[TECHNOLOGY BRIEF]

Oasis PRiME HLB カートリッジによる食肉抽出物の効果的なクリーンアップ

Michael S. Young and Kim Tran

目的

Oasis® PRiME HLB カートリッジによる UPLC®-MS 分析に先立つ効果的な食肉抽出物からの迅速クリーンアップの成果を示します。

背景

ウォーターズは動物用医薬品の LC-MS/MS 多成分スクリーニングに最適な前処理と分析方法を開発しました。典型的な食肉サンプル中の主要成分は水分（～ 70%）、タンパク質（15-25%）、中性脂質（5-25%）、リン脂質（1-3%）になります。食肉から分析種を溶媒抽出する段階で、沈殿と遠心分離によってタンパク質は除去されます。しかし、リン脂質を含む総脂質の多くは目的の残留動物用医薬品成分と共抽出されます。これまでの LC-MS 分析においてはこれらの共抽出成分が、分析カラムや他の UPLC システムの構成部品を汚し、質量分析計も汚染していました。従来、食肉抽出物の脱脂は面倒なヘキサンによる処理を行うか、C_{18} シリカなどの固相抽出で行われていました。これらのテクニックは中性脂質の除去に効果はありますが、どちらもリン脂質除去には十分な効果があるとは言えません。

中性脂質とリン脂質は装置やカラムのコンタミネーションを引き起こす可能性があります。Oasis PRiME HLB カートリッジは LC-MS 分析の前処理として食肉抽出物中の中性脂質やリン脂質を迅速に除去します。

ソリューション

Oasis PRiME HLB カートリッジによって、パススルー固相抽出（SPE）でクリーンアップが可能です。本手法は食肉抽出物中からの中性脂質とリン脂質両方の除去に非常に効果的です。同様に重要なこととして、Oasis PRiME HLB カートリッジによるパススルー SPE クリーンアップは動物用医薬品の回収率にも良好な結果を与えます。Oasis PRiME HLB カートリッジはヘキサン脱脂法または C_{18} シリカによるクリーンアップと回収率はほぼ同等ですが、より高いクリーンアップ効率を示します。

検証実験

抽出：サンプルとして一般的な豚肉（5 g、15% 脂質を含む）に主要な動物用医薬品を添加したものを用いました。ホモジナイズされた豚肉サンプルは 10 mL の抽出溶液（80:20　アセトニトリル /0.2% ギ酸水溶液）と混和し、30 秒間ボルテックスで強く撹拌、30 分間振とう後、12000 rpm で 5 分間遠心分離を行い動物用医薬品を抽出しました。

Oasis PRiME HLB カートリッジによるクリーンアップ：バキュームマニホールドに Oasis PRiME HLB カートリッジ（3 cc、60 mg）をセットします。このカートリッジはコンディショニングを必要としません。0.5 mL の抽出液遠心上清画分をカラムにロードし、素通り溶液を収集しました。得られた素通り画分は UPLC-MS/MS 分析のために 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液（pH4.5）で 3 倍に希釈してサンプルとしました。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

結果

今回検討したパススルークリーンアップ法では、動物用医薬品成分のほとんどにおいて回収率の低下は見られませんでした。絶対平均回収率（その殆どは初めの食肉からの溶媒抽出効率が寄与していると考えられます）は 80% 以上でしたが、フェニルブタゾンは 32% であったため除外しました。これらの回収率は、C_{18} シリカカラムによる結果とほぼ同等ですが、リン脂質除去は C_{18} シリカカラムでは十分とはいえません。UPLC-MS/MS の条件とクロマトグラムを図 1 に示しました。図 2 は、Oasis PRiME HLB カートリッジのリン脂質除去に対する有効性を示したものですが、重量測定法により Oasis PRiME HLB は 90% 以上の共抽出成分を除去する能力があることが確認されました。

UPLC条件

システム：	ACQUITY UPLC® I-Class
カラム：	ACQUITY UPLC CSH C_{18}、 2.1×100 mm、1.7 µm（製品番号186005297）
カラム温度：	30℃
サンプル温度：	10℃
検出：	Xevo® TQ-Sタンデム四重極型質量分析計
移動相A：	0.1%ギ酸水溶液
移動相B：	0.1%ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント：	15% B→40% B（0-2.5 min） →95% B（2.5-3.5 min）、ホールド（3/5-4.9 min） →15% B（4.9-5.0 min）、ホールド（5.0-7.0 min）
ニードル：	UPLCスタンダードニードル
ニードル弱洗浄液：	90%アセトニトリル水溶液
ニードル強洗浄液：	水/アセトニトリル/イソプロパノール 50/30/20
シール洗浄液：	10%メタノール水

化合物	プリカーサーイオン（*m/z*）	プロダクトイオン（*m/z*）	コーン電圧（V）	コリジョンエネルギー（eV）
Sulfamerazine	265.0	156.0	30	15
Enrofloxacin	360.2	316.1	50	25
Dexamethasone	393.2	355.3	30	15
Phenylbutazone	309.4	160.0	37	20
Penicillin	335.1	160.0	20	30
Chloramphenicol*	321.1	152.1	30	17
Oxytetracycline	461.2	426.2	30	21

*Chloramphenicol ESI-, others ESI+ ionization

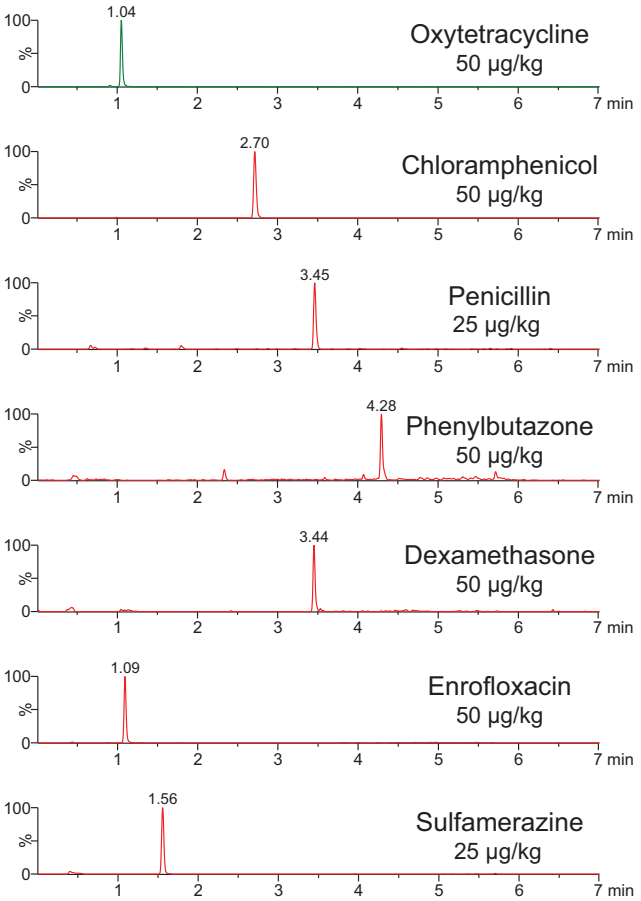

図 1：豚肉抽出物サンプルによる UPLC-MS/MS の条件と結果のクロマトグラム

結論

- Oasis PRiME HLB は使用前のコンディショニングや平衡化を必要とせず、シンプルなパススルー固相抽出により効率的なクリーンアップが可能でした。
- Oasis PRiME HLB カートリッジはアセトニトリルベースの豚肉抽出物中から 90% 以上の中性脂質と 90% 以上のリン脂質を除去可能でした。
- パススルーモードでご使用した場合、Oasis PRiME HLB カートリッジは分析種の回収率に影響なく、多くの中性脂質とリン脂質を除去可能でした。

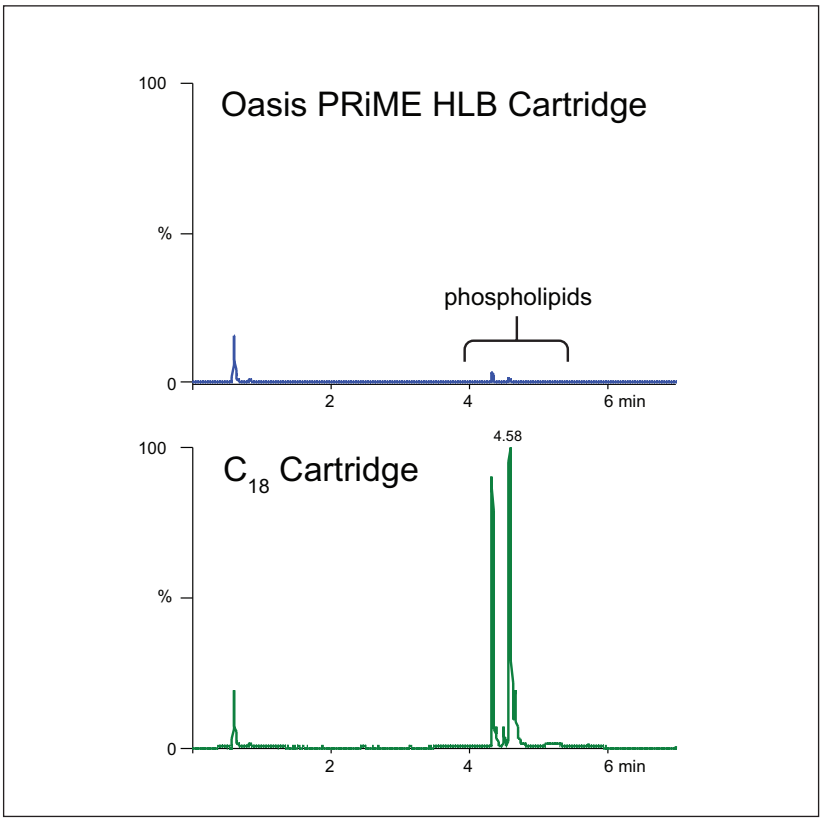

図 2、Oasis PRiME HLB クリーンアップ（上段）と C_{18} シリカクリーンアップ（下段）による肉抽出物中のリン脂質除去結果

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
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 新大阪トヨタビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

Waters、UPLC、Oasis、ACQUITY UPLC、Xevo および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。
©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年 7月 720005411JA PDF