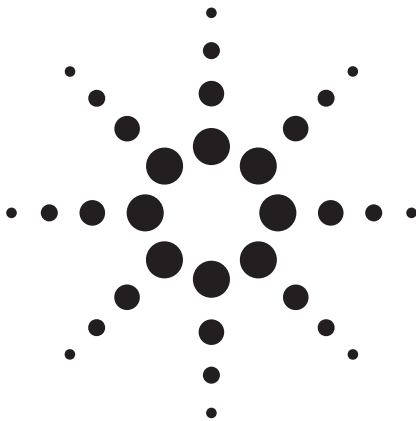


エレクトロスプレーイオン化法LC/MSによる ウシ腎臓中のフルオロキノロンの分析 アプリケーション



食品

著者

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

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

概要

高速かつ単純な分析手法により、ウシ腎臓中のフルオロキノロン系抗生物質3種を効果的に分析しました。サンプル抽出には酸添加したメタノールを使用し、遠心分離後に水で希釈し、ろ過しました。希釈した抽出液をエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを用いて、HPLC質量分析により直接分析しました。測定には内標準法を使用しました。平均回収率は、33 µg/kg (ppb) の添加レベルに対し73%から96%、統計計算より求めた検出限界は8-19 µg/kgでした。この値は、欧州連合 (EU) が定めるウシ腎臓中エンロフロキサシンおよびシプロフロキサシンの最大残留基準値の200 µg/kgを下回るものです。本分析手法について、欧州委員会(EC)が確認試験手法として定めた規定2002/657/ECの要件と比較し評価しました。

はじめに

フルオロキノロンは、ナリジクス酸から派生する合成抗菌化合物で、他の抗生物質に耐性のある動物感染症の治療に使用されます。フルオロキノロンの活性範囲は広く、グラム陽性菌とグラム陰性菌の両方に抗菌活性を示します。エンロフロキサシンの最大残留基準値 (MRL) は (エンロフロキサシンとシプロフロキサシンの合計値として) 腎臓に関する欧州委員会規則 (EEC) No. 2377/90の付属文書1に盛り込まれ、ウシおよびヒツジで200 µg/kg、ブタ、家禽、ウサギで300 µg/kgとされています。その他の食用種については、腎臓中のMRLは200 µg/kgと定められています[1]。

種々の組織中のフルオロキノロン分析について数多くの分析手法が存在し、中でも蛍光検出器や質量分析検出器と接続したHPLCによる分析が一般的となっています。ほとんどの手法において、酸や塩基を添加した有機溶媒で抽出を行ない、続いて何らかの方法でクリーンアップを行なっています。中でももっとも用いられるクリーンアップ手法は固相抽出 (SPE) です。カナダ食品検査局 (Canadian Food Inspection Agency) では、酸添加エタノールを用いて動物組織から抽出したのち、強陽イオン交換タイプの固相抽出でクリーンアップを行ない、HPLC蛍光法により分析しています[2]。ChenとSchneider[3]が発表した鶏におけるエンロフロキサシンのスクリーニング試験法では、抽出および遠心分離後、クリーンアップを行わずに蛍光法で分析しています。



Agilent Technologies

EC委員会規則2002/657/ECでは、規定96/23/EC付属文書1のグループBで定められた物質について、蛍光検出器と組み合わせたHPLCによる測定が認められています[4]。キノロンなどの獣医用薬剤は、グループBに分類されます。グループBの物質について、質量分析法 (MS) を用い選択イオンモニタリング (SIM) による確認試験を行なう場合、目的物質を特徴づけるような3つの確認イオンの採取が要求されます。低分離能HPLC/MSの場合、イオン比が相対強度基準を満たしていれば、各検出イオンにつき1つの確認イオンとして適用されます。本検討における実施された添加レベル33 µg/kgの場合、規定2002/657/ECの追加要件は以下の通りです。

- 内部標準 (IS) は、抽出前に試験部に添加するものとする。
- 平均回収率によるデータ補正が認められる回収率は、-20%から+10%とする。
- 変動係数 (CV) (%)の再現性は、許容限界の1/2の濃度において、100 µg/kg CV (23%) の1/2から2/3とする。
- 液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) の場合、許容される目的成分の最小の保持時間 (RT) は、カラムの空隙容量によるRTの2倍とする。
- 内部標準と目的成分の保持時間の比、すなわち目的成分の相対保持時間は、LCの許容誤差2.5%において較正用溶液の相対保持時間に相当する値とする。
- 擬分子イオンを選択識別イオンのひとつとすることが好ましい。
- 相対イオン強度の最大許容誤差は、付属文書に記載の基準 (本分析の場合、±25%または30%) に準拠するものとする (表6参照)。

分析方法

試薬および試料

HPLCグレードのメタノールおよびアセトニトリルをCaledon Lab (オンタリオ州ジョージタウン) から購入。

ギ酸 (最低98%) はEM Scienceから購入。

酸添加メタノール溶液：30%メタノールをpH3の脱イオン水 (水100mLに対してギ酸100 µL) と混合。

酸添加メタノールは、メタノール100 mLに98%ギ酸100 µLを加えて調製。

酸添加脱イオン水は、脱イオン水100 mLに98%ギ酸100 µLを加えて調製。

Ultra-Turrax T25ホモジナイザ、50-mLポリプロピレン遠心分離チューブ、13-mmフッ化ビニリデン樹脂 (PVDF) シリンジフィルタ (0.2 µm) をVWR Scientificから購入。

内標準 (IS) を含む全てのフルオロキノロンは、1%酢酸メタノールに溶解した100ng/µL (ppm) 原液として、カナダ食品検査局 (カナダ・アルバータ州) から無償で提供されました。溶液は4 °Cで保存しました。酸添加メタノール溶液を希釈液として添加し、様々な濃度の標準溶液を調製しました。シプロフロキサシン、エンロフロキサシン、サラフロキサシンがカナダ食品検査局の検定試験の試料に含まれていることから、これらを目的成分として選択しました。これらの化合物の添加用標準液 (1ng/µL) の作成にあたっては、各原液100 µLを10-mLのメスフラスコに入れ、酸添加脱イオン水を容量まで加えて調製しました。1ng/µLのIS溶液については、ノフロキサシンとダノフロキサシンのみが含まれるよう調製し、同様に調製しました。

サンプルの前処理

1. ウシの腎臓3gを50- mLポリプロピレン遠心分離チューブに入れ、直接計量しました。
2. 添加サンプルについては、1-ng/µL添加用標準溶液100 µL (100ngに相当) を加え、サンプルに対し33 µg/kg添加としました。添加後、抽出を行うまで1時間保管しました。
3. ブランクサンプルについては、酸添加メタノール溶液100 µLを加えました。
4. 抽出の直前、全てのサンプルに対し、1-ng/µLのIS溶液を100 µL (100ngに相当) ずつ加えました。この溶液には、ノフロキサシンが添加サンプルと同じ濃度含まれており、ダノフロキサシンに妨害ピークなどの干渉の可能性がある場合、代替ISとして使用できます。
5. サンプルに酸添加メタノール15mLを加え、Ultra-Turraxホモジナイザにより2分間ホモジナイズしました。
6. その後、10分間の遠心分離を行ない、上澄みを清浄な試験管に移しました。

7. 抽出液を酸添加脱イオン水で4倍に希釈し（抽出液 250 µLと水750 µL）、0.2-µmPVDFフィルタでオート サンプラ用バイアルへろ過し、LC/MSで直接分析 しました。

抽出前に正確な量のISをサンプルに加えているので、抽出液の最終容量を測定する必要がありません。また、それぞれのサンプルを定容する必要もありません。ChemStationから求めたIS計算により、目的成分とISの 相対量を測定します。これにより、サンプルに対する 濃縮や希釈などの調製誤差によるを全て補正するこ とができます。

標準溶液の調製

3種の目的化合物それぞれについて、5点検量線を使用 しました。また、代替ISのノルフロキサシンについて は、1点検量線を使用しました。表1に、5本の試験管 に注入したISおよび添加した溶液の体積を示します （各1ng/µL）。ブランク抽出液250 µLと酸添加脱イオン 水750 µLを、目的成分を含む検体を入れた試験管に加 え標準溶液を調製しました。その後、各溶液を0.2- µmPVDFフィルタでろ過しました。

各標準溶液の最終溶液には、希釈抽出液1 mLあたり 5ngのIS（5pg/µL）が含まれています。50 µLを注入す れば、250pgが注入されたこととなります。添加した 目的成分の体積が異なるものを5種類用意し、検量線 を作成します（表1参照）。

各目的成分の相関係数（R²）は、0.9987から0.9992でし た（表4参照）。

このような手法で標準溶液を調製すると、目的成分と 同時溶出物質が同時にMSソースに存在することから 起こり得る、イオン化の抑制あるいは促進の影響を補 正することができます（純溶媒のみを使用した場合 に は、この現象は起こりません）。

表1. 分析用標準溶液の作成（LC/MSDに50-µLを注入）

標準溶液	添加ISの 体積 (µL)	添加目的 成分の 体積 (µL)	IS注入量 (pg)	目的成分 注入量 (pg)
1	5	1	250	50
2	5	2	250	100
3	5	5	250	250
4	5	10	250	500
5	5	20	250	1,000

LC/MS測定条件

HPLCシステムは、Agilent Technologies1100シリーズ 溶媒デガッサー、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（DAD）、 四重極質量選択型検出器（MSD）で構成されています （表2）。

表2. LC/MSD測定条件

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
溶媒 B	0.1%ギ酸-アセトニトリル
グラジエント	t ₀ = 20% B t ₁ = 20% B t ₈ = 90% B t ₁₅ = 90% B ポストタイム = 2.0 min
流量	0.4 mL/min
注入量	50 µL
カラム温度	30 °C
MSD	
ソース	エレクトロスプレーイオン化 (ESI) (ポジティブイオンモード)
Dwell time	14イオン、各40 ms
フラグメンタ電圧	イオンにより異なる、表3参照
乾燥ガス流量	12 L/min
ネブライザ圧	30 psi
乾燥ガス温度	350 °C
キャピラリ電圧	4000 V

表3. SIMで抽出したイオンのフラグメンター電圧 （単一抽出グループ）

化合物	イオン	フラグメンタ電圧 (V)
ノルフロキサシン (IS)	320	120
	302	200
	276	200
シプロフロキサシン	332	120
	314	200
	288	200
ダノフロキサシン (IS)	358	120
	340	220
	342	220
エンロフロキサシン	360	120
	316	220
	342	220
サラフロキサシン	386	120
	368	220
	342	220

全てのイオンを同じ抽出グループにまとめ、注入時 (time = 0) にデータ採取を開始しました。別の方法として、最初の化合物が溶出する約30秒前からデータ採取を開始するという方法もあります。この手法を用いると、データを採取しない間の溶離液の流れをバルブにより廃液へと導くことができます。その結果、ソース内へ導入される夾雑物の量を減らし、MSDへの汚染を低減することができます。

また別の方法として、タイムプログラムを組み、選択イオンの抽出グループを設定するというものがあります。この場合、設定時間内に溶出する化合物のイオンのみを選択します。この方法は、測定対象の化合物数が多い場合に有効です。また、化合物の同定のためには、1つの化合物に対し3つのイオンの測定、すなわち設定時間内に3つのイオン測定が必要とされます。

フラグメンタ電圧については、それぞれの選択イオンに対する感度が最大になるよう設定しました。各フルオロキノロンについては、120Vでプロトン付加イオンのみが生成しましたが、確認のためにフラグメントイオンを生成するためには、フラグメンタ電圧を高く設定する必要があります。観測されたイオンは、いずれも水および二酸化炭素のニュートラルロスに一致しました。

エンロフロキサシンおよびサラフロキサシンで、共に質量数342のイオンが抽出されましたが、MSDにおける検出条件設定のタイムテーブルを利用して、それぞれ別の時間範囲で採取されました。

クロマトグラフィー

全ての化合物は5分から9分でカラムから溶出しますが、全分析時間を15分に設定し、分析の最後に90%有機溶媒を用いて、同時に抽出された夾雑物がカラムから洗い流されるようにしました。この操作により、夾雑物の溶出が次の測定に干渉するのを防ぎます。クリーンアップを簡略化する（希釈のみなど）場合には、マトリクスの影響はより大きな問題となる可能性があります。以下の図は、ウシ腎臓のブランクサンプルと、33 µg/kg添加したサンプルを比較したものです。いずれの場合も、選択イオンはプロトン付加イオン、およびH₂O (M-18) とCO₂ (M-44) の脱離に起因するプロトン付加イオンです。

本分析でISとして使用したダノフロキサシンの修飾イオンは、質量340です。マトリクスは、質量340で干渉を引き起こし、図1に示すように、ウシ腎臓ブランクにおいて弱いピークとして表れています。ISの計算には識別用の確認イオンが必要とされないため、結果に影響を与えません。しかしこの結果は、同時溶出物質がサンプル中に存在することを示しています。したがって、さらにクリーンアップを行わなければ、同時溶出物質の存在によりイオン化の抑制が生じる可能性があります。こうした影響の可能性を考慮し、標準溶液は全て、ウシ腎臓抽出液のブランクを用いて調製しました。

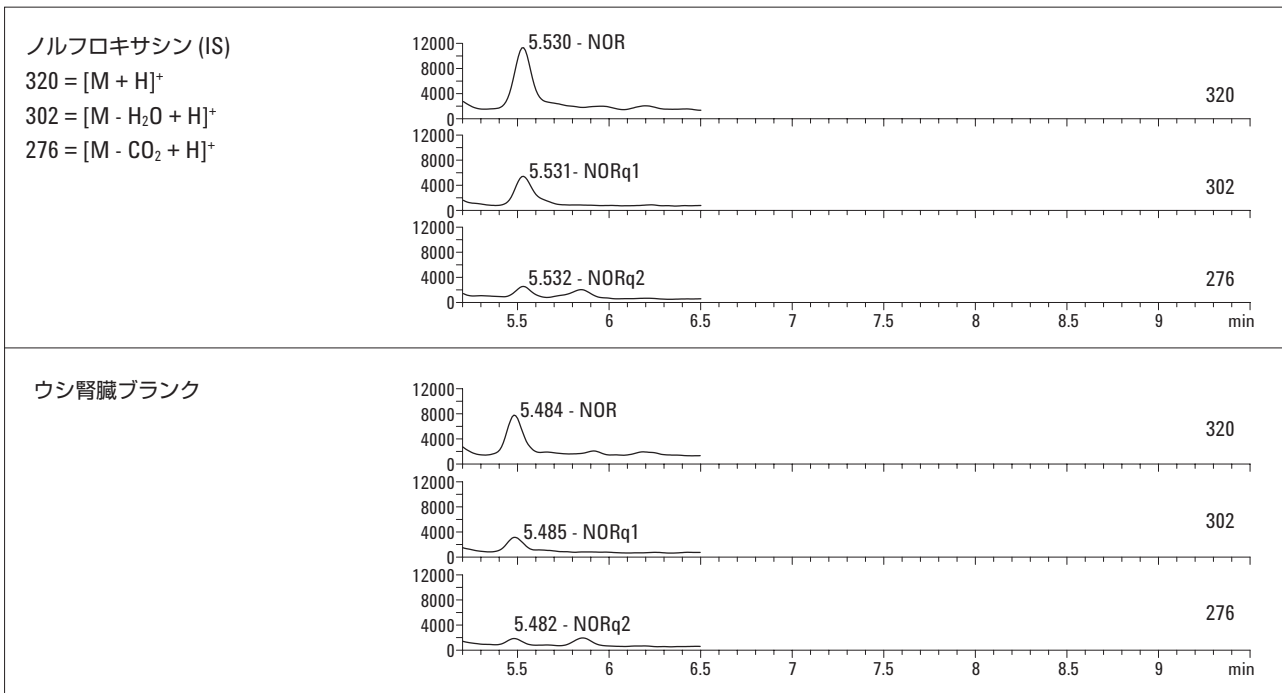


図1. ウシ腎臓に添加したフルオロキノロンの抽出イオンクロマトグラフィーの比較

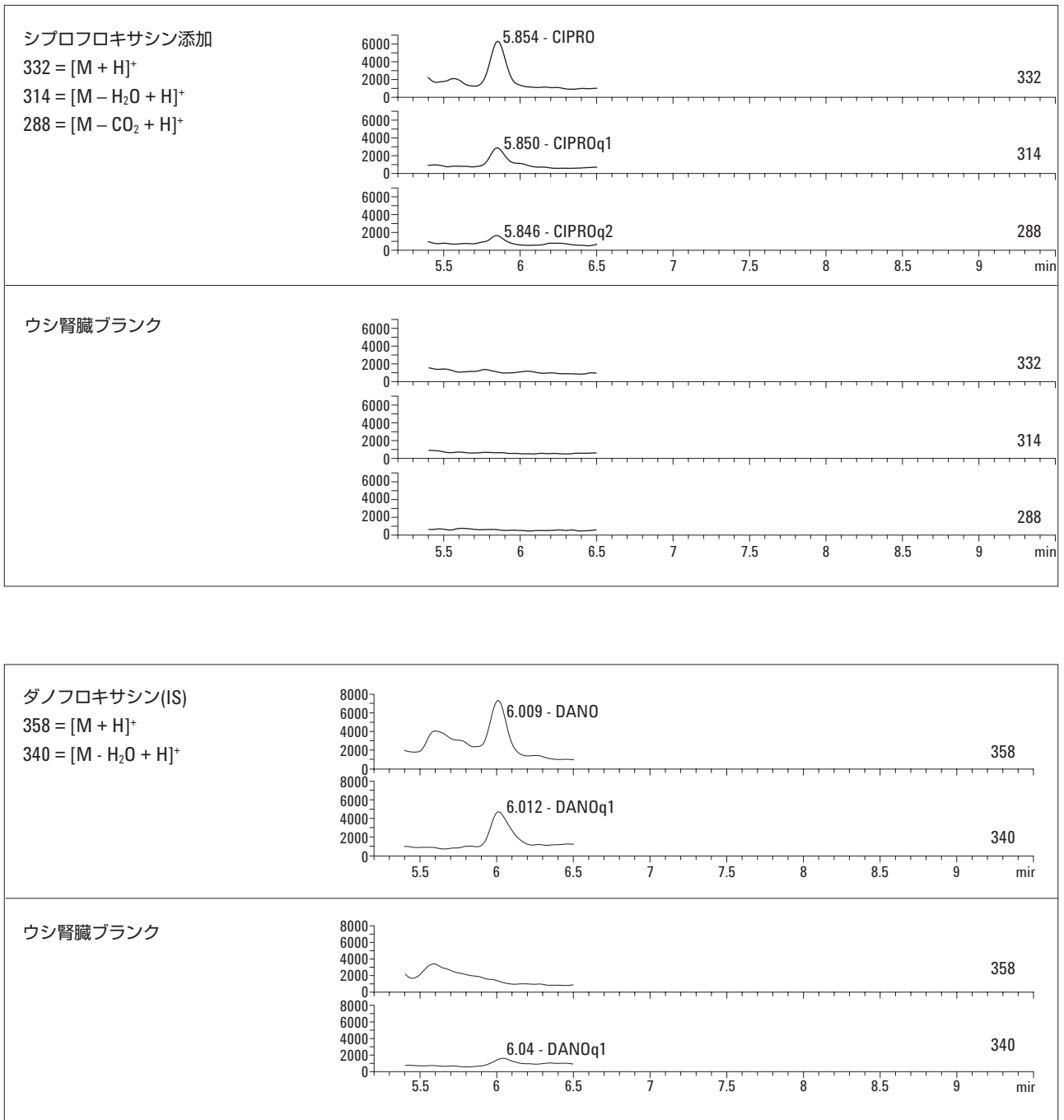


図1. ウシ腎臓に添加したフルオロキノロンの抽出イオンクロマトグラフィーの比較 (続き)

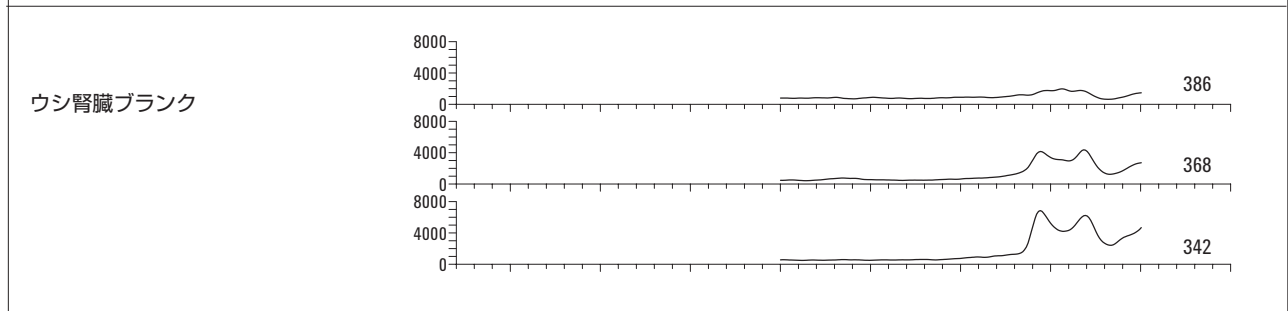
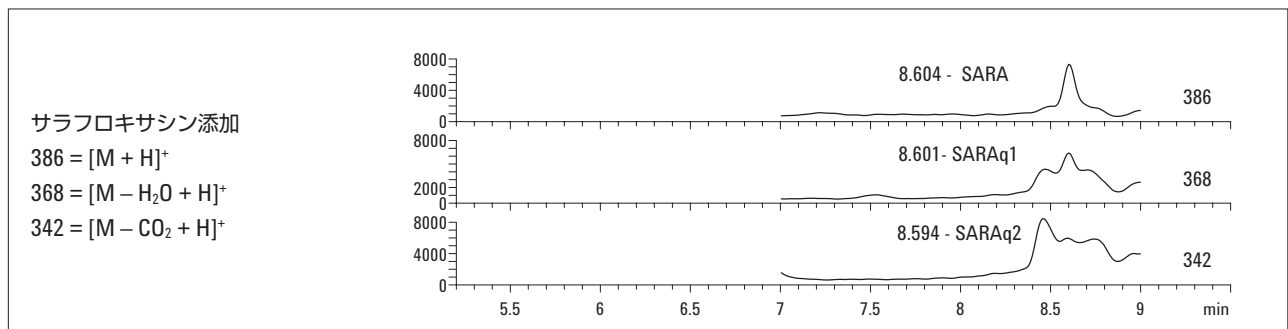
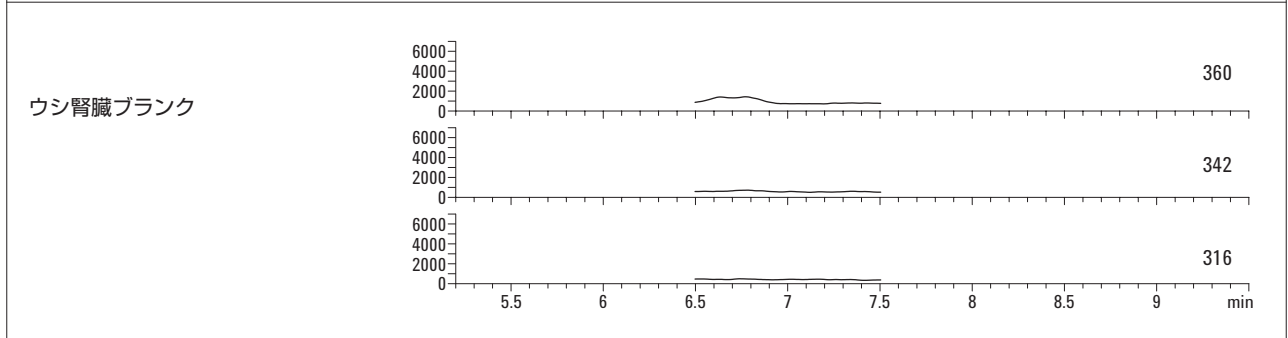
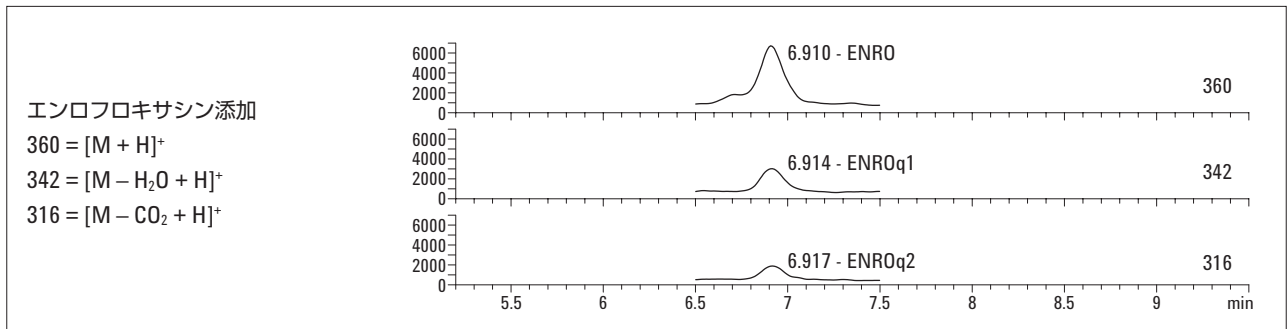


図1. ウシ腎臓に添加したフルオロキノロンの抽出イオンクロマトグラフィーの比較 (続き)

サラフロキサシンについては、多数の同時溶出物質と同じ位置でカラムから溶出するため、確認および定量が難しくなっています。しかし、表7に示すように、確認イオンは相対強度の同定基準に達しているため、サンプルのさらなるクリーンアップは必ずしも必要ではありません。また、EUの最大許容基準に近い高残留レベルにおいては、同時溶出物質による影響はさらに低くなります。

回収

データを回収率に応じて補正する（測定された残留レベルを標準物質または添加サンプルから得られた回収率のパーセンテージで割る）ためには次の要件が求められています。付属文書の表2によると、10 µg/kg以上の目的成分に対しては80%から110%の回収率が求められます。表4に示すとおり、シプロフロキサシンおよびエンロフロキサシンの回収率はそれぞれ96.3%と86.0%で、この基準を満たしています。しかし、サラフロキサシンは基準を満たしておらず、平均回収率は72.6%に留まっています。サラフロキサシンのCVがわ

ずか8%であることから、本手法による結果は、スクリーニング目的としては許容範囲内であると考えられますが、回収率を高めるためには、何らかの手順を追加する必要があると思われます。尚、ここで示した結果は添加サンプルのみであるため、回収率を補正する計算は行なっておりません。

ノルフロキサシンをダノフロキサシンと共に添加し、追加用内部標準物質としました。しかし、本分析で使用したウシ腎臓ブランクの試験結果では、ノルフロキサシンの添加レベルの約1/2の濃度がブランク中に存在していることがわかりました。原点を通るリニアなレスポンスを仮定すると、ノルフロキサシンは約15-20 µg/kgで検出されることとなります。この数値は、ウシ腎臓中のエンロフロキサシン許容値の約10%に相当します。ノルフロキサシンの回収率も表4に示していますが、これは1点検量線から算出したもので、ブランク中に含まれていた量の補正は行なっていません。ただし、検量線作成に使用した標準溶液は、ブランク抽出液に目的成分を添加して調製しているため、ノルフロキサシンの回収率にも若干の補正がされています。

表4. ウシ腎臓中のフルオロキノロン回収率

種類	回収量 (ng)			
	ノルフロキサシン	シプロフロキサシン	エンロフロキサシン	サラフロキサシン
腎臓添加液1	111.8	96.3	84.9	68.5
腎臓添加液2	93.1	94.0	85.6	4.1
腎臓添加液3	88.0	89.6	83.8	77.6
腎臓添加液4	98.9	95.4	86.2	75.2
腎臓添加液5	82.2	93.8	85.4	82.1
腎臓添加液6	143.0	109.3	87.9	72.9
腎臓添加液7	102.6	101.3	83.3	73.0
腎臓添加液8	110.6	90.8	91.3	67.7
添加量 (ng)	100.0	100.0	100.0	100.0
平均	103.8	96.3	86.0	72.6
SD (精度) ng	18.9	6.3	2.5	5.8
MDL (SD × t-stat) ng	56.7	19.0	7.6	17.4
LOQ (SD × 10) ng	189.1	63.4	25.4	58.1
CV (SD/平均) %	18.2	6.6	3.0	8.0
精度 (%)	103.8	96.3	86.0	72.6
直線性 (R ²)	0.9895	0.9987	0.9992	0.9987
t-stat (N = 8)	3.00	3.00	3.00	3.00

化合物の同定

2002/657/EC付属文書のセクション2.3.3.1では、クロマトグラフィー分離に関して、目的成分の最小許容RTは、カラムの空隙容量に相当するRT ($k'=1$) の2倍以上と定められています。本分析条件では、 $k'=2.6$ のノルフロキサシンが最初に溶出します。したがって、この要件を容易に満たします。もう1つの要件は、ISのRTに対する目的成分RTの比率（相対RT）です。これについては、LCの許容誤差 $\pm 2.5\%$ において、較正用溶液のRTに相当する値と定められています。表5に、添加サンプル中の各目的成分のRTと、標準溶液のRTとの比較を示します。いずれの数値も、許容誤差の範囲内でした。

表5. サンプル中の目的成分の相対RT（標準溶液との比較）

化合物	標準溶液の相対RTの平均 (N = 15)	標準溶液の相対RTのCV (%) (N = 15)	標準溶液と比較したサンプルの相対RT (N = 8)
ノルフロキサシン	0.922	0.12%	99.8%-100.1%
シプロフロキサシン	0.975	0.05%	99.9%-100.1%
エンロフロキサシン	1.150	0.16%	99.8%-100.2%
サラフロキサシン	1.439	0.47%	99.5%-100.3%

化合物の確認

2002/657/EC付属文書のセクション2.3.3.2では、相対イオン強度に関する最大許容誤差が定められています（表6参照）。

表6. 種々の質量分析法を使用した場合における相対イオン強度の最大許容誤差

相対強度 (ベースピークの%)	GC/MS(EI) (相対)	GC/MS(CI), GC/MS ⁿ , LC/MS, LC/MS ⁿ (相対)
>50%	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
>20% - 50%	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
>10% - 20%	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

n = 2の場合、MSⁿはMS/MSIに相当します。

表7に、3種の目的成分、およびノルフロキサシンとダノフロキサシン（1イオン）における確認イオンの相対強度を示します。予想されたとおり、ノルフロキサシンについては、8つの添加サンプルにおいて全て基準を満たしています。ただし、これにはブランク中に既に存在していたノルフロキサシンが含まれています。こうした残留ノルフロキサシンの存在は、本分析の定量性の面ではマイナス影響を及ぼさないものと考えられますし、実際に影響は確認されませんでした。しかし、ダノフロキサシンについては、モニターする確認イオンに対する干渉が観察されました。

そのため、このイオンの信号強度の相対量は、サンプルの希釈や標準溶液調製に使用したブランク抽出液の量に応じて、大きく変化するものと予想されます。前述したように、試験管または瓶へ加えた目的成分およびIS化合物の相対量を正確に測定したのち、腎臓抽出液のブランクと水を添加して、標準溶液を調製しました。内標準法による未知試料の定量では、正確な量とそれに対応した応答の絶対値ではなく、量とその応答の比率を用いるため、抽出液と水の正確な比率を求めることはできません。ただし、抽出液と水の体積を正確に測定することにより、干渉変動を低減することができます。

表7. ウシ腎臓におけるフルオロキノロン確認イオンの相対強度（許容誤差との比較）

サンプル	確認イオンの相対強度 (%)									
	ノルフロキサシン		シプロフロキサシン		ダノフロキサシン	エンロフロキサシン		サラフロキサシン		
	Q1 = 302	Q2 = 276	Q1 = 314	Q2 = 288	Q1 = 340	Q1 = 342	Q2 = 316	Q1 = 368	Q2 = 342	
添加溶液1	49	15	47	17	64	44	28	50	15	
添加溶液2	45	15	48	17	58	46	24	41	17	
添加溶液3	48	16	46	20	63	44	28	45	14	
添加溶液4	42	15	46	17	60	43	30	43	13	
添加溶液5	49	17	45	21	65	44	26	45	11	
添加溶液6	50	19	39	17	72	45	29	43	12	
添加溶液7	49	17	41	18	65	46	29	46	13	
添加溶液8	47	17	42	19	62	39	24	46	12	
標準溶液平均	49	20	44	20	86	43	26	47	15	
標準溶液SD	2	1	3	2	22	2	2	6	1	
許容誤差（表7）	25	30	25	30	20	25	25	25	30	
許容	37	14	33	14	69	32	19	35	11	
下限 (計算値)										
許容	62	26	55	25	103	53	32	59	20	
上限 (計算値)										

まとめ

ウシ腎臓中のフルオロキノロン系抗生物質3種（シプロフロキサシン、エンロフロキサシン、サラフロキサシン）の検出において、高速かつ高感度のシングル単一四重極LC/ESI/MSの有効性が示されました。検出限界は8から19 µg/kg (ppb) でした。サンプル抽出液は水で希釈後、直接分析しました。添加サンプルに関するEU指令2002/657/ECの付属文書で定められた定量に必要な要件は全て満たされ、3種のうち2種の化合物における回収率も定量基準を満たすものでした。サラフロキサシンの回収率は、本分析においては、回収率補正に要求されるレベルをわずかに下回りました。

参考文献

1. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicines and Inspections, EMEA/MRL/820/02-FINAL, January 2002.
2. Determination of Fluoroquinolones in Bovine, Porcine and Avian Tissues by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, FQL-SP04, Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 2001/03.
3. Chen, G., Schneider, M. J., (2003) A Rapid Spectrofluorometric Screening Method for Enrofloxacin in Chicken Muscle. *J. Agric. Food Chem.*, 51(11), 3249-3253.
4. Annex of Commission Decision 2002/657/EC, Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities*, 17.8.2002, L 221/8-36, Table 5, Footnote 4.

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
February 10, 2004
5989-0596JAJP