

# UPLC-MS/MSによる鶏卵中残留動物用医薬品一斉分析のための 簡単、効果的なクリーンアップ

Sujie Xia,<sup>1</sup> Kim Van Tran,<sup>2</sup> Dimple Shah,<sup>2</sup> Jeremy C. Shia,<sup>2</sup> Michael S. Young,<sup>2</sup> and Jennifer Burgess<sup>2</sup>

- <sup>1</sup>Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China;
- <sup>2</sup> 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多成分一斉残留 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

ACQUITY UPLC カラム

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、卵

#### 要約

私達の健康や安全を守るために、食品中に残留する動物用医薬品の濃度を測定するための信頼性ある分析法が必要です。分析種は、高極性の水溶性化合物から非極性の脂溶性化合物まで多岐にわたります。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、単一の分析法で可能な限り幅広い動物用医薬品を測定できる食品残留分析法が要求されます。卵は、大量のタンパク質、脂質、レシチン(リン脂質)を含有します。これらの成分は、装置の性能を低下させるため、LC-MS分析の前に低減または除去する事が必要です。

## はじめに

養鶏場の産卵鶏の病気を防ぐため、動物用医薬品が使用されています。しかしながら、動物用医薬品は、卵に転移し蓄積されます。卵内の残留動物用医薬品の存在は、ヒト用の医薬品に使用されている抗生物質に対してアレルギー反応を引き起こしたり、病原体抵抗性を誘発する可能性があるため、消費者にとって高い健康リスクとなります¹。本研究では、多くが米国と中国において残留基準が設定されている、代表的な動物用医薬品16種類を12系統から選択しました¹.²。

卵中の動物用医薬品を一斉に定量するためのサンプル前処理は、非常に困難です。分析者は、物理化学的特性の異なる幅広い種類の医薬品群を回収しなければなりません。いくつかの分析種は、タンパク質やマトリックス成分と結合する可能性もあります。卵は、食品の中でも抜きん出てレシチン(リン脂質)を多く含有しており、かつ、多くの脂質も含んでいます。レシチンや脂質との共溶出は、LC-MS分析において妨害やイオンサプレッションに関与し、分析カラムやUPLCシステムを汚染し、質量分析計も汚染します。

本研究では、UPLC-MS/MSにより卵中の広範囲な動物用医薬品を分析することを目的として、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。卵サンプルは、タンパク質を沈殿させ、タンパク質に結合する成分を遊離し、目的の動物用医薬品を抽出するために、酸を添加したアセトニトリル水溶液で処理しました。その後、脂質とリン脂質を除去するために、新規固相抽出デバイスであるOasis PRiME HLBカートリッジを用いて簡単なパススルー法クリーンアップを行いました。

#### 標準品

本研究では、カテゴリーの異なる16種類の動物用医薬品を選定しました。表1に化学式、分子量、米国あるいは中国における残留基準値(MRL)を示しました。

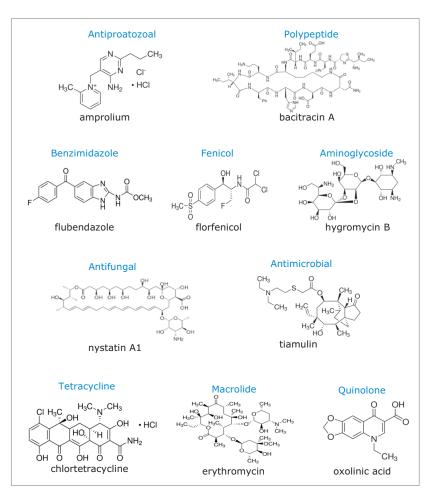


図1. 本研究での代表的な動物用医薬品の構造式

化合物	化学式	分子量	国	MRL (ng/g)
Amprolium	$C_{14}H_{19}CIN_4$	278.130	USA	4000
Bacitracin A	C <sub>66</sub> H <sub>103</sub> N <sub>17</sub> O <sub>16</sub> S	1421.749	USA/China	500
Hygromycin in B	$C_{20}H_{37}N_3O_{13}$	527.233	USA/China	No Residue Allowed
Nystatin A1	C <sub>47</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>17</sub>	925.503	USA	No Residue Allowed
Colistin B	$C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$	1154.750	China	300
Florfenicol	$C_{12}H_{14}CI_2FNO_4S$	357.000	China	No Residue Allowed
Flubendazole	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	313.086	China	400
Oxolinic Acid	$C_{13}H_{11}NO_{5}$	261.063	China	50
Tiamulin	$C_{28}H_{47}NO_4S$	493.323	China	1000
Chlortetracycline	$C_{22}H_{23}CIN_2O_8$	478.114	USA/China	400/200
Erythromycin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	733.461	USA/China	25/150
Lincomycin	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	406.214	China	50
Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.148	China	200
Penicillin G	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334.099	USA	No Residue Allowed
Tetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.153	China	200
Tylosin	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	915.519	USA/China	200

表 1. 本研究で用いた動物用医薬品 (バシトラシン、コリスチン、ナイスタチンは 2 種類以上の混合物であるため、主成分のみ分析のために選択しました)

## 実験方法

# UPLC条件

システム: ACQUITY UPLC I-Class

カラム: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> カラム

1.7 μm、2.1 × 100 mm (製品番号 186003555)

カラム温度: 30℃

注入量:

流速: 0.4 mL/min

移動相A: 0.1% ギ酸水溶液

10 μL

移動相B: 0.1% ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント条件:

初期組成85%A:15%B。

2.5分で40%Bまでのリニアグラジエント、1.4分で95%Bまでのリニアグラジエント、

2.3分間ホールド後、初期組成へ戻し、

2分間平衡化。

		MRMトランジッション1			MRMトランジッション2		
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 電圧 (eV)	プロダクト イオン (m/z)	コーン 電圧 (V)	コリジョン 電圧 (eV)
Amprolium	243.26	94.06	20	14	150.17	20	12
Bacitracin A	712.22	199.10	68	40	110.10	68	70
Hygromycin B	528.49	352.20	48	22	177.14	48	32
Nystatin A1	926.82	297.24	22	28	107.13	48	60
Colistin B	578.66	101.07	64	28	86.06	64	40
Florfenicol	356.03	335.96	52	10	184.94	52	22
Flubendazole	314.25	282.19	90	18	123.08	90	36
Oxolinic add	262.20	244.20	20	12	160.17	50	32
Tiamulin	494.45	119.10	40	42	192.17	40	20
Chlortetracycline	479.27	444.19	12	18	154.06	12	26
Erythromycin	734.72	158.08	48	26	576.52	48	18
Lincomycin	407.20	126.10	40	34	359.30	40	20
Oxytetracycline	461.36	426.22	20	18	201.07	64	36
Penicillin G	335.27	176.05	14	20	159.99	14	16
Tetracycline	445.30	410.20	40	21	154.00	40	26
Tylosin	916.88	174.13	80	36	101.10	45	45

表 2. 動物用医薬品 16 種の MRM トランジッションパラメーター

# UPLC使用時のMS分析条件

MSシステム: Xevo TQ-Sタンデム四重極型

質量分析計

イオン化モード: ESIポジティブ

(フロルフェニコールのみ

ESIネガティブ)

キャピラリー電圧: 3.0 kV

(ネガティブモードでは2.50 kV)

イオン源温度: 150℃

脱溶媒温度: 600℃

コーンガス流量: 150 L/hr 脱溶媒ガス流量: 1000 L/hr

コリジョンガス流量: 0.15 mL/min

化合物	保持時間 (min)	LOD (ng/g)	Linear range (ng/g)	R²
2 Amprolium	0.61	0.5	80-40,000	0.998
9 Bacitracin A	2.52	1	10-5,000	0.992
1 Hygromycin B	0.48	4	4-1,000	0.990
15 Nystatin A1	3.30	10	40-1,000	0.992
4 Colistin B	1.73	30	90-600	0.990
10 Florfenicol	2.69	4	4-1,000	0.991
14 Flubendazole	3.29	0.5	8-240	0.993
11 Oxolinic acid	2.83	1	1-500	0.993
16 Tiamulin	3.88	0.5	20-1,000	0.990
8 Chlortetracycline	2.49	0.5	4-2,000	0.995
12 Erythromycin	2.95	0.5	0.5-250	0.995
3 Lincomycin	1.59	0.5	1-500	0.996
5 Oxytetracycline	1.89	0.5	4-2,000	0.995
6 Penicillin G	1.91	1	2-1,000	0.991
7 Tetracycline	2.04	0.5	4-2,000	0.994
13 Tylosin	3.06	0.5	20-800	0.991

表 3. UPLC-MS 分析における保持時間と検量線データ

# サンプル調製

抽出:ホモジナイズした2gの鶏卵を50mLの遠沈管に入れました。回収率測定用のサンプルは、標準品を添加した後、8mL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した。30秒間ボルテックスした後、30分間振とう器で撹拌して、4500 rpmにて10分間遠心分離を行いました。固相抽出クリーンアップのために、上清を分取しました。

パススルー固相抽出(SPE) クリーンアップ: 事前に洗浄した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 (製品番号 186008056) を設置しました。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。 $1\sim2$  psi で減圧吸引を行い、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。0.2 mLの素通り画分を分取し、10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 4.5) で 0.6 mL に希釈した後、UPLC-MS/MS分析に供しました。図 2 は典型的なマトリックス添加標準品のクロマトグラムを示します。

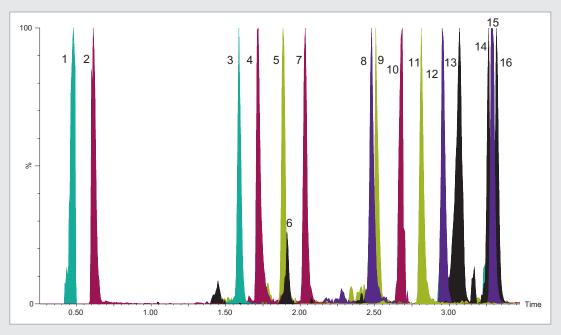


図 2.16 種の動物用医薬品の MRM クロマトグラム (MRL 濃度でのマトリックス添加標準品)

## 結果および考察

#### Oasis PRiME HLBカートリッジでのパススルー法によるクリーンアップ

Oasis PRiME HLBは、卵マトリックスから目的化合物の回収とリン脂質の除去を目的として評価しました。本法における全体的な回収率は  $50 \sim 95\%$  の範囲を示しました。しかしながら、Oasis PRiME HLBカートリッジによる回収率低下への寄与は最小限であると考えられます。図3に示す通り、SPE 特製工程における全分析種の回収率は 80% 以上であり、多くの分析種の回収率は 90% 以上でした。

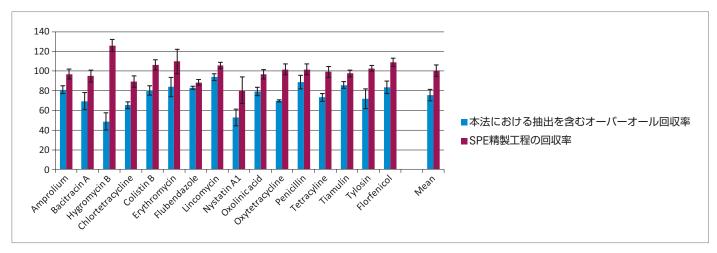


図 3. Oasis PRiME HLB カートリッジを用いた対象動物用医薬品の回収率 (MRL 濃度)

卵は多量の脂質を含み、食物由来としては最大レベルのレシチン(リン脂質)を含有しています。鶏卵の脂質含有量は11% (重量%)であり(殻を含む)、リン脂質の含有量は0.35%です $^4$ 。初期のサンプル調製の抽出段階においては、目的の薬物と共に脂質やリン脂質のような妨害成分も共に抽出されます。Oasis PRiME HLBカートリッジを用いたパススルー法によるクリーンアップで卵抽出物中の84%以上の脂質が除去されました。また、このパススルー法は、リン脂質の除去にも非常に効果的でした。図4はOasis PRiME HLBカートリッジを用いたパススルー法によるクリーンアップで卵抽出物中のリン脂質が95%以上除去されたことを示します。

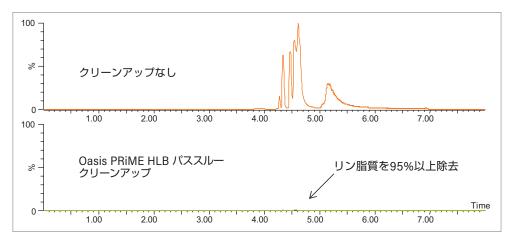


図 4. Oasis PRiME HLB カートリッジによる卵抽出物中リン脂質の効果的な除去

## 本法の回収率および精度

回収率試験は、3種類の濃度(0.4 MRL、1 MRL、2 MRL)を用い、各濃度において6回測定しました。マトリックス添加標準検量線を用いました。図5.に結果を示します。ナイスタチンとハイグロマイシン以外の多くの分析種(>70%)において回収率は70%以上でした。ハイグロマイシンの0.4 MRLにおけるデータ(RSD=34%)以外は、全ての分析種において許容できる再現性(RSD<20%)が得られました。

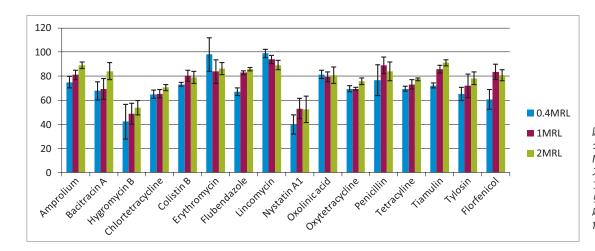


図 5. 回収率のデータ、ブランク卵 サンプルに 0.4 MRL、1 MRL、2 MRL 濃度をそれぞれスパイク(ハイグロマイシン B、フロルフェニコール、ペニシリン G、ナイスタチン A1 は対応する MRL がないため、40、100、200 ppb 濃度をスパイク)。

### 結論

- 鶏卵中の多系統の動物用医薬品を一斉定量する分析メソッドが開発されました。
- Oasis PRiME HLBカートリッジを用いた簡単なパススルー法によるクリーン アップで卵抽出物からリン脂質の95%以上を除去できました。
- Oasis PRiME HLBカートリッジを用いた前処理手法により、効果的なクリーンアップができ、卵中の対象動物医薬品に対して良好な回収率を示しました。
- Xevo TQ-S質量分析計とACQUITY UPLC I-Classシステムの組み合わせは、 本研究の動物用医薬品分析にて高感度を示しました。

# 参考文献

- Antonia Garrido Frenich, et.al. Analytica Chimica Acta 661 (2010) 150–160.
- 2. The Ministry of Agriculture Bulletin of PRC235, 2002.
- 3. https://www.globalmrl.com/
- 4. John L. Weirauch and Young-Sun-Son. JAOCS 60 (1983) 1971–1978.



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、Xevo、UPLC、Oasis 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。