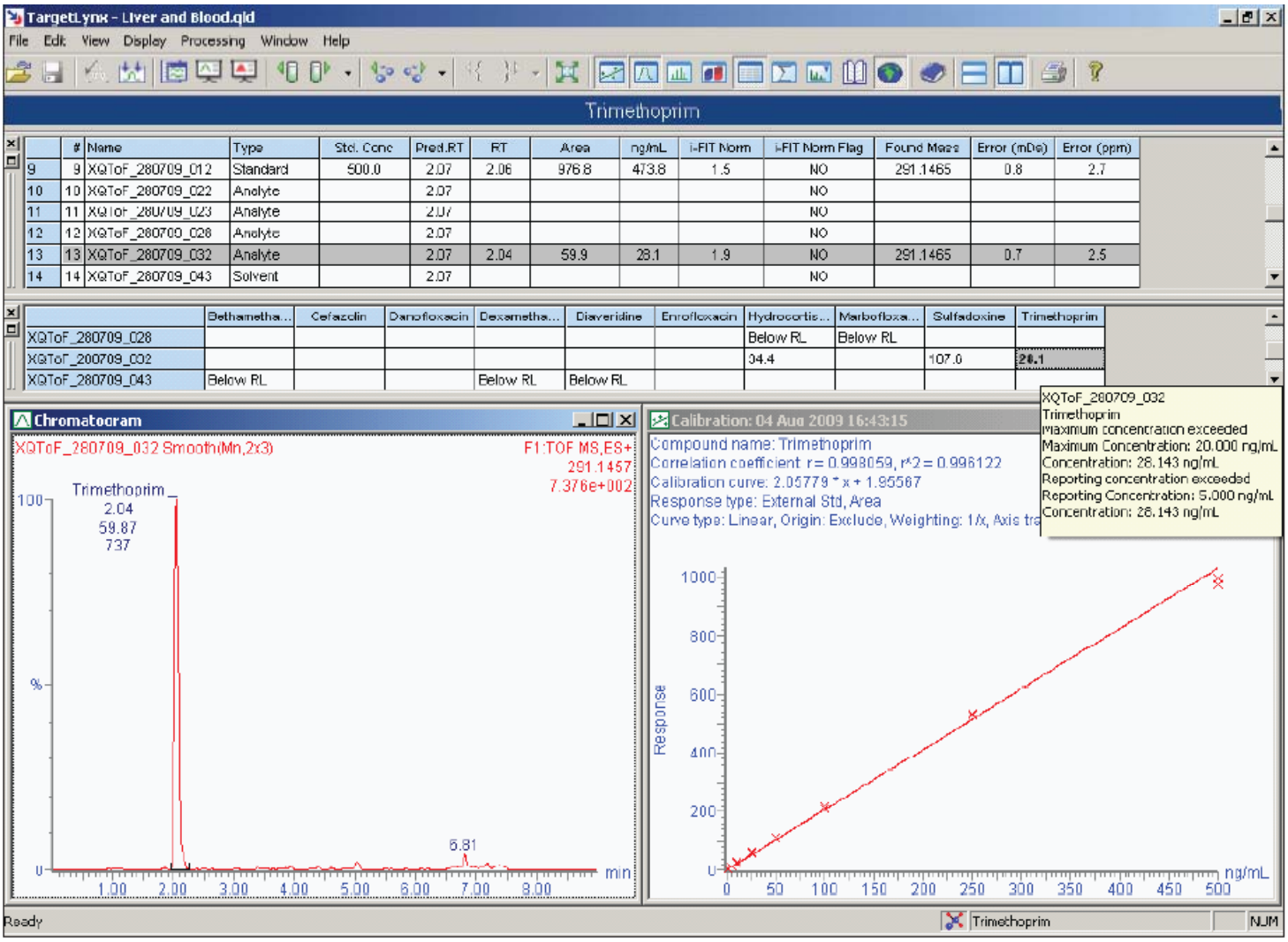

図7．牛の血液中のPOSI±IVE™ ソフトウェア及びXevo ™ QTof MSを用いたトリメトプリムのスクリーニングの結果

POSI±IVE™ソフトウェアはまず、化合物リストに記載された全ての化合物に対してマスクロマトグラムを抽出し検出/非検出を検証します。マスクロマトグラムでピークが検出されると、検出された化合物の陽性/暫定的陽性/陰性を精密質量と保持時間を元に判定を行います。陽性あるいは暫定的陽性と判定された検出成分は自動的に定量解析を行い、TargetLynx™ブラウザレポートに定量結果を表示します。ブラウザ上には定量結果だけではなく、アイソトープの一致度（iFIT™）も表示されます。図7に、牛の血液抽出物に関するPOSI±IVE™ ソフトウェア及びXevo™ QTof MSを用いたスクリーニングの結果を示します。ここでは、150種以上の動物用医薬品の迅速スクリーニング分析を行い、、3種（ヒドロコルチゾン、スフファドキシン、トリメトプリム）の動物用医薬品を検出しました。図には、血液抽出物中のトリメトプリムの陽性結果と定量分析結果を表示しました。

ヒドロコルチゾンは、当初の化合物リストには含まれていなかったため、 POSI±IVE™ソフトウェアを用いたスクリーニング解析では検出されませんでした。

POSI±IVE™のセミターゲットアプローチでは、スクリーニングを行う化合物リスト数の制限がなく、化合物を追加する場合でも標準品を用いてのメソッドを新たに作成する必要や、再度サンプルを分析する必要がありません。従って、今回の場合においてもすでに取り込まれたデータを新たにヒドロコルチゾンを化合物リストに加えて再解析を行う事により、ヒドロコルチゾンを検出し、その後定量結果を得る事ができました。

Quantify Sample Summary Report MassLynx 4.1 SCN 714

Dataset: C:\MassLynx Projects\1081.PRO\Liver and Blood.qld

Last Altered: Tuesday, August 04, 2009 16:43:15 GMT Standard Time
Printed: Thursday, August 06, 2009 12:42:15 GMT Standard Time

Method: C:\MassLynx Projects\1081.PRO\MethDB\PDQ Generated Method.mdb 04 Aug 2009 16:11:55
Calibration: 04 Aug 2009 16:43:15

Name: XQToF_280709_032, Date: 28-Jul-2009, Time: 19:40:55, ID: Blood 30338
Description: Cow Blood Extract 30338

	Name	Pred.RT	RT	Expected Mass	Found Mass	Error (mDa)	ng/mL	i-FIT	i-FIT Norm
1	Hydrocortisone	3.21	3.19	363.2171	363.2186	1.4	34.4	40.2	3.7
2	Sulfadoxine	2.74	2.72	311.0814	311.0800	1.4	187.6	200.8	4.2
3	Trimethoprim	2.07	2.04	291.1457	291.1465	0.7	28.1	41.5	1.9

図8. 牛の血液中のPOSI±IVE™ ソフトウェア及び Xevo™ QTof MSを用いたスクリーニング分析によって得られた3種の残留薬剤の定量及び定性レポート例

図8に牛の血液抽出物を分析した結果のレポートの一部を示します。ここでは150種以上の動物用医薬品のうち、保持時間、精密質量、iFITに基づいて陽性と判定された3種の定性及び定量結果をわかりやすく表示しています。

結論

■食物連鎖における残留薬剤のヒトの健康への影響が問題視されているため、畜水産物中の動物用医薬品分析が注目されています。

■ACQUITY UPLC®/Xevo™ QTof MSを用いたソリューションは、畜水産物中のの150種以上の残留動物用医薬品のスクリーニングに有効的な手法です。

■MS^{E}取り込み手法は、従来のデータに依存したアプローチの限界を克服し、検出された化合物の同定の正確性を向上させます。

■TOF MSデータの大量な情報を迅速に解析するために、データ処理ソフトウェアには高い要求が課せられます。つまり、 TOF MSの情報を有効的に活用し、結果の質を向上させるためには、マニュアル作業処理を減らし、反復作業の自動化が必須です。

■POSI±IVE™ソフトウェアは、TOF MSスクリーニングデータでボトルネックとなっていた解析を自動化させる事が可能です。つまり、陽性と暫定的陽性の検出化合物のみを自動的に定量し、レポートをします。スクリーニング分析及び解析の自動化はワークフローをシンプルにし、マニュアルによる誤操作の可能性も低減します。

参考文献

1. http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/index_en.htm
2. http://www.foodsafety.gov/%7Efsg/animal.html
3. http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist/index.html
4. D Ortelli, E Cognard, P Jan, and P Edder. J Chrom B. **877** (2009) 2363-2374.
5. POSI±IVE: Improving the Workflow for TOF Pesticide Screening. (2009) Waters Technical Note No. 720003053en.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001
東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル
TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011
大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F
TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡

Appendix 1

6a-methylprednisolone
Albendazole
Albendazole sulfone
Albendazole sulfoxide
Amoxicillin
Ampicillin
Azithromycin
Benzocaine
Bethamethasone
Brombuterol
Bromhexine
Carazolol
Carbadox
Carbenicillin
Cefaclor
Cefadroxil
Cefalexin
Cefalonium
Cefamandole
Cefazolin
Cefoperazone
Cefotaxime
Cefoxitin
Cefquinom
Cefsulodin
Ceftiofur
Ceftriaxone
Cefuroxime
Cephacetrile
Cephalothin
Cephapirin
Cephradin
Chlortetracycline
Cimbuterol
Cinoxacin
Ciprofloxacin
Clenbuterol
Clenproperol
Clopidol
Cloxacillin
Cyclobendazole
Danofloxacin
Dapsone
Demeclocyclin
Dexamethasone
Diaveridine
Dicloxacillin
Diethylcarbamazine
Difloxacin
Dimetridazole
Dimetridazole-hydroxy
Doxycyclin
Enoxacin
Enrofloxacin
Erythromycin
Febantel
Fenbendazole
Fenbendazole sulfone
Fleroxacin
Flubendazole
Flubendazole-amine
Flumequine
Flunixin
Hydrocortisone
Ipronidazole
Ipronidazole-hydroxy
Josamycin
Ketoprofen
Leucomycin A1
Levamisole
Lincomycin
Lomefloxacin
Marbofloxacin
Mebendazole
Mebendazole-5-hydroxy
Mebendazole-amine
Meloxicam
Metronidazole
Metronidazole-hydroxy
Minocyclin
Morantel
Nafcillin
Nalidixic acid
Naproxen
Natamycin
Norfloxacin
Novobiocin
Ofloxacin
Olaquindox
Oleandomycin phosphate
Oxacillin
Oxfendazole
Oxibendazole
Oxolinic acid
Oxytetracyclin
Pefloxacin
Penicillin G
Penicillin V
Praziquantel
Prednisolone
Procaïne
Promethazine
Pyramethamine
Pyrantel
Rifaximin
Ronidazole
Roxarsone
Roxithromycin
Salbutamol
Sarafloxacin
Spiramycin I
Sulfabenzamide
Sulfacetamide
Sulfachlorpyrazine
Sulfachlorpyridazine
Sulfadiazine
Sulfadimethoxine
Sulfadoxine
Sulfaethidol
Sulfaguanidine
Sulfamerazine
Sulfameter
Sulfamethazine
Sulfamethizole
Sulfamethoxazole
Sulfamethoxypyridazine
Sulfamonomethoxine
Sulfamoxole
Sulfanitran
Sulfapyridine
Sulfaquinoxaline
Sulfathiazole
Sulfatroxazole
Sulfisomidine
Sulfisoxazole
Ternidazole
Tetracyclin
Tetramisole
Thiabendazole
Thiabendazole-5-hydroxy
Tiamulin
Ticlopidine
Tilmicosin
Tolbutamide
Tolfenamic acid
Triclabendazole
Triclabendazole-sulfone
Triclabendazole-sulfoxide
Triflupromazine
Trimethoprim
Troleandomycine
Tulobuterol
Tylosin
Virginiamycin M1
Xylazine
Zeranol