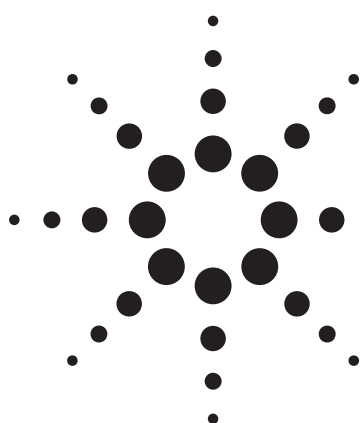


LC-ESI-MS/MSによる牛乳中の 遺伝子組み換えウシ成長ホルモンの検出



アプリケーション

食品安全性

著者

Marie-Hélène Le Breton, Sandrine Rochereau-Roulet, Gaud Pinel,
Fabrice Monteau, and Bruno Le Bizec
Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les
Aliments (LABERCA)
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN)
BP 50707, 44307, Nantes
France

Marie-Hélène Le Breton
2 Nestlé Research Center
Nestec Ltd., P.O. Box 44
CH-1000 Lausanne 26
Switzerland

概要

成長ホルモンとも呼ばれるrbST (recombinant bovine somatotropin:遺伝子組み換えウシ成長ホルモン)は、畜産業者が牛乳の生産を促進するために使用するタンパク質ホルモンです。ESI (+)-LC-MS/MSによって牛乳中のrbSTを検出するためのメソッドが開発されました。トリプシンN-末端ペプチドrbSTの標準溶液をオンカラムで注入した場合、このメソッドの検出下限値は20pgで、50 ng/mL⁻¹ (2.3 pmol/mL⁻¹)のrbSTをスパイクした牛乳サンプルから得た抽出物にも適用できました。

はじめに

成長ホルモンとも呼ばれるrbST (recombinant bovine somatotropin:遺伝子組み換えウシ成長ホルモン)は、乳牛の乳量を増やすために使用されます。その使用についてはさまざまな規制が存在しますが、その検出に関する確証的なメソッドがないため[1]、これらの規制の適用が難しくなっています。動物へのドーピングと食品安全性の点でも、国際的な問題になっています。実際に、このホルモンを与えられた乳牛の牛乳にはrbSTの残留物が存在する可能性があります。

牛乳中のrbSTの残留物を検出するために、タンパク質のトリプシンN-末端ペプチドの分析、特に内生型と組み換え型の違いに焦点を当てることを選択されました。内生型で存在するN-末端アミノ酸アラニンは、組み換え型のメチオニンで置換されています[2]。

このアプリケーションでは、ESI (+) LC-MS/MSでrbSTを検出するメソッドについて説明します。メソッドは、rbSTをスパイクした牛乳サンプルからの抽出物に適用できました。

実験手法

タンパク質とペプチドの標準試料

rbSTと遺伝子組み換えウマ成長ホルモンreST (EquiGen-5)のタンパク質標準試料は、それぞれHarbor-UCLA Medical Center, National Hormone and Pituitary Program (米国カリフォルニア州、Torrance) およびBresagen Limited (オーストラリア、Thebarton) から入手しました。



Agilent Technologies

MFPAMSLSLGLFANAVALR (N-末端トリプシンrbST)、MFPAMPLSSLFANAVALR (N-末端トリプシンreST)、AFPAMSLSLGLFANAVALR (N-末端トリプシンbST) というアミノ酸配列を持つ、標準試料として使用されるペプチドは、Millegen (フランス、Labège) によって合成されました。

機器

N-末端ペプチドの検出に使用した機器の詳細は表のとおりです。

LC

機器	Agilent 1200	
カラム	Column Interchrom ModuloCart QS Uptisphere 3HDO 150 mm × 2 mm	
移動相	A: アセトニトリル+ 0.1%ギ酸 B: H ₂ O + 0.1%ギ酸	
流速	0.3mL/min	
注入量	20 µL	
グラジエント	時間 (分)	%A
	0	10
	5	55
	10	60
	15	100
	17	10
	20	10

MS

機器	Agilent 6410 LC/MSトリプル四重極
イオン化モード	ESI (+)
キャピラリ	5000V
ネブライザ	55psi
ガス流速	13L/min
ガス温度	300°C

SRM (Selected Reaction Monitoring) メソッドパラメータ

選択性を向上させるために、SRMモードで検出を実行しました。モニタリングされるトランジションを表1に示します。

表1. SRMメソッドパラメータ

化合物	RT	価数	トランジション	コリジョンエネルギー (V)
N末端rbST	8.33	z = 2	913.2 → 1047.7	30
			913.2 → 774.1	20
		z = 3	609.3 → 774	10
			609.3 → 643.5	20
N末端reST	8.39	z = 2	933.2 → 1287.9	30
			933.2 → 794.1	20
N末端bST	8.20	z = 2	883.2 → 1047.8	20
			883.2 → 774.1	20

結果と考察

トリプル四重極MS-MSおよび

エレクトロスプレーイオン化モードメソッドの適用

このメソッドでは、ポジティブモードのエレクトロスプレーイオン化の使用を選択しました。実際に、“ソフト”イオン化手法と呼ばれるこのイオン化モードは、ペプチドに対して最適です。イオン化されたN-末端ペプチドrbSTは、2つの価数 (z = 2およびz = 3) になります。

このトリプル四重極ベースのメソッドを使用することで、非常に優れた感度と選択性が実現され、モニタされるシグナルの定量化も可能になります。

さまざまな化合物の分離

検出メソッドは、rbSTのトリプシンN-末端ペプチドのほか、内生脳下垂体ウシ成長ホルモン (bST) とreSTのトリプシンN-末端ペプチドも検出するように開発されました。rbSTではアミノ酸配列の相同性が高いため、reSTを内部標準として使用しました。

3つの化合物がクロマトグラフ的に分離され、表1に示したトランジションにしたがって分析されました。0.2ngのN-末端ペプチドbST、rbST、reSTの注入に対応するクロマトグラムを図1に示します。

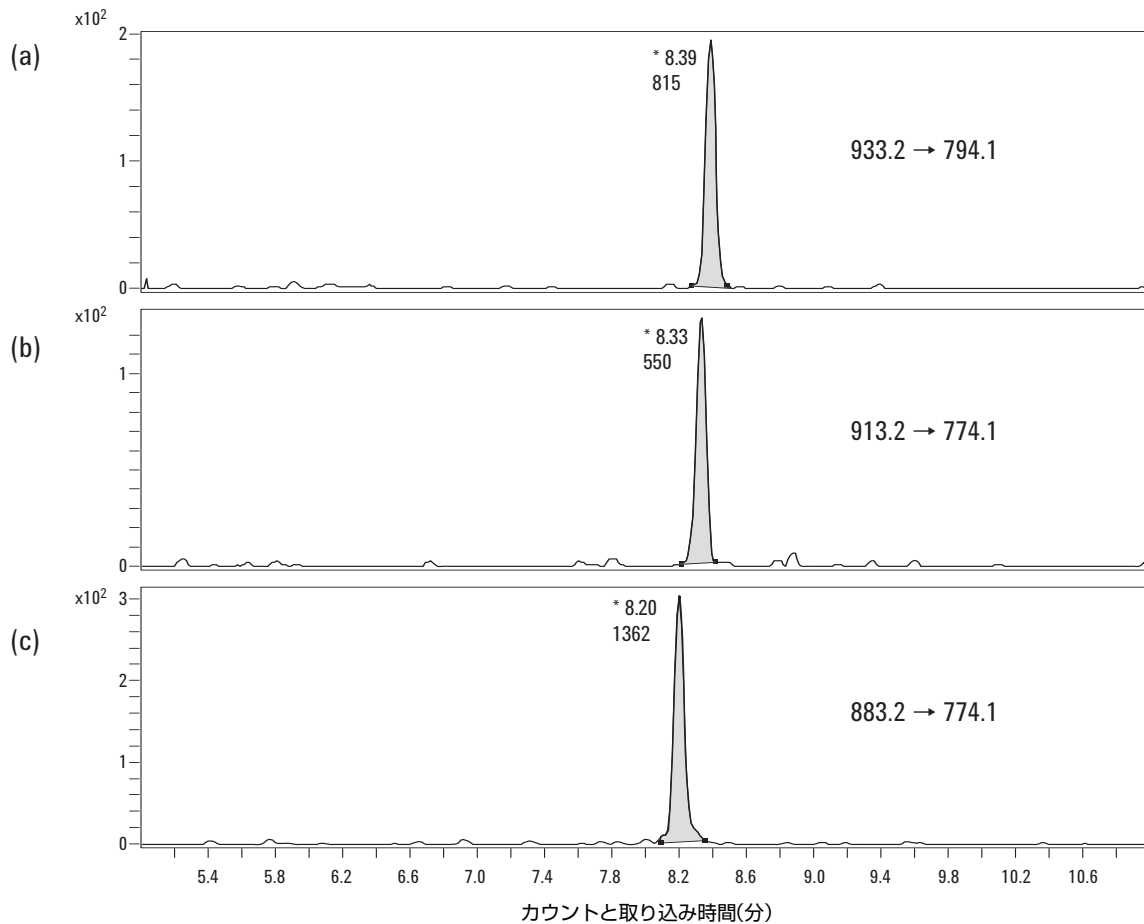


図1. (a)reST、(b)rbST、(c)bSTのトリプシンN-末端ペプチドの標準溶液のSRMイオンクロマトグラム。
使用された注入量は0.2ngオンカラムに相当します。

グラジェントが最適化されていても、配列の相同性が高いため、3つの化合物は非常に近似したリテンションタイムで溶出されています。

メソッドの感度の直線性

3つのペプチドの感度は非常に良好でした。検出下限値は20pg 注入オンカラム(～9900フェムトモル)となりました。検量線の直線性は良好で定量分析に適用可能でした(図2)。

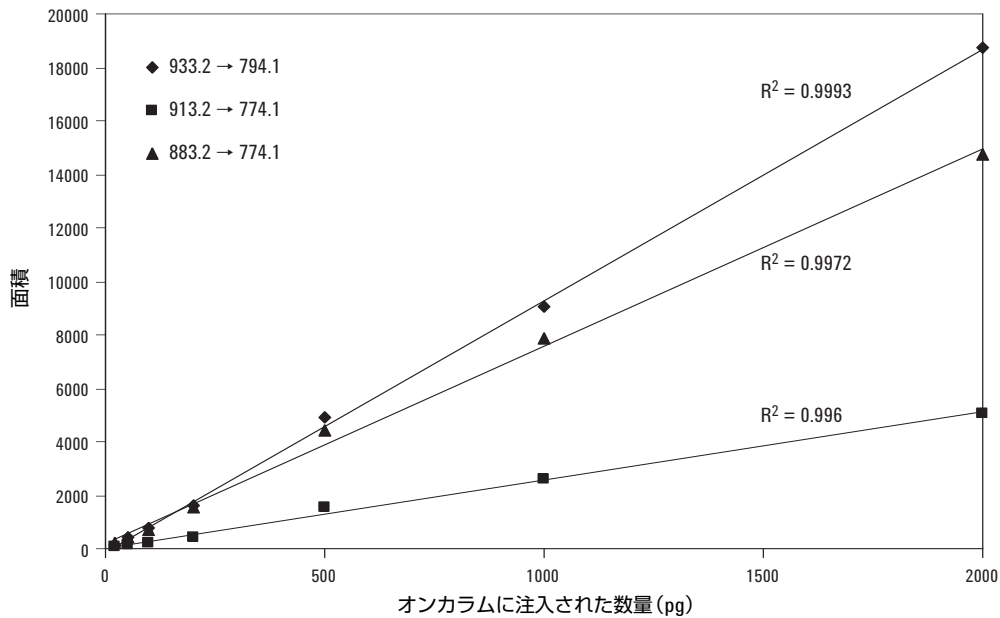


図2. トリプシンN-末端ペプチドrbST (913.2→774.1)、reST (933.2→794.1)、およびbST (883.2→774.1)の検量線。

スパイクしたサンプルの結果

本法をrbSTをスパイクした牛乳サンプルの抽出物に応用しました。前処理工程は[3]に説明されています。

図3に、2002/657基準に従ったrbSTの同定のガイドラインに基づく、50ng.mL⁻¹のrbSTをスパイクした牛乳サンプルのクロマトグラムを示します[4]。クロマトグラムでは優れたピーク形状が示されており、とりわけバックグラウンドノイズがほとんど

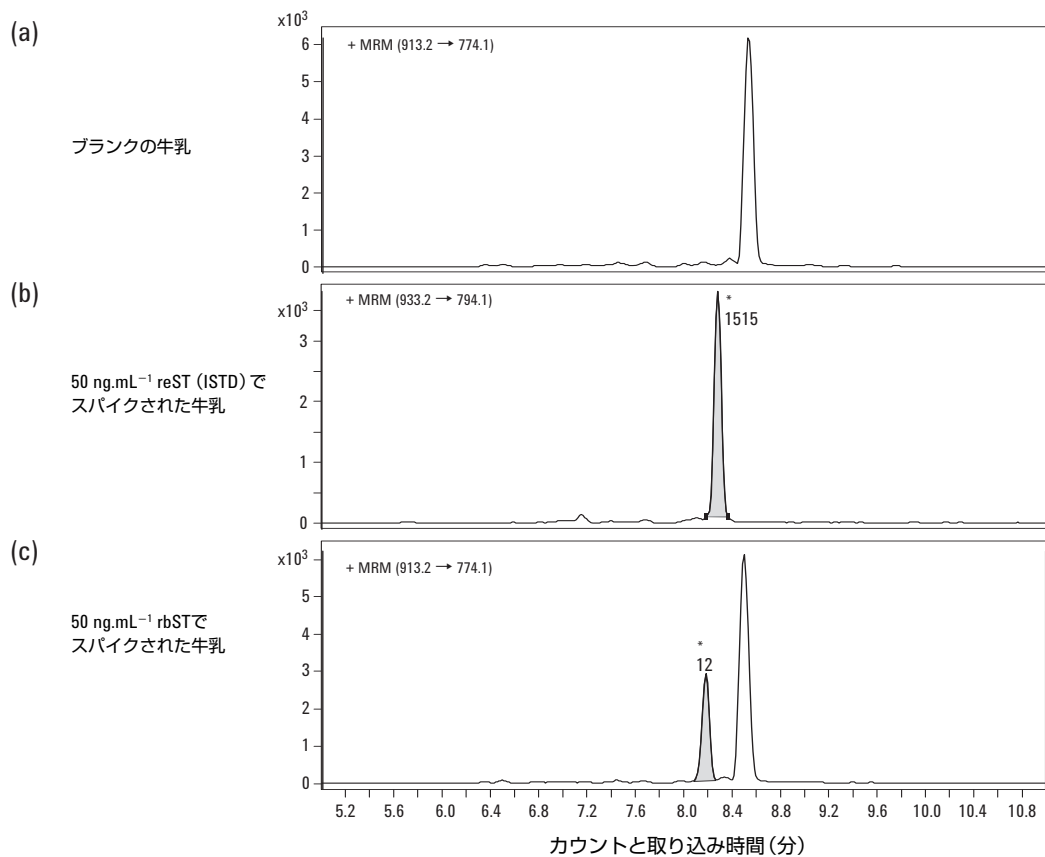


図3. 牛乳サンプルから得られたSRMイオンクロマトグラム。これらのシグナルは、(a)ブランクの牛乳、(b) 50 ng.mL⁻¹ reST (内部標準)をスパイクした同じ牛乳、(c) 50 ng.mL⁻¹ rbSTに対応しています。

どなく、メソッドの選択性が高いことを実証しています。内部標準よりも低いとはいえシグナルの強度が強く、明確なシグナルを示しています。このメソッドで牛乳中のrbSTの同定が可能であることが実証されました。

結論

牛乳中のrbSTをESI(+) LC-MS/MSで検出しました。本法は、非常に優れた感度、選択性、および堅牢性を示しました。メソッドは、2002/657 Council Directiveにまとめられている基準に基づいて、50 ng.mL⁻¹のrbSTをスパイクした牛乳サンプルに適用することができました。

参考文献

1. L. Bailly-Chouriberry, E. Chu-Van, G. Pinel, P. Garcia, M.-A. Popot, G. André-Fontaine, Y. Bonnaire, and B. Le Bizec, *Analyst*, 133 (2008) 270
2. G. Pinel, F. André, and B. Le Bizec (2004) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 407-414
3. M. H. Le Breton, S. Rochereau-Roulet, G. Pinel, L. Bailly-Chouriberry, G. Rychen, S. Jurjanz, T. Goldmann, and B. Le Bizec (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, submitted
4. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. 2002/657/EC, 2002

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
June 24, 2008
5989-8481JAJP