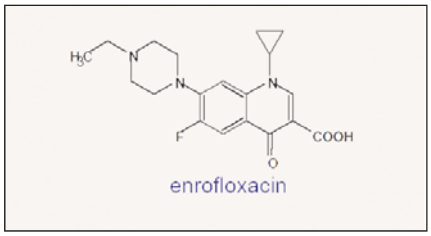
固相抽出（SPE）及びLC/MS/MSを用いたウシ腎臓中のニューキノロン類分析法の開発



ニューキノロン類の構造特性

◆酸性・塩基性官能基両方をあわせもつ
　酸性官能基のpKaはおよそ5
　塩基性官能基のpKaは8-9
◆イオン交換担体を用いて抽出可能
　pH6以下で陽イオン交換
　pH6以上で陰イオン交換

概要

ウシ腎臓中ニューキノロン類のLC/MS/MS定量分析法を開発しました。分析対象としたのはciprolfoxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, enoflaxacin, flumequine, norflaxacin, ofloxacin, lomeflaxacin, danofloxacinの9種です。腎臓サンプル2gからリン酸バッファーを用いて抽出し、ミックスモード陰イオン交換固相カートリッジ（Oasis MAX）でクリーンアップと濃縮を行いました。 NFPAをイオンペア試薬として用いたHPLC条件で良い分離が得られ、正イオンモードの大気圧化学イオン化（APCI）-LC/MS/MSで定量分析を行いました。

ニューキノロン類は合成抗生物質で、グラム陽性菌、グラム陰性菌に対して高い抗菌作用を有しています。これらの抗生物質は1962年にヒト用医薬品として開発され、1995年にこれらのうち数種が北米で動物薬として認可されました。しかしながら近年人体への影響が懸念される報告があり、そのためFDAは食品原料を産出する動物へのニューキノロン類の使用を禁止しました。

このアプリケーションノートはウシ腎臓中のニューキノロン類の効果的な抽出・クリーンアップ法を紹介しています。法規制に対応するため、このメソッドはLC/MS/MSを用いた高感度・高選択性検出分析法のために最適化されています。

メソッド

HPLC分析条件
【LC/MS/MS分析用】
カラム　:Atlantis™ dC_{18} 4.6×150 mm, 5 μm
移動相　:A:0.2%NFPA*
　　B:メタノール
グラジエント :40%B to 80%B in 10 min
流速　　:0.8 mL/min
カラム温度　:30℃
注入量　　:30-80 uL
【LC-UV/蛍光/MS分析用】
カラム　:Atlantis™ dC_{18} 4.6×150 mm, 5 μm
移動相　:0.2%NFPA*/メタノール/アセトニトリル = 75/3/22
流速　　:1.2 mL/min
カラム温度:30℃

* NFPA (nonafluoropentanoic acid)
CF_3-CF_2-CF_2-CF_2-COOH

MS/MS分析条件
【装置】
ウォーターズMicromass Quattro *micro* API LC/MS/MS使用

Compound	MW	MRM	Cone (V)	Collsion Energy (eV)
flumequin	261	262→244	50	20
enoxacin	320	321→303	50	20
norfloxacin	319	320→302	50	23
Sarafloxacin	385	386→368	50	25
ofloxacin	361	362→344	50	20
Enrofloxacin	359	360→342	50	20
danofloxacin	357	358→340	50	25
lomefloxacin	351	352→334	50	20
ciprofloxacin	331	332→214	50	20

ESIとAPCIを比べた場合標準サンプルではESIの方が感度は高いようです。しかしながらマトリックス及びイオンペア試薬によるイオン化効率への影響を考えAPCIを採用しました。APCIの場合それらのイオン化効率に与える影響はわずか20%以内でした。

キーワード:
ニューキノロン
LC/MS/MS
Quattro *micro* API

MICROMASS MS TECHNOLOGIES

Figure 1

9種ニューキノロン類の
アイソクラティックLC/UV
クロマトグラム

HPLC分離　アイソクラティック条件（UV、蛍光検出に有用）

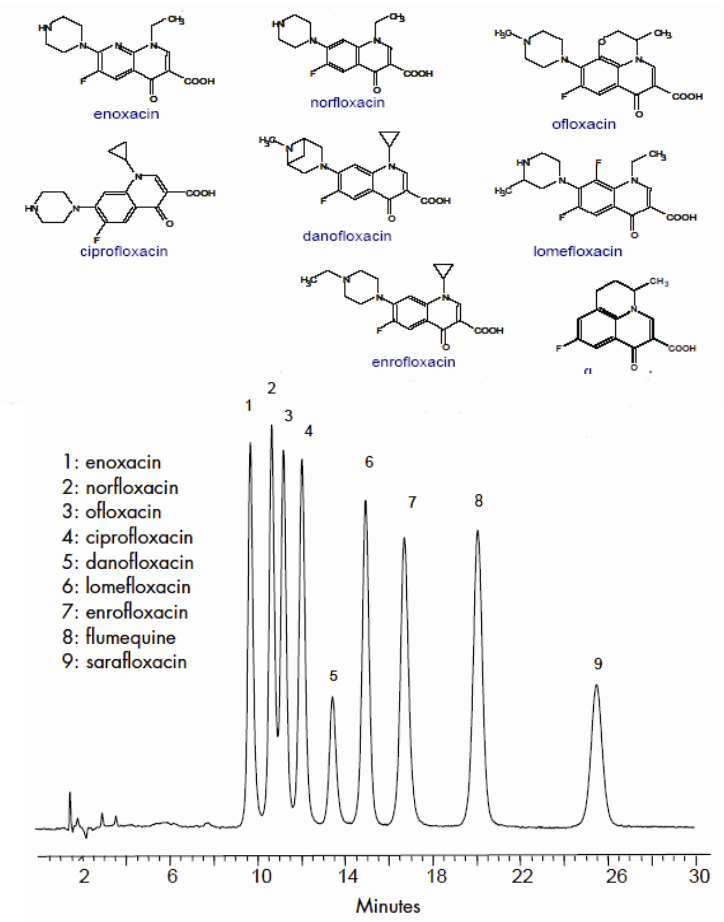


Figure 2

9種ニューキノロン類のグ
ラジエントLC/MS/MS
クロマトグラム

HPLC分離　グラジエント条件（LC/MS/MSに有用）

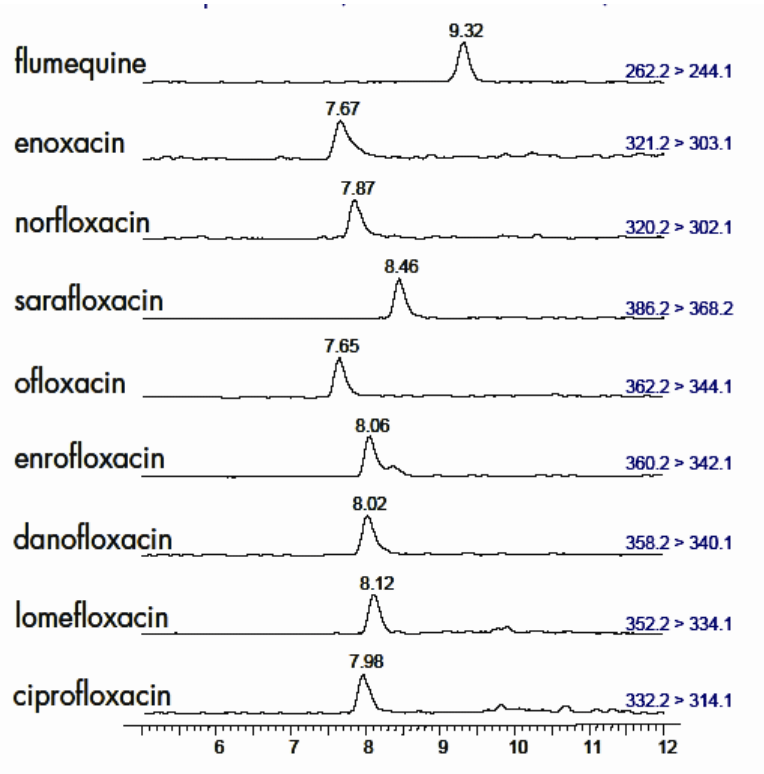
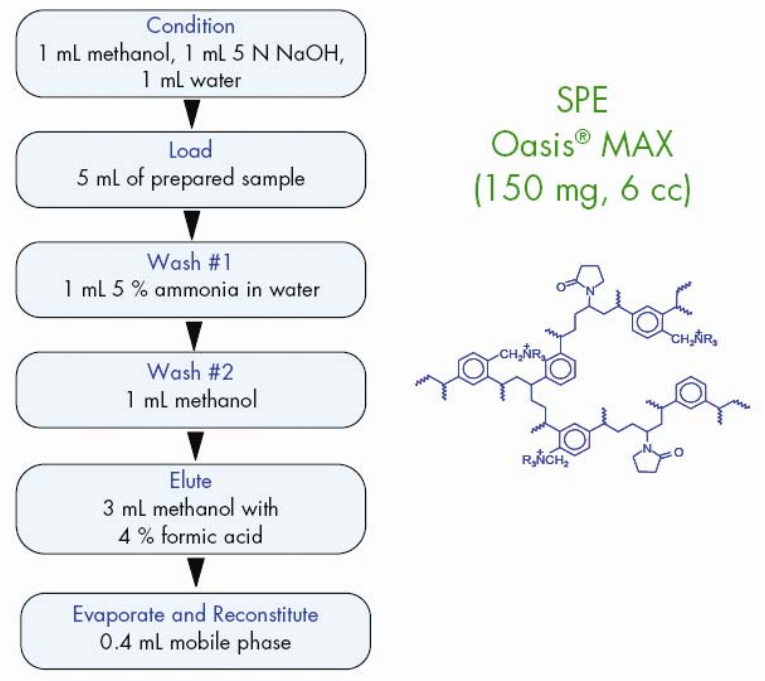


Figure 3

ウシ腎臓からの抽出：
腎臓 2 gを50mMリン酸バッファー（pH7.4）30 mL とホモジナイズし、10000 rmp で10分間遠心分離

前処理条件



【SPE前の粗抽出法に関する考察】

ニューキノロン類抗生物質は酸性、塩基性、中性のどのpHでも組織切片からの粗抽出が可能です。

- ◆酸性条件ではエタノールによる抽出が適していました。本条件では水系バッファーによる抽出はエタノール抽出に比べて妨害成分が多く抽出されます。
- ◆塩基性条件ではエタノール、水系バッファー両方の使用が困難でした。共に、マトリクスからの妨害成分が多く抽出されます。
- ◆中性条件では、水系バッファーの使用が適していました。本条件ではエタノールによる抽出は水系バッファー抽出に比べて妨害成分が多く抽出されます。

上記より、中性条件で水系バッファーを用いる粗抽出方法を選択しました。

結果

9種ニューキノロン類のLC/MS/MS分析における回収率を示します。

Analyte	5 ppb			10 ppb			25 ppb			50 ppb			75 ppb			100 ppb		
	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)	Recovery (%)	STD Dev	RSD (%)
Cipro	81.3	11.5	14.1	70.2	8.0	11.3	62.7	3.6	5.7	64.0	5.0	7.8	72.0	5.4	7.4	80.5	3.8	4.7
Lome	68.3	17.3	25.4	76.9	5.0	6.5	81.6	6.0	7.3	70.9	6.4	9.0	84.3	5.3	6.3	87.8	4.7	5.3
Dano	86.2	16.8	16.5	75.5	5.8	7.7	75.9	4.2	5.5	66.6	5.0	7.5	76.4	7.0	9.1	77.5	5.6	7.3
Enro	79.2	11.6	14.6	73.3	15.6	21.3	82.4	3.0	3.6	70.6	5.4	7.7	85.6	5.7	6.7	108.4	6.1	5.6
Oflo	77.0	7.6	9.8	85.3	5.3	6.2	77.1	5.8	7.5	72.7	5.1	7.0	81.5	5.7	6.9	91.9	7.1	7.7
Flum	70.9	12.0	17.0	75.0	10.1	13.5	75.2	7.2	9.6	65.9	7.4	11.2	67.4	4.9	7.3	68.0	4.6	6.8
Sara	87.0	11.6	13.3	71.9	7.8	10.9	91.1	4.0	4.3	69.6	4.7	6.7	82.8	4.3	5.2	82.0	4.5	5.5
Nor	70.1	12.0	17.1	70.2	5.8	8.2	61.8	4.6	7.5	62.9	4.9	7.9	67.2	5.6	8.3	75.7	4.5	5.9
Eno	63.9	7.6	12.0	69.4	7.7	11.0	59.3	6.0	10.1	63.0	6.2	9.9	67.5	6.9	10.3	78.7	6.0	7.6

【Oasis MAX 150 mg 6 cc SPE Cartridge】
陰イオン性化合物はイオン交換モードで保持されます。陽イオン性及び中性化合物は逆相モードで保持されます。

【Oasis MCX 30 mg 1 cc SPE Cartridge】
本条件では陽イオン性化合物だけが保持され、陰イオン性化合物と中性化合物は素通りします。

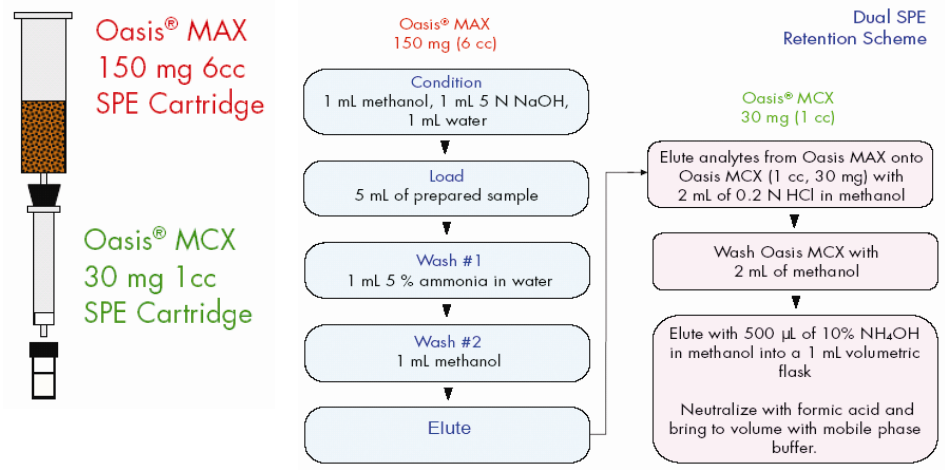
デュアルカートリッジを用いたSPEメソッドを用いることで、妨害物質がより効果的に取り除かれ、その結果、より低い検出限界を得ることが出来ます。
次にその例を示します。

【上段のクロマトグラム】
デュアルSPEクリーンアップを行ったサンプルのアイソクラティックLC/蛍光検出で得たものです。

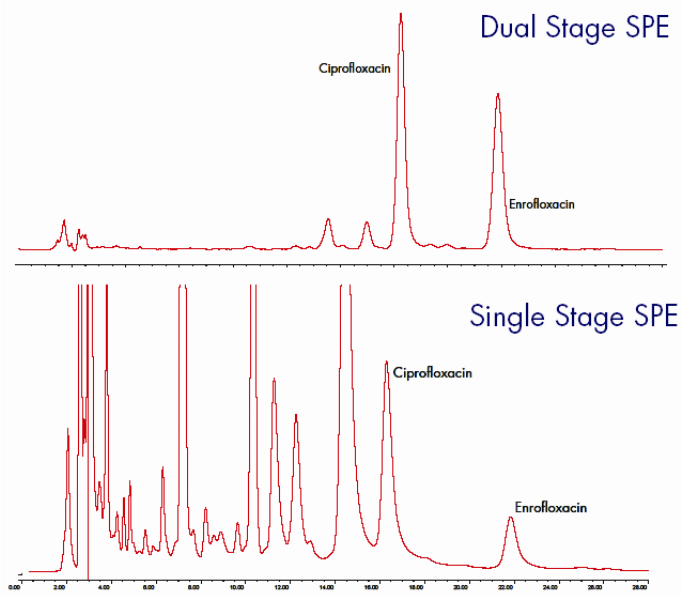
【下段のクロマトグラム】
シングルSPEクリーンアアップを行ったサンプルのデータで、よりマトリックスからの妨害成分の影響を受けていることが分かります。

<<サンプル>>
ウシ腎臓に100ppb添加したものです。

今後の検討事項　HPLC/蛍光検出のためのSPEメソッド最適化



デュアルSPEクリーンアップを行ったサンプルのアイソクラティックLC/蛍光検出



結論

◆ウシ腎臓サンプル中ニューキノロン類のためのSPEメソッド
- 高い回収率と再現性
- 10 μg/kg 以下の定量下限
- 迅速で簡単

◆HPLC条件
- NFPAを用いたアイソクラティック条件で、LC/UV、蛍光に必要なベースライン分離を実現
- NFPAを用いたグラジエント条件で、LC/MS/MSにおける分析対象物とマトリックス由来の妨害物質の効果的な分離を実現

◆検出法を問わずに用いることが可能
- MS/MSによる確実な成分同定が可能
- 蛍光検出のための分析法として理想的

Kevin M.Jenkins,Michael S.Young
Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, MA 01757

Waters
日本ウォーターズ株式会社
本社: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