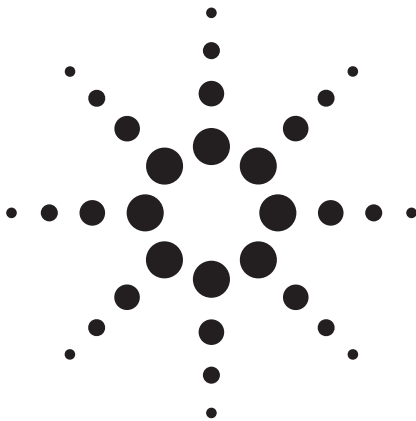


大気圧化学イオン化法LC/MSによる 豚肉中のサルファ剤の分析 アプリケーション



食品

著者

Ralph Hindle
Access Analytical Labs
#3, 2616 - 16 Street N.E.
Calgary, AB.T2E 7J8
Canada

Agilent 連絡担当:
Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

このアプリケーションノートでは、豚肉中のスルホンアミド系抗菌剤を分析するための簡便な手法を紹介します。サンプル抽出は酸を添加したメタノールで行い、遠心分離を経て抽出物の一部を水で希釈した。そして、この希釈液を直接、大気圧化学イオン化を用いたLCMSにて分析した。全成分は5分以内に溶出した。内部標準を用いて、50 ppb (ng/g)の添加試験にて7種のスルホンアミドの回収率は84%-118%の範囲であった。検出限界は10-25 ppbであることが分かった。固相抽出によって精製したサンプルと簡便な抽出法の比較、およびスクリーニング（最大感度）と同定（フラグメントイオン生成）のための質量選択型検出器の設定の比較も行われた。Agilentの四重極質量選択型検出器の高い感度により、ハイスループットな分析が要求されるラボでも希釈クリーンアップのテクニックが使用可能となった。

はじめに

肉、食品用の臓物、飼料および動物の排泄物などは、食品に混入する恐れのある抗菌剤、成長ホルモンおよびその他の化学物質を含んでいる可能性がある。これらの化合物は、動物の健康維持、成長促進およびストレス低減のために使用されている。これらの物質の人体への暴露は、汚染された肉を食べたり、流出した排泄物や堆肥およびそれらの浸出物に接したりすることで起こる。微生物の抗菌薬耐性株は低レベルの暴露からでも生ずることから、専門家はペニシリンやサルファ剤などの抗生物質が効果的な治療薬剤として選択できなくなることを危惧している。

スルホンアミドとは、ヒトにも動物にも処方される抗菌薬である。カナダにおけるスルホンアミドの最大残留基準値 (MRL) は、食肉では100 ppb (ng/g)、牛乳では10 ppbであるが、EUではどちらの食品にも100 ppbというMRLを設定している。カナダ食品検査庁が肉組織中のスルホンアミド検出に用いる手法では、酢酸エチル中での抽出、グリシンバッファーでの分配、さらにpH調整後、塩化メチレンへの逆抽出 [1] を行うように定めている。抽出物は、濃縮および還元を経て、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分離され、誘導体化を経て、デンストメトリーによって定量される。Alberta Agriculture は大気圧化学イオン化 (APCI) を用いた液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) によって、最終分析の定性的および定量的精度を向上させた [2]。Alberta 法では抽出に数多くの工程を必要とするが、食品内の残留物をモニタリングするラボには、より迅速なメソッドが有用であると思われる。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートで取り上げる手法の目的は、規制値の半分かそれ以下のサルファ剤で信頼性の高い定量方法を確立することであり、そしてサンプル調製を最小限にして、注入サイクル時間を10分以内に収めることである。最大感度は通常、できるだけフラグメントイオンの生成を抑えて、疑分子イオン [M+H]⁺ を生成させることで得られる。またタンデム四重極型検出器 (LCMSMS) は操作が複雑であることから、シングル四重極型装置でもフラグメント情報が得られることが望ましい。この目的のためには、衝突誘起解離 (CID) によって各成分の特徴的なフラグメントイオンを生成させれば達成できるものと思われる。

実験

薬品および用具

すべてのスルホンアミド標準は Sigma Aldrich Canada から購入し、最低純度は99%とした。サルファダイアジンおよびサルファキノキサリンのナトリウム塩以外の原液はアセトンで 2 mg/mL になるように調製した。またこれらの成分が完全に溶解するよう、3 mL の 0.2N NaOH を加えた。異なる濃度の標準液は、スパイク用あるいは脱イオン化水で希釈して定量用に使用するために調製した。

内部標準 (IS) : スルファクロロピリダジン (SCPD) を脱イオン化水で 2 mg/mL に調整。

HPLCグレードのメタノールおよびアセトニトリルは Caledon Labs (Georgetown, Ontario) から購入した。

ギ酸 (min. 98%) は、EM Science で購入した。

100 μ L の98% ギ酸を100-mL メタノールに加え、酸性化したメタノールを調製した。

Ultra-Turrax T8 homogenizer、50-mL ポリプロピレン遠心分離チューブ、および 13-mm ポリフッ化ビニリデン (PVDF) シリンジフィルタ (0.2 μ m) は VWR Scientific で購入した。

Oasis HLB (3 cc, 60 mg) 固相抽出 (SPE) カートリッジは Waters で購入した。

サンプル調製

1. サンプルである豚赤身肉 3 g は50-mL ポリプロピレン遠心分離チューブ内で直接計量した。
2. サンプルをUltra-Turrax ホモジナイザにて、10 mL 酸を添加したメタノールで 3 分間ホモジナイズした。
3. 次いで 10 分間の遠心分離を行い、上澄みをきれいな試験管に移した。
4. 次にサンプルを 10mL の酸を添加したメタノールでもう一度抽出し、遠心分離を再度行った。
5. 上澄み液を合わせ、1 mL のIS (2 mg)を合わせた抽出液に加える。
6. 抽出液を脱イオン化水で4倍に希釈し (250 μ L 抽出液 + 750 μ L 脱イオン化水)、0.2 μ m PVDF フィルタでオートサンプリングバイアルでフィルタリングし、これをLC/MSで直接分析する。

合わせた抽出液に正確な量のISを加えることで、抽出物の最終的な体積を測定する必要が無く、ChemStation による内標計算で、分析物と内部標準物質の相対量が判明する。これにより、サンプル中の濃縮または希釈による影響が補正される。

希釈のみの抽出物と比較するため、サンプル抽出物はさらに固相抽出カートリッジを通過させた。60-mg Oasis HLBカートリッジは、1.5 mL の酸添加したメタノールで予備洗浄し、次いで 1.5 mL 脱イオン化水を流した。1 mLの抽出物は10 mLの脱イオン化水で希釈し、カートリッジを通して溶離させ、溶離液は廃棄した。次いでサルファ剤を1.5 mLの酸添加したメタノールで溶出させた。溶離液を窒素雰囲気下で気化させた。乾固させたサンプルは 1 mL の 25% メタノールで再溶解し、ろ過したのち、LC/MSで分析した。

さらに別の比較をおこなうために、固相抽出なしに、1 mL メタノールをほぼ乾燥するまで気化させ、1 mL の 25% メタノール溶液で再溶解した試料を調製した。この操作によりサンプル抽出物の溶媒組成が HPLC 分析に適したものとなるが、希釈のステップを行わないため成分の検出限界 (DL) が低下すると考えられる。

LC/MS 条件

今回使用したLC/MS システムは、Agilent Technologies 1100 Series の溶媒デガッサ、バイナリポンプ、オートサンプラ、カラムオープン、ダイオードアレイ検出器、および四重極質量選択型検出器 (MSD) から構成される (表1)。

成分の定性および確認

通常、対象化合物のモニタリング法の目的は、夾雑成分から目的成分を分離して、且つ最大の感度を得ることである。質量分析 (MS) を利用すると、最大感度は選択イオン検出モードにおいて、特定のモニターイオンの検出 (例えば エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、

APCIでのプロトン付加イオン $[M+H]^+$) の生成によって達成される。しかし、たとえ結果が陽性となったとしても、疑わしいピークが本当に検出対象のものなのか、あるいは共溶出した別の成分が同じイオンを発生しただけなのかを確認する必要がある。確認のための方法は数多く存在する。例えば、サンプルを別の溶媒系で再抽出する、サンプルをさらにクリーンアップして最終的な濃度を向上させて、手がかりとなる別のイオンを検出するかスキャンモードでの分析をおこなう、誘導體化の後、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) で分析をおこなう、あるいはタンデム四重極LC/MS/MSにて抽出物を再分析する、などが挙げられる。これらのテクニックはすべて有用であるが、難点としては時間とコストが増してしまうことで、特にLC/MS/MSに関してはその傾向が顕著である。

表 1. LC/MSD 条件表 1. LC/MSD 条件

HPLC	
カラム	Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm (p/n 993967-906)
溶媒 A	0.1% ギ酸水溶液
溶媒 B	0.1% ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント	$t_0 = 20\% B$ $t_1 = 20\% B$ $t_3 = 90\% B$ $t_{6.5} = 90\% B$ Post time = 1.5 min
流量	1.0 mL/min
注入量	50 μL
カラム温度	30 °C
MSD	
イオンソース	APCI (陽イオンモード)
Dwell time	各 63 ミリ秒で 8 イオン
フラグメンタ	70 V
乾燥ガス	6.0 mL/min
ネブライザ圧	60 psi
乾燥ガス温度	350 °C
気化器温度	400 °C
キャピラリー電圧	3000 V
コロナ電流	4 μA

Agilent 1100 MSD は一度の分析で最大 4 つの MS シグナルを取り込むことができる。各シグナルは、複数の選択イオン (SIM: 選択イオンモニタリング)、あるいはスキャンの組み合わせが可能である。例えば、親イオンの生成を最大化するために低いフラグメンタ電圧で設定されたシグナル 1 は、ターゲットリスト中のそれぞれの $[M+H]^+$ イオンを含むが、高いフラグメンタ電圧で設定されたシグナル 2 は確認用のフラグメントイオンが得られる。高濃度での検出が予想される分析対象では、シグナル1は定量用のSIMモードで得られ、シグナル2は定性用のスキャンモードで得られる。図 1 は前者の例を示し、フラグメンタ電圧はシグナル 1 (MSD1) で 70 V に、シグナル 2 (MSD2) で 200 V に設定されている。

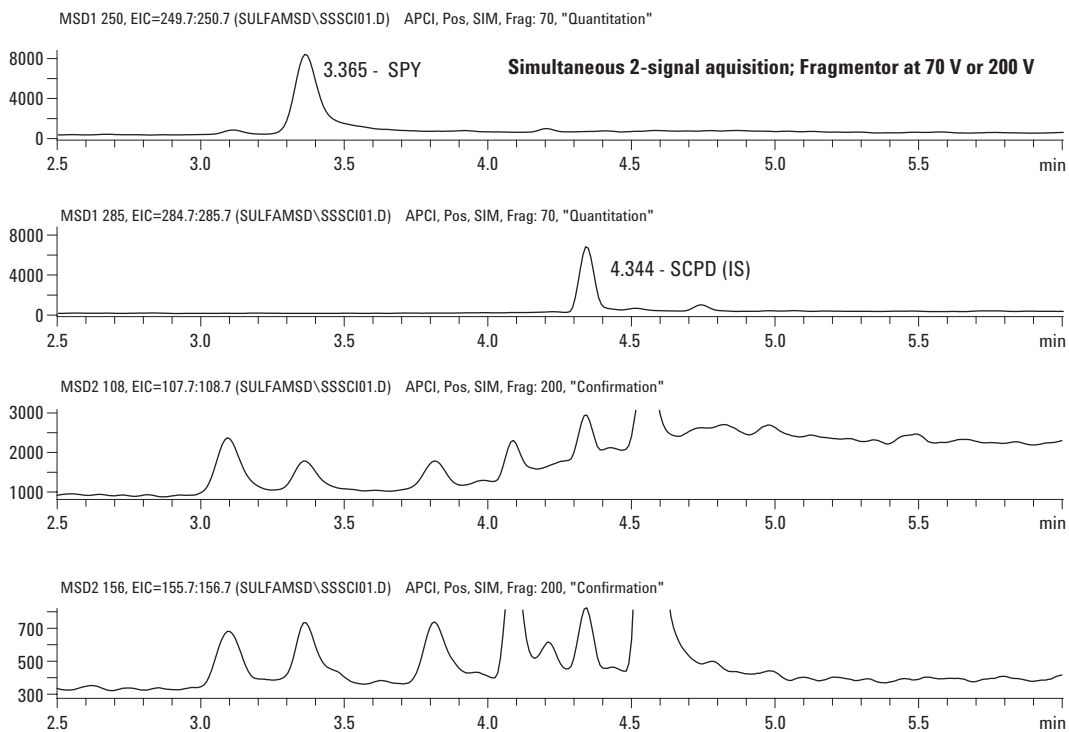


図 1. Dual MSD で得られたシグナル (質量 108 および 156 はスルホンアミドに特有のフラグメント)

表 2 はフラグメンタ電圧をさまざまに変化させたときのスルホンアミドのマススペクトルである。質量108と156はスルホンアミド特有のフラグメント（それぞれ $\text{H}_2\text{N}^+=[\text{C}_6\text{H}_4]=\text{O}$ と $\text{H}_2\text{N}^+=[\text{C}_6\text{H}_4]=\text{SO}_2$ ）であり、プロトン化分子イオンと共に得られた場合に化合物の同定に非常に適したイオンとなる。

表 2. さまざまなフラグメンタ電圧を用いた場合の、スルホンアミドの APCI スペクトル

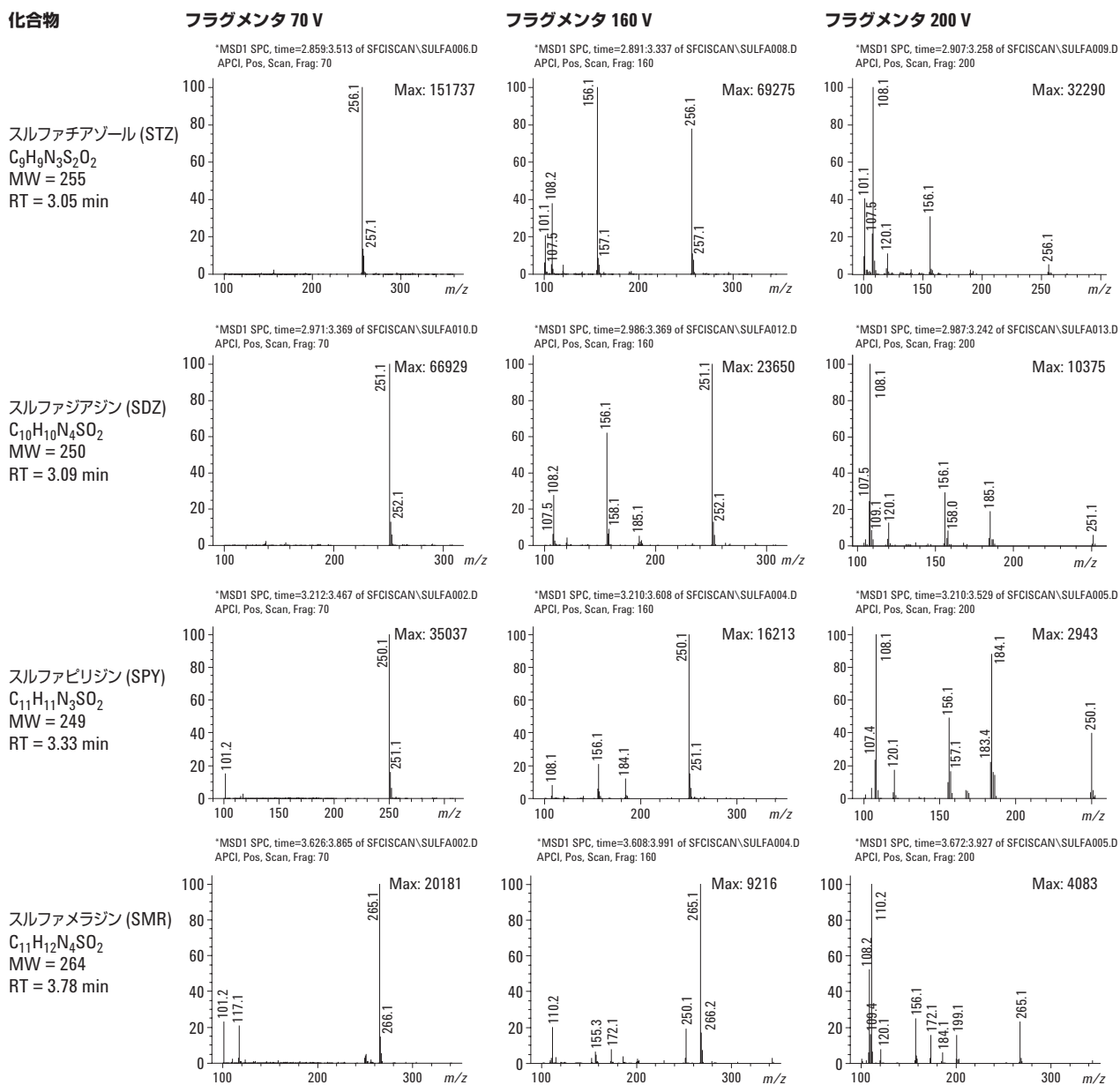
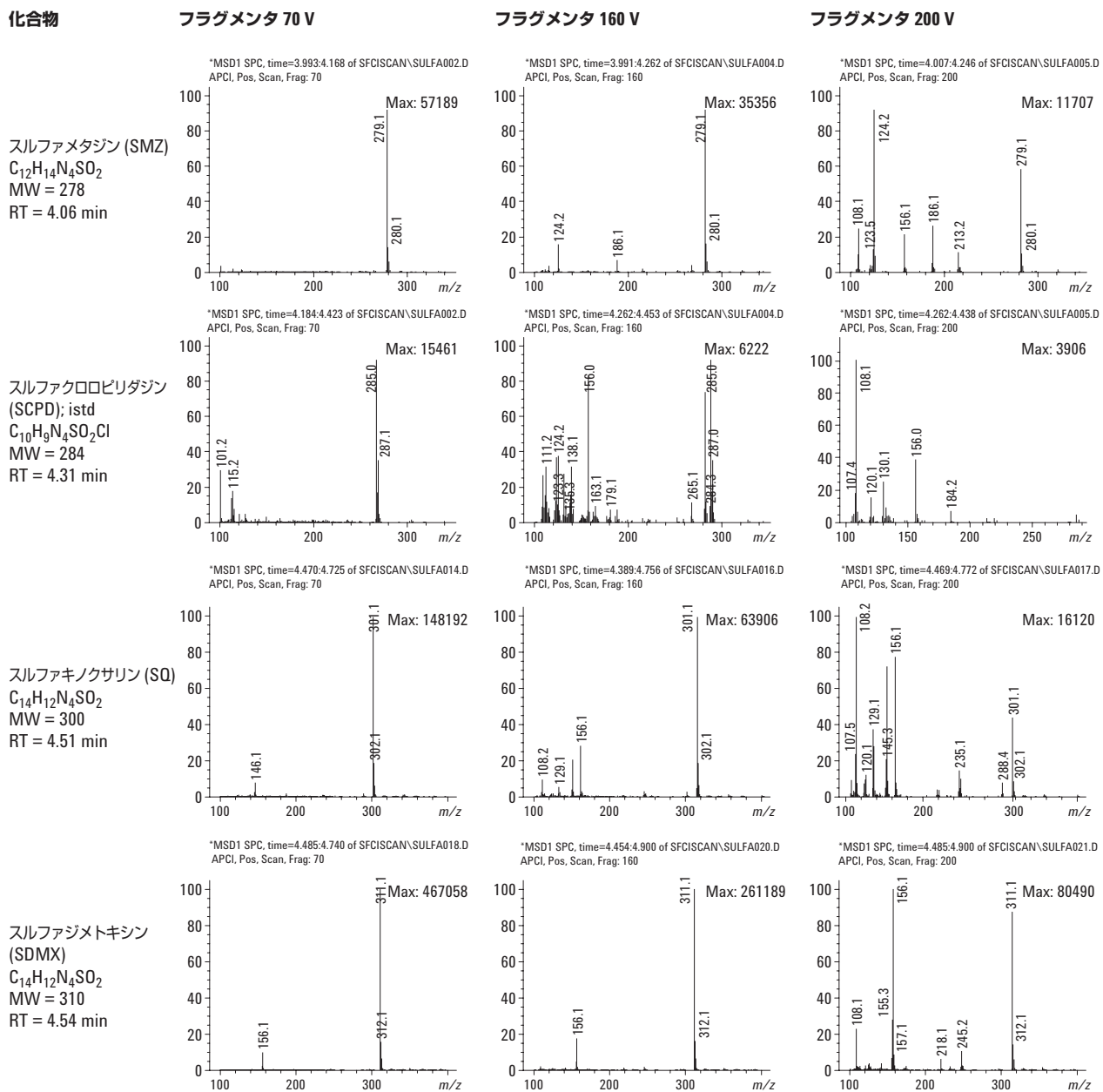


表2. さまざまなフラグメンタ電圧を用いた場合の、スルホンアミドの APCI スペクトル (続き)



クロマトグラフィー

質量分析による検出をおこなう場合には、ターゲットとなる成分をかならずしも完全に分離する必要は無いが、一般的なイオンが存在する場合には、分離が必須となる。例えば、SPY のプロトン化分子イオンは $m/z=250$ に得られる。天然に存在する同位体 C^{13} により、イオン 251 は親イオン 250 と同時に存在する。SPY の SDZ ($m/z = 251$) からの分離は、クロマトグラフ条件を最適化するときには重要であり、図 2 に示したように分離が達成されている。これによりクロマトグラフィーに要する時間は多少長くなるが、データ解析中のピークの積分はより整合的となり、クロマトグラムの解釈が容易となり、標準溶液中の SPY 共溶出に

よって SDZ 量が実際より低く計算されることが無くなる。

最近発行されたアプリケーションでは、2-ポジション 10-ポートのバルブを用いて、並列に接続した 2 本の分析カラムと 2 台のバイナリポンプを用い、1.1 分の注入サイクル時間で 4 種のスルホンアミドを分析している [3]。たいていのラボはそこまでのサンプル処理量を必要としないため、本アプリケーションノートで解説する手法では、既存のテクニックを用い、システムの導入にさらなる機器コストがかからないようにデザインされている。条件は、比較的短い 6 分という時間内に満足に行く分離結果が得られるように設定した（サイクル時間の合計は 10 分）。

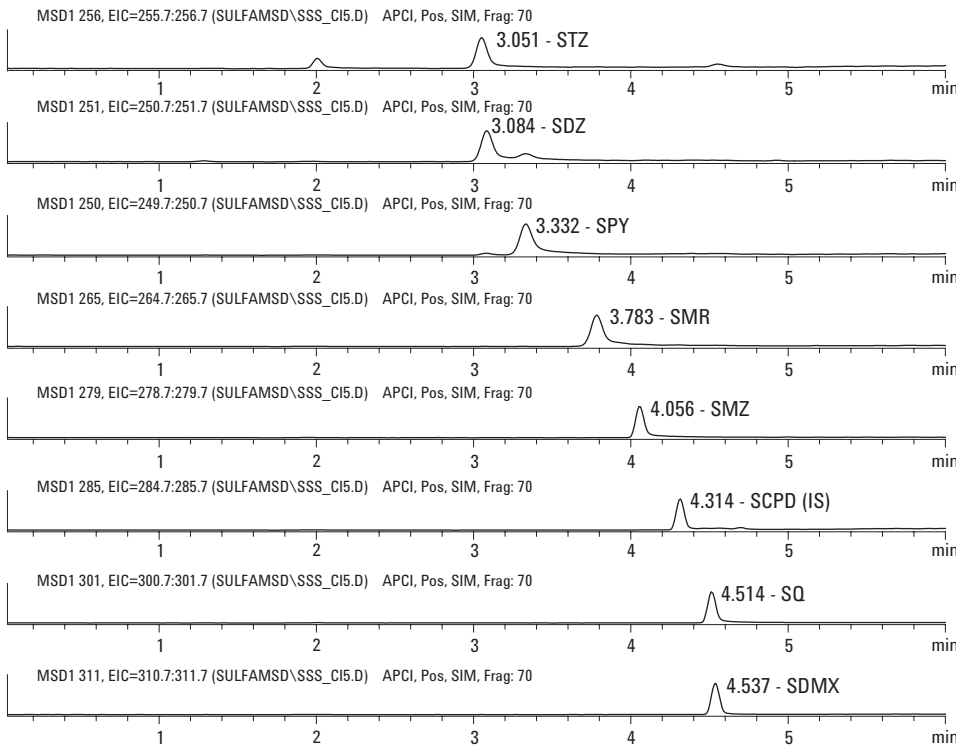


図 2. スルホンアミド標準ミックス、各 500 pg (SIM)

サンプル クリーンアップ

図3の全イオンクロマトグラム (TIC) から、サンプルよりかなりのマトリクスに起因するバックグラウンドが生じていることが分かる。このため簡単な溶媒置換がおこなわれた。1 mLの抽出液を窒素雰囲気下で気化し、25%メタノール溶液で再溶解した。溶媒置換のみ行った場合の問題の1つに、マトリクス物質のかなりの量が HPLC カラムに注入されることがある。ピークの形状はオーバーロードによって負の影響を受け、結果としてカラム性能が低下する。このマトリクスはすべて MSD にも導入される。この場合、MSD のクリーニングやメンテナンスを頻繁に必要とするため、生産性はさらに低下する。

ハイスループットの手法を開発するためには、必要となるステップの数を最小限に抑える必要がある。Agilent の液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MSD) は、サンプル クリーンアップの手法として単なる水で希釈した抽出物サンプルを分析できる高い感度を持つ。これによってコストのかかる SPE カートリッジを使用する必要がなくなり、サンプル調製に必要な時間も短縮できる。サンプル調製ステップが最低限で済めば、各ステップでのロスも減るために、回収率も向上する。

図3の3番目のクロマトグラムは、SPE クリーンアップが共抽出された物質のほとんどを除去し、最終的な抽出物の濃度を高め、検出限界を極限まで低くすることを示している。さらには、積分やデータ解釈がおこないやすいシンプルなクロマトグラムが得られる。

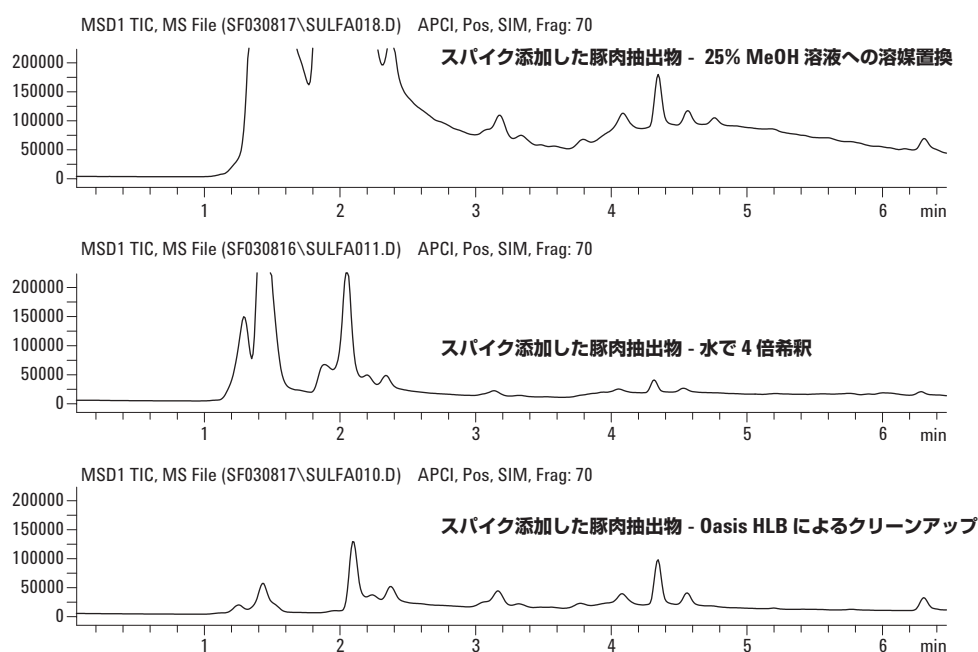


図3. クリーンアップ手法の TIC による比較

しかしながら、本手法の目的が多数のサンプルをスクリーニングして MRL 汚染の可能性のあるものを発見することならば、希釈の方法はなるべく簡便であることが望ましい。単純な希釈は、必要な検出限界の要件を満たす為の十分に濃縮された状態を保ちつつ、優れたクロマトグラフィー分離の為の十分なクリーンアップを与えるであろう。図 3 の 2 番目のクロマトグラムは、非常に改善されたベースラインを示している。図 4 から 6 は SIM モードですべてのターゲットイオンを含む、同じサンプルの分析を示している。

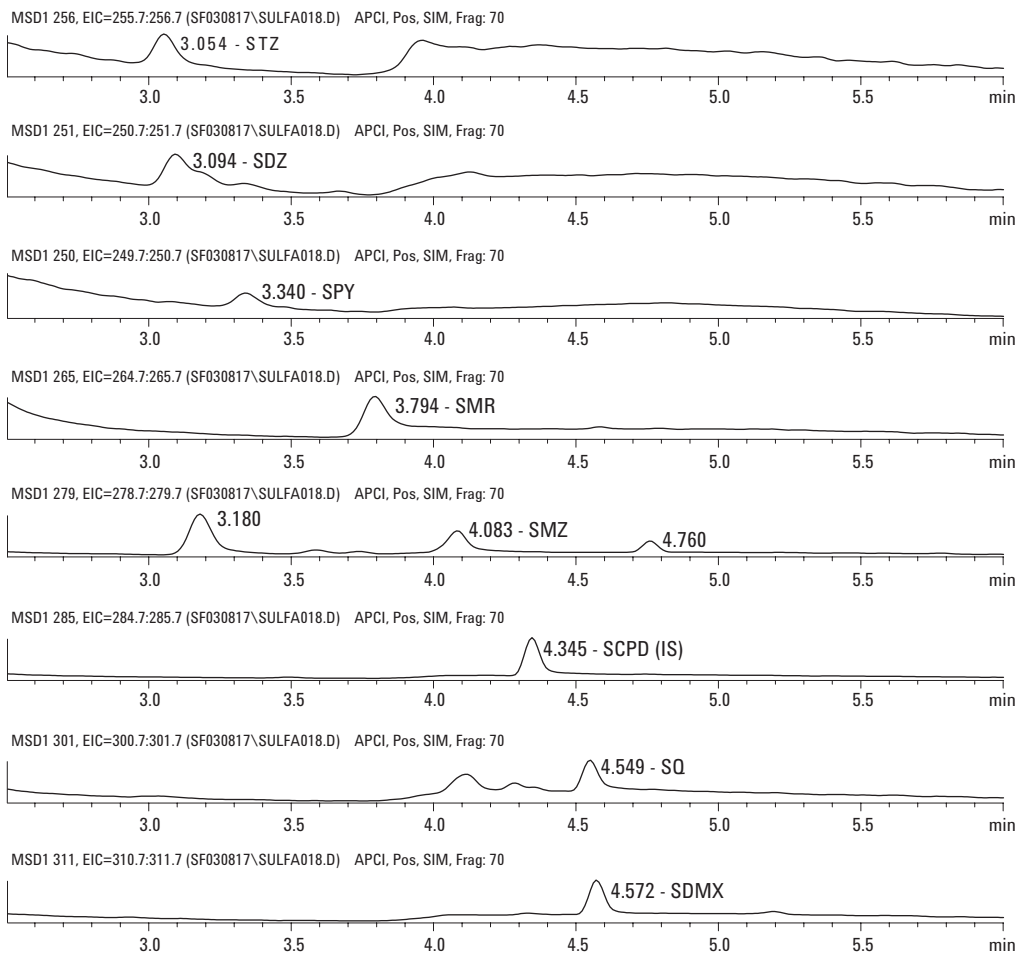


図 4. 溶媒置換のみ (SIM)

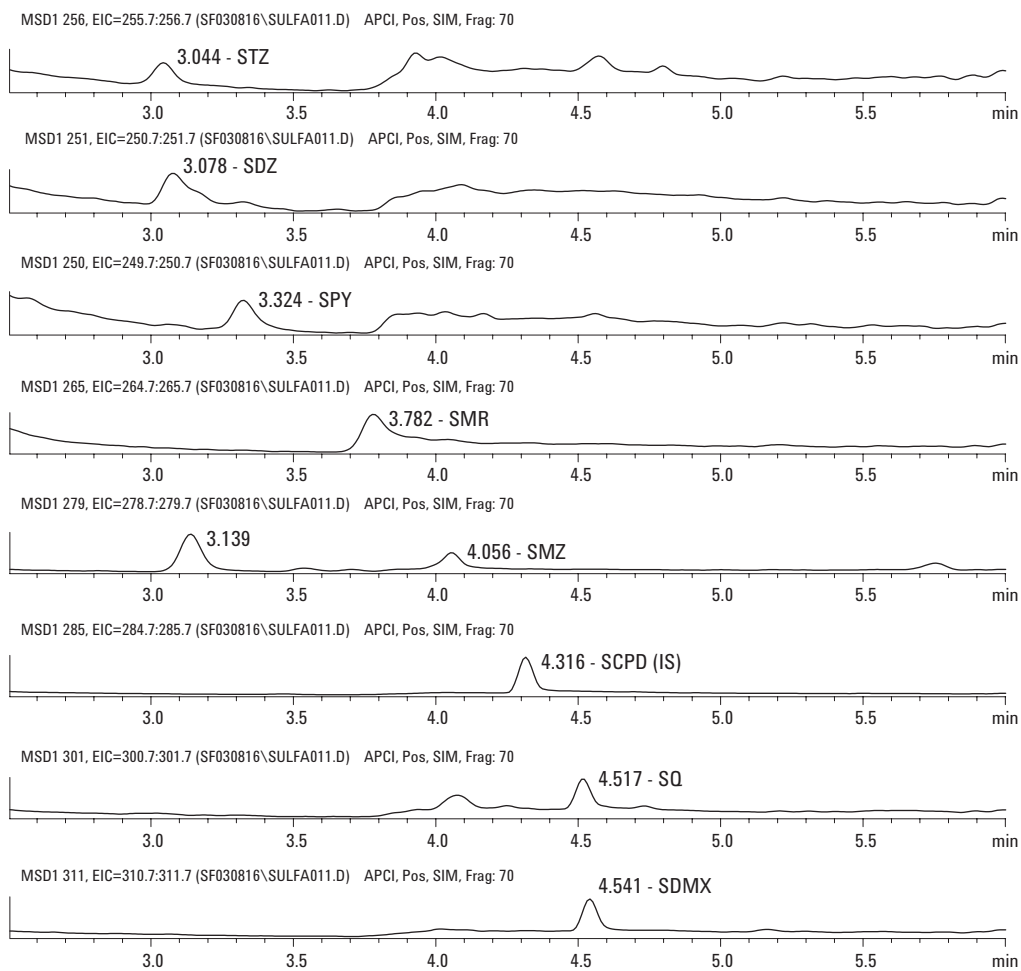


図 5. 水で 4 倍に希釈

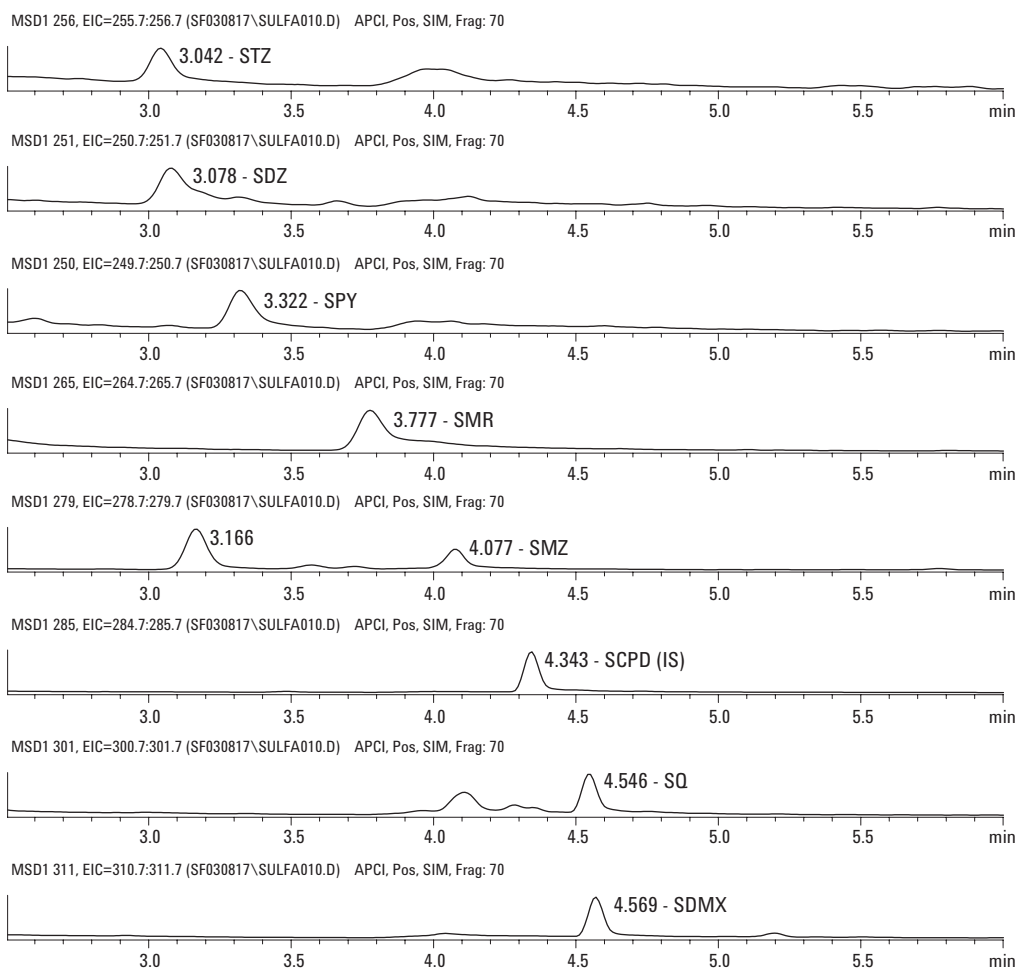


図 6. HLB クリーンアップ後 (SIM)

結果と考察

50 ppb になるようスパイク添加 (サンプル 3 g 中に各スルホンアミド 150 ng) した 7 つのサンプルで得られた回収率を以下の表に示した。スパイク溶液は、ホモジナイズの前に添加され、抽出の前に最低 30 分静置した。SMR (スルファメラジン) は、ホモジナイズの前に 1 サンプルあたり 300 ng 別に添加し、この化合物をサロゲートとして使用した。表 3 の結果は、抽出物を単に水で 4 倍に希釈して得られた (回収率 84%-118%)。表 4 の結果は SPE クリーンアップを介して得た抽出物から得られた (回収率 79%-104%)。

両方のケースにて、20 から 200 pg のターゲット成分と 2,000 pg の SCPD を含む標準試料を注入し、SCPD を内部標準に用いた 5 点検量線を作成して使用した。スパイク添加サンプルを 7 回分析する前後に、5 レベルの標準試料のセットを注入し、検量線は前後のキャリブレーションを平均して作成した。これらの化合物はピークテーリングが顕著であり、ピーク面積よりも変動が少ないピーク高さを測定に使用した。検量線の直線性については (R^2) を表 3 と 4 に示した。

表 3. 抽出物を水で 4 倍希釈した場合のスルホンアミドの回収率

説明	回収量 (ng)							
	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD(IS)	SQ	SDMX
豚スパイク 1	167	172	164	317	151	2,000	148	130
豚スパイク 2	168	197	68	343	164	2,000	169	137
豚スパイク 3	160	183	158	315	157	2,000	133	121
豚スパイク 4	158	189	167	336	156	2,000	138	129
豚スパイク 5	151	169	154	295	169	2,000	133	129
豚スパイク 6	147	161	144	322	143	2,000	120	112
豚スパイク 7	144	72	141	272	151	2,000	124	125
スパイク量 (ng)	150	150	150	300	150	2,000	150	150
平均	156	178	157	314	156	2,000	138	126
SD (精度)	9	13	11	24	9	—	17	8
MDL (SD × t-stat) ng	29	40	34	77	28	—	53	26
LOQ (SD × 10) ng	94	126	108	245	88	—	167	82
RSD (SD × 100/平均)	6	7	7	8	6	—	12	7
精度 (%)	104	118	104	105	104	100	92	84
直線性 (R ²)	0.9997	0.9996	0.9997	0.9972	0.9996	1.0000	0.9984	0.9992
t-stat (N=7)	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14

表 4. Oasis HLB クリーンアップカートリッジ使用時のスルホンアミドの回収率

説明	回収量 (ng)							
	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD(IS)	SQ	SDMX
豚スパイク 1	161	157	132	273	149	2,000	139	126
豚スパイク 2	154	156	132	293	157	2,000	153	131
豚スパイク 3	149	158	124	267	155	2,000	132	113
豚スパイク 4	145	152	122	279	144	2,000	119	111
豚スパイク 5	151	162	127	294	149	2,000	127	121
豚スパイク 6	136	147	127	274	136	2,000	116	108
豚スパイク 7	148	161	128	275	155	2,000	124	116
スパイク量 (ng)	150	150	150	300	150	2,000	150	150
平均	149	156	127	279	149	2,000	130	118
SD (精度)	8	5	4	10	7	—	13	8
MDL (SD × t-stat) ng	24	17	11	33	23	—	40	26
LOQ (SD × 10) ng	76	53	36	104	73	—	128	82
RSD (SD × 100/平均)	5	3	3	4	5	—	10	7
精度 (%)	99	104	85	93	100	100	87	79
直線性 (R ²)	0.9994	0.9994	0.9997	0.9979	0.9998	1.0000	0.9989	0.9989
t-stat (N=7)	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14	3.14

表 5 は水希釈のみの場合と Oasis HLB カートリッジによるクリーンアップを行った場合の回収率の比較をまとめたものである。一般的に、保持の小さな成分では回収率が大きく異なってくる。サンプルはほぼ水相に近い (10% メタノール水溶液) 相でカートリッジにロードされているため、水溶性のマトリクス成分はカートリッジを通過してしまう傾向にある。これらの保持の小さな成分は HPLC カラムへのインジェクション前に除去されるため、クロマトグラムはよりクリーンになり、クロマトグラフィーの再現性は向上する。このことは、回収率の標準偏差がより小さいことから分かる。HLB クリーンアップの結果は、より小さな標準偏差と、より低い検出限界レベル (MDL) を示していた。

結論

高速かつ高感度のシングル四重極 LC/APCI/MS を使用して豚肉に含まれるスルホンアミド残留物の検出メソッドを開発し妥当性を検証した。抽出物を単に希釈して分析した場合には 10 から 25 ng/g の検出限界、SPE によりクリーンアップした場合は 4 から 13 ng/g の検出限界が得られた。たいていのラボで一般的なカラムと条件を使って 10 分間の注入サイクル分析が可能である。

参考資料

1. TLC-Densitometric Procedure for Sulfonamide Residues in Animal Tissue, SUL-SP08, Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 2001/04.
2. Sulfonamides in Tissue by LC/MS, Alberta Agriculture, Edmonton, Alberta, Canada, Standard Operating Procedure TX-0278-01.
3. Mark Stahl, "High-throughput analysis with the Agilent 1100 Series high-throughput LC/MS system", Agilent Technologies, publication 59889638EN. www.agilent.com/chem

表 5. 希釈 vs Oasis HLB クリーンアップによる回収率の比較

説明	STZ	SDZ	SPY	SMR	SMZ	SCPD (IS)	SQ	SDMX
精度 % (4倍希釈)	104	118	104	105	104	100	92	84
SD (精度)	9.4	12.6	10.8	24.5	8.8	–	16.7	8.2
MDL (ng)	29	40	34	77	28	–	53	26
精度 % (HLB クリーンアップ)	99	104	85	93	100	100	87	79
SD (精度)	7.6	5.3	3.6	10.4	7.3	–	12.8	8.2
MDL (ng)	24	17	11	33	23	–	40	26

詳細情報

Agilent の製品およびサービスについての詳細情報は、
Webサイト www.agilent.com/chem/jp でご覧ください。

お問い合わせ： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilentは、本文書に含まれる誤り、および本文書の内容または使用に関連して、
付随的または間接的に引き起こされる損害について、一切の責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2004

Printed in the USA
October 20, 2003
5989-0182JAJP