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

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

○松本真理子 [1], Michael S. Young[2], Kim Van Tran[2]
[1]Nihon Waters K.K.,Tokyo, Japan, [2]Waters Corporation, Milford MA, USA

はじめに

公共の健康や安全を守るために、魚や貝などの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ある。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幅広い。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る。

一般的な肉およびシーフードサンプルは、水分（最大70%）、タンパク質（15～25%）、中性脂質（5～25%）、リン脂質（レシチン、1～3%）で主に構成されている。サンプル調製において、タンパク質は有機溶媒による沈澱と遠心分離により除去される。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う。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、および質量分析計を汚染し、LC-MS分析を妨害する。

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る。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難しい。

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あった。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った（図1参照）。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、非ステロイド性抗炎症薬（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（図2参照）、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た。

Oasis PRiME HLB（特許申請中）逆相固相充填剤
- タンパク質、脂質、リン脂質（レシチン）を含むサンプルに最適

より簡単に：
確立されたプロトコール～**コンディショニングおよび平衡化の必要なし**

より速く：
目詰まりが少なく、より速く前処理を終了可能

より綺麗に：
マトリックス効果の低減、リン脂質および脂質の除去、LC カラムおよび装置の汚染防止

図 1.Oasis PRiME HLB カートリッジ/プレートのプロトコール

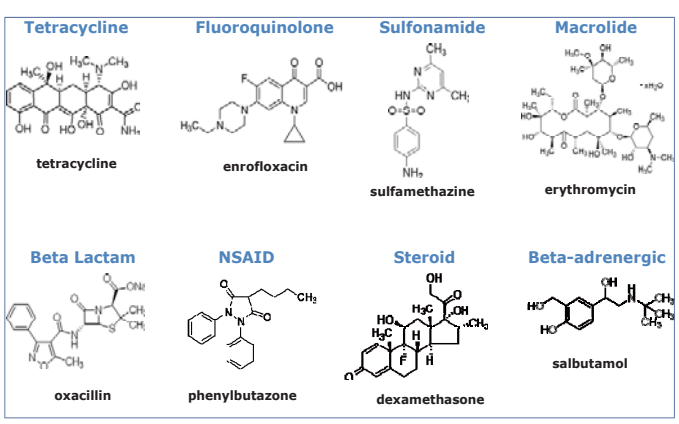

図 2.本研究で用いた多様な動物用医薬品

実験

サンプル前処理

抽出及びタンパク質沈殿
ホモジナイズした 2.5 g のサンプル組織に 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て 30 分間振とう

→ 多くの分析種に対して良い回収率を示す タンパク質、糖、塩を除去する

↓

遠心分離
0.5 mL の上清を取り、12000 rpm にて 5 分間遠心分離

↓

パススルー法 固相抽出（SPE）クリーンアップ
（コンディショニング・平衡化不要）
Oasis PRiME HLB (3cc, 60 mg)

→ 脂質、リン脂質、非極性色素の除去

↓

UPLC-MS/MS 分析
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

UPLC-MS/MS分析

UPLC-MS/MS条件

システム: ACQUITY UPLC® I-Class
カラム: ACQUITY UPLC CSH™ C_{18} カラム、1.7 µm、2.1x100 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： パーシャルループ注入
カラム温度: 30℃
弱ニードル洗浄液: 10:90 アセトニトリル:水
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
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	カーブ
Initial	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す。

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)	検量線範囲 (µg/kg)	直線性 R^2	保持時間 (min)
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	26	25, 100	12.5-200	0.9952	1.06
	461.2>443.1	30	21				
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データ、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

図3は、動物用医薬品をスパイクしたサーモンサンプルを繰り返し分析した抽出と精製を含めたメソッド全体の回収率を示している（エビの回収率は類似した結果であった）。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%であった。図4のクロマトグラムは、サーモン抽出物から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%以上を除去した。

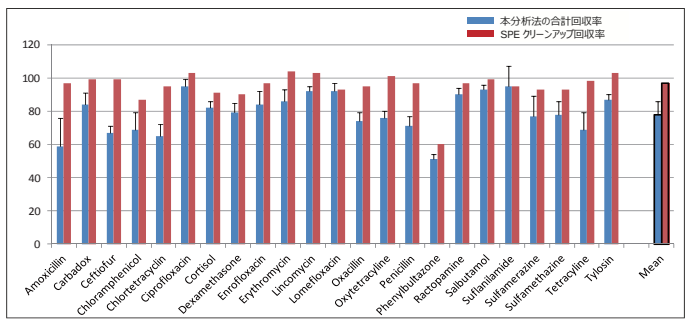

図 3. サーモン組織からの動物用医薬品の回収率結果（%RSD はエラーバーで示す）。

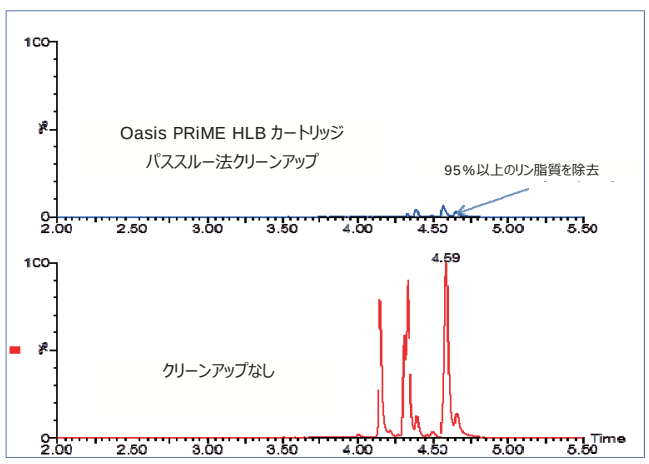

図4.LC-MS/MSクロマトグラムより、サーモン抽出物中の95%以上のリン脂質が除去されたことを示す。

考察

本研究で用いられた組織抽出のプロトコールは一般的に効率的であるが、本研究は多成分群の一斉分析であり、幾つかの成分はメソッド全体の回収率が70%以下であった（図3の青いバー参照）。しかしながら、Oasis PRiME HLBカートリッジの回収率低下への寄与は最小限であった（図3の赤いバー参照）。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%以上の回収率であった。

結論

- 簡単で効果的な抽出法およびタンパク質沈殿法をエビ及びサーモン組織の分析に適用した。
- Oasis PRiME HLBカートリッジを用いた2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た。
- 本サンプル前処理法では抽出液から微粒子が除去されたため、LC-MS分析の前にろ過をする必要がなかった。
- Oasis PRiME HLBカートリッジを用いたシンプルな2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た。

TO DOWNLOAD A COPY OF THIS POSTER VISIT WWW.WATERS.COM/POSTERS

©2015 Waters Corporation MKT16002