Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

UPLC-MS/MSでの動物用医薬品一斉分析のための迅速、簡単、効果的なシーフード抽出物のクリーンアップ

Michael S Young and Kim Van Tran
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- 効果的で時間短縮のできるマルチクラス / 残留分析方法
- さまざまな分析種に対応するシンプル、迅速、効果的なサンプルクリーンアップ
- 高速で高感度な UPLC-MS/MS 分析

ウォーターズのソリューション

ACQUITY UPLC® I-Class システム

Xevo® TQ-S 質量分析計

SPE クリーンアップ用の
Oasis® PRiME HLB カートリッジ

キーワード

UPLC-MS/MS、Oasis PRiME HLB カートリッジ、動物用医薬品、エビ、サーモン

要約

公共の健康や安全を守るために、魚や貝など食用組織サンプル中の動物用医薬品の残留濃度を測定するための信頼性ある分析法が必要です。目的化合物は、高極性の水溶性化合物から非極性の脂溶性化合物まで幅広く、最大のスループットと最小のコストを実現するためには、ひとつの分析法で組織サンプル中の可能な限り幅広い残留動物用医薬品を測定することが要求されます。食用のシーフードと肉組織は、一般的に最大 20% の中性脂質と 3% のリン脂質を含有します。

はじめに

一般的な肉サンプルは、水分（最大 70%）、タンパク質（15 ～ 25%）、中性脂質（5 ～ 25%）、リン脂質（1 ～ 3%）で主に構成されています。サンプル調製において、タンパク質は有機溶媒による沈降と遠心分離により除去されます。しかしながら、多量の中性脂質とリン脂質が目的の動物用医薬品と共抽出されてしまいます。このように共抽出された中性脂質とリン脂質は、分析カラムや UPLC® システムの構成部品、質量分析計を汚染し、LC-MS 分析を妨害します。中性脂質は一般的に、煩雑なヘキサン脱脂ステップや C_{18} シリカゲルのような逆相固相を用いて組織抽出物から除去されます。前述した手法は中性脂質除去には効果的でも、リン脂質を除去することはできません。本研究では、シーフード組織サンプル中の広範囲な残留動物用医薬品をタンデム LC-MS 分析をするための、サンプル調製、クリーンアップ、分析プロトコールを開発しました。本クリーンアップ手法は、中性脂質とリン脂質、両方の除去に効果的でした。エビ（クルマエビ）とサーモンの 2 種類の組織を用いて本メソッドの適合性を試験しました。サンプルは、酸添加したアセトニトリル / 水溶液を用いてタンパク質沈殿を行い、目的の動物用医薬品を抽出しました。その後、新たに開発された Oasis PRiME HLB を用いてシンプルなクリーンアップを行いました。テトラサイクリン、フルオロキノロン、サルファ剤、マクロライド、βラクタム剤、NSAIDS、ステロイド、βアドレナリン作動薬を含む動物用医薬品の主要な群から代表的な化合物を選択し、抽出とクリーンアップの前に、シーフードサンプルにスパイクしました。

実験方法

UPLC 条件

システム：　ACQUITY UPLC I-Class

カラム：　ACQUITY UPLC CSH™ C_{18} カラム、1.7 µm、2.1×100 mm

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

注入量：　5 µL

注入モード：　パーシャルループ

カラム温度：　30℃

弱ニードル洗浄液：10:90 アセトニトリル : 水（600 µL）

強ニードル洗浄液：50:30:40 水 : アセトニトリル : イソプロパノール（200 µL）

シール洗浄液：　10:90 アセトニトリル : 水

グラジエント条件：

時間 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	Curve
0	0.4	85	15	Initial
2.5	0.4	60	40	6
3.9	0.4	5	95	6
4.9	0.4	5	95	6
5.0	0.4	85	15	6
7.0	0.4	85	15	6

UPLC 使用時の MS 分析条件

MS システム：　Xevo TQ-S　質量分析計

イオン化モード：　ESI ポジティブ（クロラムフェニコールのみ ESI ネガティブ）

イオン源温度：　150℃

脱溶媒温度：　500℃

脱溶媒ガス流量：　1000 L/hr

コーンガス流量：　30 L/hr

コリジョンガス流量：0.15 mL/min

データ管理：　MassLynx® v4.1 ソフトウェア

表 1 に本研究で用いた MRM トランジション及び装置パラメーターを示します。他に、各化合物の典型的なマトリックス検量線（エビマトリックス中の定量用トランジションを用いて計算しました；サーモンのデータは類似していました）及び保持時間（RT）を示します。

サンプル調製

1. 抽出及びタンパク質沈殿

ホモジナイズした 2.5 g のサンプル組織を 50 mL の遠沈管に入れます。標準物質および QC 試料は、目的化合物を適量スパイクします。10 mL の 0.2%（v/v）ギ酸を添加した 80% アセトニトリル水溶液を加えます。30 秒間ボルテックスし、30 分間振とう器で撹拌します。12000 rpm にて 5 分間遠心分離を行います。

注記：上記の抽出及びタンパク質沈殿処理は多くの目的化合物を良く回収しますが、同時に多くの中性脂質とリン脂質も抽出されます。

2. 固相抽出（SPE）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）を設置します。カートリッジのコンディショニングは必要なく、行いませんでした。1 ～ 2 psi で減圧吸引を行いました。約 0.5 mL の上清を Oasis PRiME HLB カートリッジにロードし、素通り画分を回収しました。0.3 mL の素通り画分の溶出液を分取し、10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液（pH 4.5）で 3 倍に希釈した後、UPLC-MS/MS 分析に供しました。

化合物	MRM	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)	スパイク濃度 (低、高) µg/kg	校正範囲 µg/kg	相関係数 (R^2)	RT
Amoxicillin	366.2>349.1	30	8	12.5, 50	6.25–100	0.9978	0.70
	366.2>114.0	30	20				
Carbadox	263.0>231.0	25	15	25, 100	12.5–200	0.9978	1.43
	263.0>145.0	25	20				
Ceftiofur	524.3>241.1	30	16	250, 1000	125–2000	0.9975	2.84
	524.3>285.0	30	16				
Chloramphenicol	321.0>152.1	30	17	25, 100	12.5–200	0.9943	1.64
	321.0>257.1	30	15				
Chlortetracycline	479.3>444.2	30	21	25, 100	12.5–200	0.9955	0.97
	479.3>462.2	30	18				
Ciprofloxacin	332.1>288.1	30	18	25, 100	12.5–200	0.9918	2.99
	332.1>231.1	30	40				
Cortisol	363.2>121.0	42	52	50, 200	25–400	0.9989	3.45
	363.2>91.03	30	22				
Dexamethasone	393.2>373.2	30	10	25, 100	12.5–200	0.9980	1.09
	393.2>355.3	30	15				
Enrofloxacin	360.4>245.0	50	25	50, 200	25–400	0.9961	2.26
	360.4>316.1	50	25				
Erythromycin	734.4>158.1	30	32	2.5, 10	1.25–20	0.9982	0.61
	734.4>576.5	30	20				
Lincomycin	407.2>126.1	36	34	12.5, 50	6.25–100	0.9931	1.03
	407.2>359.3	36	20				
Lomefoxacin	352.1>265.1	31	22	50, 200	25–400	0.9960	3.79
	352.1>308.1	31	16				
Oxacillin	402.2>160.0	30	12	25, 100	12.5–200	0.9974	1.06
	402.2>243.1	30	15				
Oxytetracycline	461.2>426.2	30	21	25, 100	12.5–200	0.9952	1.06
	461.2>443.1	30					
Penicillin	335.2>160.1	20	30	12.5, 50	6.25–100	0.9903	3.46
	335.2>176.1	20	30				
Phenylbutazone	309.4>160.0	37	20	25, 100	12.5–200	0.9915	4.29
	309.4>103.9	37	20				
Ractopamine	302.2>164.1	30	15	75, 300	37.5–600	0.9915	1.03
	302.2>107.0	30	27				
Salbutamol	240.2>148.1	30	20	25, 100	12.5–200	0.9907	0.61
	240.2>222.1	30	12				
Sulfamerazine	265.0>92.0	30	28	25, 100	12.5–200	0.9918	0.91
	265.0>156.0	30	15				
Sulfamethazine	279.1>186.0	30	16	25, 100	12.5–200	0.9971	1.56
	279.1>92.0	30	28				
Sulfanilamide	156.0>92.0	30	15	25, 100	12.5–200	0.9977	1.73
	156.0>65.0	30	25				
Tetracycline	445.3>154.0	30	26	25, 100	12.5–200	0.9970	1.15
	445.3>410.2	30	21				
Tylosin	916.5>174.1	57	40	5, 20	2.5–40	0.9938	2.48
	916.5>101.1	57	45				

表 1. 本研究で用いられたマトリックス検量線、MRM トランジション（前者が定量用トランジション）、装置パラメーター、保持時間 (RT)。

結果

表 2 は、動物用医薬品をスパイクした組織サンプルを繰り返し分析した結果を示します。マトリックス効果は、エビ及びサーモンのどちらでも平均約 40% でした。図 1 のクロマトグラムは、エビ抽出物から Oasis PRiME HLB カートリッジが 95% 以上のリン脂質を除去したことを示します。また、Oasis PRiME HLB カートリッジは、ヘキサンで抽出可能な中性脂質の 90% 以上を除去します [1]。

化合物	エビ				サーモン			
	Low level		High Level		Low Level		High Level	
	Recovery %	RSD(%) n=6	Recovery %	RSD(%) n=6	Recovery %	RSD(%) n=6	Recovery %	RSD(%) n=6
Amoxicillin	BLOQ	–	67	18	BLOQ	–	59	17
Carbadox	113	9	75	10	85	5	84	7
Ceftiofur	111	7	84	6	64	4	67	4
Chloramphenicol	106	7	77	12	79	7	69	10
Chlortetracyclin	79	7	63	17	67	5	65	7
Ciprofloxacin	190	14	103	15	109	9	95	4
Cortisol	99	8	80	6	82	4	82	4
Dexamethasone	112	9	79	7	89	8	79	6
Enrofloxacin	90	12	71	12	86	4	84	8
Erythromycin	110	7	83	8	85	9	86	7
Lincomycin	104	6	99	6	90	4	92	3
Lomefloxacin	126	11	90	11	97	4	92	5
Oxacillin	115	5	86	2	71	2	74	5
Oxytetracyline	125	11	92	7	83	5	76	4
Penicillin	112	10	86	6	70	10	71	6
Phenylbultazone	78	10	51	8	51	7	51	3
Ractopamine	102	9	87	8	87	3	90	4
Salbutamol	115	7	89	4	92	12	93	3
Suflanilamide	BLOQ	–	82	17	BLOQ	–	95	12
Sulfamerazine	107	7	91	7	83	3	77	12
Sulfamethazine	102	8	85	9	82	3	78	8
Tetracyline	106	7	77	12	79	7	69	10
Tylosin	116	10	98	4	76	7	87	3

表 2. 動物用医薬品をスパイクした組織サンプルを繰り返し分析した回収率の結果 (BLOQ- 定量限界以下)。

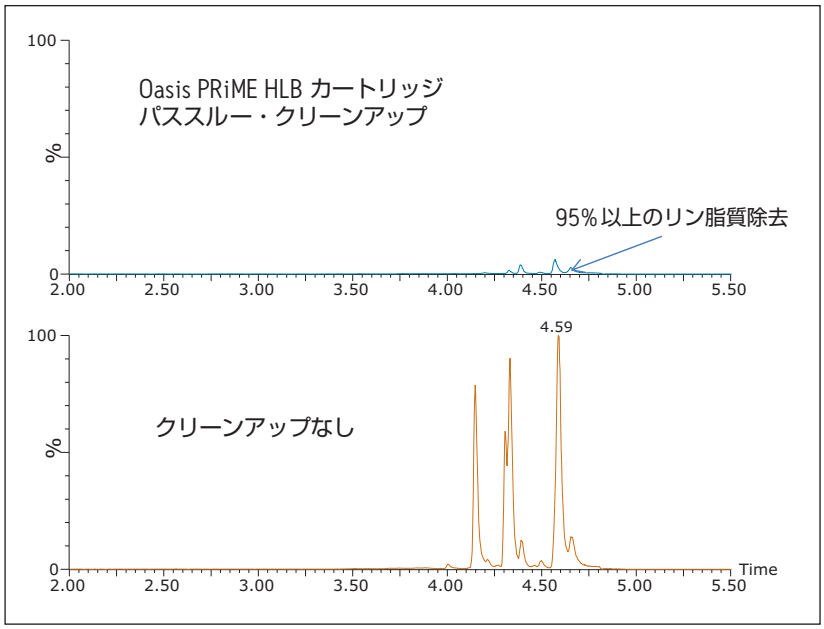

図 1. LC-MS/MS クロマトグラムより、エビ抽出物中の 95% 以上のリン脂質が除去されたことを示します。

考察

本研究で用いた手法は、Lehotay[2] によって発表されたメソッドと、Tran ら [3] によって改良されたメソッドを元に開発しました。本メソッドにおける全体的な回収率は一般的に 70% 以上でした。テトラサイクリンのような高極性化合物群においては、低い回収率を示しましたが、Oasis PRiME HLB カートリッジを用いたクリーンアップ法は、回収率の低下への寄与は最小限です。表 3 より、phenylbutazone 以外の化合物は、SPE クリーンアップの段階におけるエビでの回収率は 80% 以上、サーモンでは 90% 以上の回収率でした。

化合物	エビ %回収率 (%RSD) n=5	サーモン %回収率(%RSD) n=5
Amoxicillin	81 (23)	97 (37)
Carbadox	102 (3)	99 (3)
Ceftiofur	102 (2)	99 (1)
Chloramphenicol	84 (17)	87 (5)
Chlortetracyclin	98 (3)	95 (1)
Ciprofloxacin	93 (4)	103 (5)
Cortisol	89 (2)	91 (2)
Dexamethasone	84 (3)	90 (4)
Enrofloxacin	94 (1)	97 (3)
Erythromycin	83 (11)	104 (4)
Lincomycin	101 (4)	103 (2)
Lomefloxacin	98 (2)	93 (4)
Oxacillin	100 (1)	95 (2)
Oxytetracyline	104 (4)	101 (4)
Penicillin	98 (3)	97 (3)
Phenylbultazone	55 (4)	60 (1)
Ractopamine	98 (1)	97 (2)
Salbutamol	107 (2)	99 (6)
Suflanilamide	109 (9)	95 (10)
Sulfamerazine	93 (2)	93 (2)
Sulfamethazine	93 (2)	93 (2)
Tetracyline	99 (3)	98 (5)
Tylosin	84 (5)	103 (5)

表 3. SPE % 回収率（パススルー・クリーンアップ後のエビ及びサーモン抽出物のスパイク回収率）.

結論

- 簡単で効果的な抽出 / タンパク質沈殿法をエビ及びサーモン組織の分析に応用しました。
- Oasis PRiME HLB カートリッジを用いたワンステップのパススルー・クリーンアップ法は、初期の抽出物から 90% 以上の中性脂質及びリン脂質を除去します。
- 本サンプル前処理法では、抽出液に微粒子が含まれていないため、LC-MS 分析の前にろ過をする必要がありません。
- Oasis PRiME HLB カートリッジを用いたシンプルなワンステップ、パススルー・クリーンアップ法により、広範囲の動物用医薬品において高い一貫性のある回収率が得られました。

参考文献

1. M. Young and K. Tran, “Oasis PRiME HLB Cartridge for Effective Cleanup of Meat Extracts Prior to Multi-Residue Veterinary Drug UPLC-MS Analysis, Waters Application Brief, 2015.
2. S. Lehotay, “ High-Throughput Screening Analysis by UHPLC-MS/MS of >60 Veterinary Drugs in Animal Tissues”, 125th AOAC Annual Meeting, Presentation 2303, 21 September, 2011.
3. M. Young and K. Tran, “Optimized Extraction and Cleanup Protocols For LC-MS/MS Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Edible Muscle Tissues”, Waters Application Note 2011.

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、ACQUITY UPLC、UPLC、Oasis、MassLynx、Xevo および The Science of What’s Possible は Waters Corporation の登録商標です。
CSH は Waters Corporation の商標です。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10月 720005488JA PDF