

子牛尿中の 20-ヒドロキシエクジソンとその代謝物の同定のための LC/MS/MS メソッド開発

食肉用家畜に対する乱用規制への応用例

アプリケーション

食品安全

著者

Blandine Destrez, 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, Cedex 3, France

概要

無脊椎動物や植物に存在するステロイドホルモンのエクジステロイドは、タンパク質同化剤として食肉用家畜で使用される可能性があります。牛におけるエクジステロイドの乱用を規制するためには、生物マトリックス中に微量 ($\mu\text{g/L}$) で存在するエクジステロイドを検出できる効率の良いメソッドの開発が求められます。こうした状況を受け、2つの固相抽出カートリッジ(SPE C_{18} およびSPE SiOH)を用いた精製とLC-(ESI+)-MS/MS測定をベースとして、尿サンプル中の20-ヒドロキシエクジソンとその代謝物を検出するための分析手順を開発しました。タンデム四重極MS/MSの感度と選択性により、添加サンプルおよび投与サンプルにおける微量測定が可能になりました。すべての分析対象物について、カラムロード量 $0.12 \text{ ng} \sim 12 \text{ ng}$ で良好な直線性が観察されました。



Agilent Technologies

はじめに

エクジステロイドは、無脊椎動物 (おもに節足動物) と植物 (キク科、ナデシコ科、ウラボシ科) に存在するステロイドホルモンです。また、節足動物ではエクジステロイドは脱皮ホルモンとして機能し、植物においては非適応の植食性昆虫から保護する作用があると考えられています。植物界および動物界の典型的なエクジステロイドは、20-ヒドロキシエクジソン (20E) です。複数の研究では、20E には、ヒトや牛を含む各種動物 (ラット、マウス、ニホンウズラ) における成長促進作用が示唆されています[1-3]。臨床研究では、20E はメタンドロステノロン (ダイアナボル) よりも同化作用が強く、一般的なステロイドで通常観察される男性ホルモン作用などの望ましくない副作用がないことが示されています[4]。しかし、そうした成長促進特性を持つにもかかわらず、生物マトリックス中の 20E を検出する手法は少数しか報告されておらず、牛における 20E 代謝に関する情報はありません[5]。本アプリケーションでは、子牛尿中の微量(ppb レベル) 20E と代謝物を検出および同定できるメソッドの開発について解説します[6]。このメソッドを適用して、20E経口投与後の子牛尿サンプルを分析しました。また、それらの物質の排泄速度の評価にも、このメソッドを使用しました。

実験手法

化合物標準物質

標準参照物質 22S,23S-ホモブラシノライド (植物ステロイドホルモンに属するブラシノステロイド) をSigma-Aldrich社 (France) から入手しました。20-ヒドロキシエクジソン、14-デオキシ20-ヒドロキシエクジソン、20,26-ジヒドロキシエクジソンは、Lafont 教授から厚意による提供を受けました。

サンプル前処理

25 ngの 22S,23S-ホモブラシノライドを内標準 (IS) として子牛尿 5 mL に加え、3,500gで15分間遠心分離したのち、SPE C18で精製しました。C18-SPEカートリッジをメタノール10 mL、水10 mLの順で調製したのち、尿サンプルをカートリッジに加えしました。その後、カラムを水/メタノール (80/20)混合液 6 mL で洗浄し、次いでエクジステロイドをメタノール 10 mL で溶出しました。溶離液を窒素気流下で穏やかに蒸発させ、乾固させました。残渣をエタノール 50 μ L とシクロヘキサン 150 μ L に溶解したのち、あらかじめシクロヘキサン 25 mL で活性化した SPE SiOH にロードしました。相を酢酸エチル/シクロヘキサン (80/20) 6 mL で洗浄し、分析対象化合物をクロロホルム/メタノール/アセトン (6/2/1) の混合液 10 mL で溶出しました。窒素気流下により溶媒を蒸発させ、乾固させたのち、酢酸 0.5%を含むメタノール/水 50 μ L (30/70) に最終抽出物を再溶解しました。この抽出物からとった 10 μ L を HPLC カラムに注入しました。

使用装置

LC :	
カラム :	GEMINI C ₁₈ , Phenomenex (3 μ m, 110 = A50 \times 2 mm)/アジレント製の 同等カラム : ZORBAX Extend-C18 3.5 μ m, 2.1 mm \times 50 mm (部品番号735700-902)
カラム温度 :	40 $^{\circ}$ C
移動相 :	A : MeOH B : 酢酸0.5%を含む水
流量 :	0.3 mL/分
グラジエント :	時間(分) %B 0 90 8 0 10 0 12 90 16 90
注入量 :	10 μ L
MS :	G 6410A トリプル四重極質量分析計
イオン化 :	ESI (+)
フラグメンタ :	120 V
マスレンジ :	100-500 amu
スキャン時間 :	300 ms
キャピラリ :	4000 V
ネブライザ :	35 psi
乾燥ガス :	11 L/min
ガス温度 :	325 $^{\circ}$ C

各分析対象化合物のトランジション結果を表1に記載しています。最初のトランジションがもっとも良好な感度のシグナルに相当します。

結果と考察

実験手法の項で述べた LC/MS/MS パラメータを用いて、目的化合物の標準溶液を分析しました。これにより、20E、M1、M2、IS (それぞれカラムロード量 5 ng) のイオンクロマトグラムが得られました (図1)。すべての化合物が 10 分未満で溶出され、きわめて良好なクロマトグラフィ分離能とピーク形状が得られました。

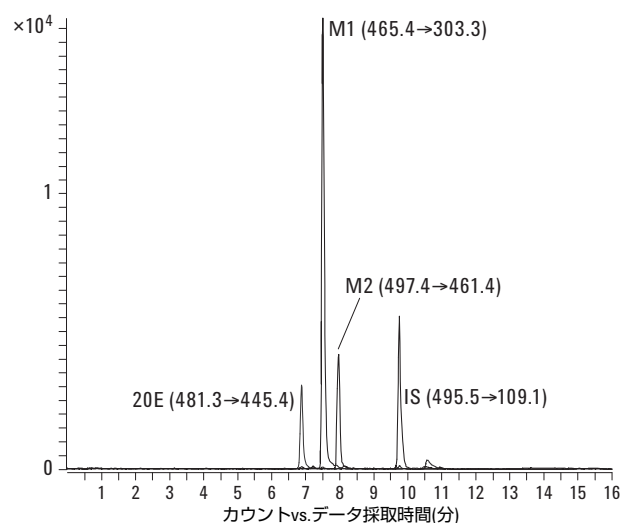


図1. ポジティブイオンモードで得られた20Eおよび代謝物の最大トランジションの抽出イオンクロマトグラム(EIC)の重ね書き

表1. 20E およびおもな尿中代謝物の SRM トランジションと LC/MS/MS (QQQ) 分析に用いたデータ取り込みパラメータ

分析対象	衝突エネルギー		衝突エネルギー		衝突エネルギー		RT (分 ± 0.2)
	トランジション 1 (eV)	トランジション 2 (eV)	トランジション 2 (eV)	トランジション 3 (eV)	トランジション 3 (eV)		
22S,23S-ホモブラシノライド(IS)	495.5→109.1	20	495.5→127.1	10	495.5→459.1	5	9.8
20-ヒドロキシエクジソン	481.3→445.4	10	481.3→371.4	10	481.3→165.1	20	7.5
14-デオキシ, 20-ヒドロキシエクジソン(M1)	465.4→303.3	20	465.4→285.3	25	-	-	7.9
20,26-ジヒドロキシエクジソン(M2)	497.3→461.4	5	497.3→351.1	15	497.3→371.2	20	6.8

メソッドの選択性を評価するために、ブランクの尿サンプルと、20 E(1 µg/L) 添加した尿サンプルを分析しました。図2に示すブランクデータでは、予想される 20E の保持時間で干渉が全く確認されず、モニタリングしたシグナルの選択性が良好であることを示しています。分析対象の 20E は、添加尿サンプルにおいて3つの SRM トランジションで同定されました。モニタリングしたシグナルは良好な感度で検出され、高い S/N 比を示しました。これらの結果は、2002/657/EC 指令で定められた基準を満たしています。この基準では、化合物同定の確認のために、4 つ以上の同定項目が求められています[7]。

メソッドの直線性と再現性を評価するために、異なる濃度で添加した尿サンプルを分析しました。5つの濃度ポイント (0.2、0.5、1、5、20 ng/mL) を用いて検量線を作成しました。検量線の決定係数 (R²)は 0.99 を上回り、20E メソッドの直線性が良好であることが示されました。

4日にわたって 20E を経口投与して得られた子牛尿サンプルにも、このメソッドを問題なく適用することができました。投与後わずか 30 分で 20-ヒドロキシエクジソンが尿中から検出され、最終投与の 24 時間後まで検出されました。20E の代謝作用を調べたところ、2つの主要代謝物14-デオキシ,20-ヒドロキシエクジソン(M1)と 20,26-ジヒドロキシエクジソン(M2)が検出されました[8]。M1とM2はいずれも、LC/MS/MSによりモニターしました(表1)。図3には、20E の投与前と最終投与から 2 日後に得られた尿サンプル中 M1 のイオンクロマトグラムを示しています。

図からもわかるように、M1 は 20E 投与前の尿からは検出されませんでした。投与期間中は 4 日間すべてで検出されました。また、20E の最終投与から 2 日後にも検出および同定されました (基準で求められる4つの同定ポイントをもとにしました)。この結果は、エクジステロイドの乱用管理という観点から見ると、きわめて興味深いものといえます。というのも、投与後の検出期間がきわめて長く、より効率の良い管理メカニズムが可能になるためです。

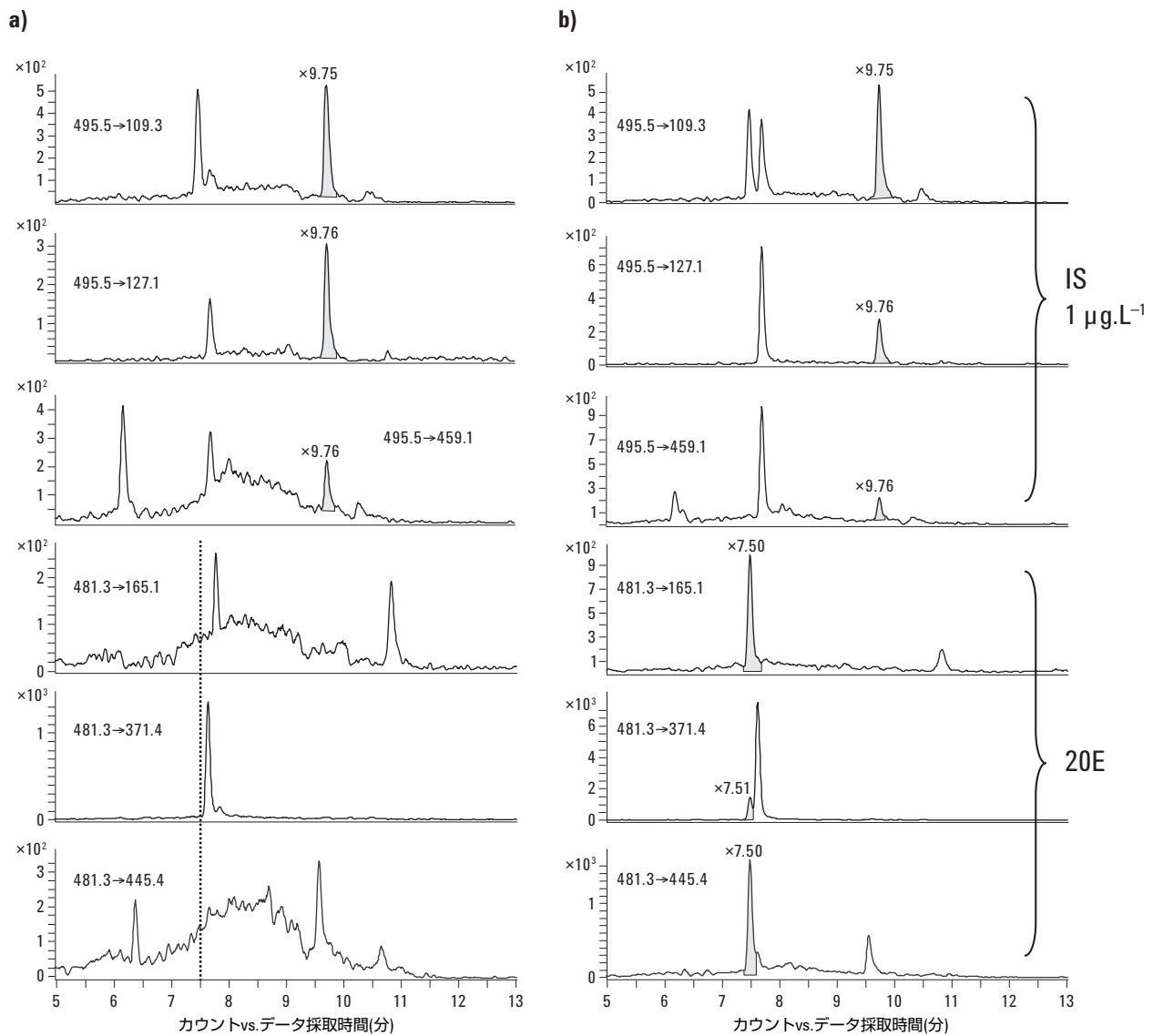


図2. a) ブランク尿サンプルと b) 添加尿サンプル (1 µg/L) の SRM イオンクロマトグラム。LC-(ESI+)-MS/MS により測定。

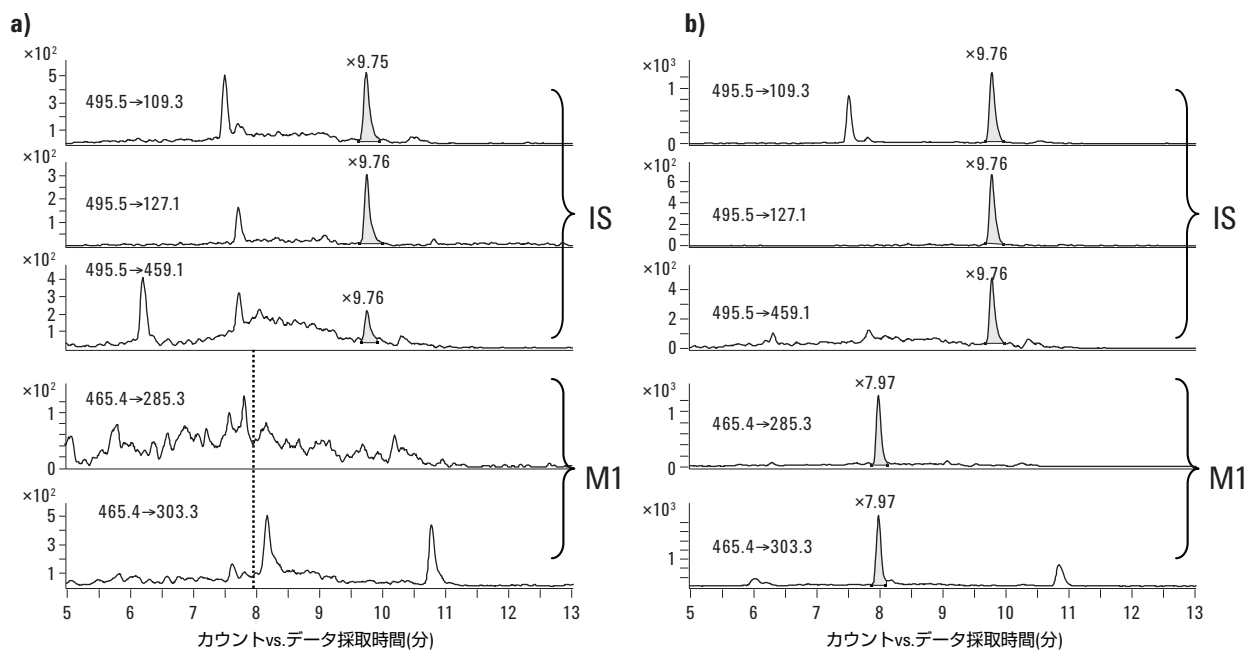


図3. a)20Eの投与前および b) 最終投与から2日後に採取した尿サンプル中のM1 およびISのSRM イオンクロマトグラム。LC-(ESI+)-MS/MSにより測定。

結論

本研究では、子牛尿中に含まれる20Eと主要代謝物の同定におけるLC/MS/MSの性能が示されています。これらの化合物のモニタリングにより、食料生産動物における20Eの乱用を効果的に管理できるようになります。タンデム四重極MS/MSは、この目的に最適な分析テクニックです。タンデム四重極MS/MSを使えば、2002/657/EC指令で定められた基準に従って、目的化合物の同定の信頼性を高めることが可能です。子牛尿サンプルの分析が成功したことは、本アプリケーションで開発したプロトコルの堅牢性を証明しています。この手法を応用すれば、一次排泄速度や子牛尿中の20Eの主要代謝物を測定することも可能です。

参考文献

1. W. J. Burdette and R. C. Richards, "Alteration of the Growth of Mammalian Cells In Vitro by Ecdysone Extract," *Nature*, 189, 666-668, (1961)
2. V. N. Syrov and A. G. Kurmukov, "On the Anabolic Activity of the Phytoecdysone-Ecdysterone Isolated from *Rhaponticum carthamoides*," *Farmakologiya i Toksikologiya*, 39(6), 690—693, (1976)
3. K. Slama, K. Koudela, J. Tenora, and A. Mathova, "Insect Hormones in Vertebrates: Anabolic Effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese Quail," *Experientia*, 52 (7): 702—6, (1996)
4. N. S. Chermnykh, N. L. Shimanovskii, G. V. Shutko and V. N. Syrov, "The Action of Methandrostenolone and Ecdysterone on the Physical Endurance of Animals and on Protein Metabolism in the Skeletal Muscles," *Farmakologiya i Toksikologiya*, 51, 57—60, (1988)
5. B. Le Bizec, J. P. Antignac, F. Monteau, and F. Andre, "Ecdysteroids: One Potential New Anabolic Family in Breeding Animals," *Analytica Chimica Acta*, 473, 89—97, (2002)

6. B. Destrez, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, R. Lafont, and B. Le Bizec, "Detection of 20-Hydroxyecdysone in Calf Urine by Comparative LC-HRMS and LC-MS/MS Measurements, Application to the Control of Their Potential Misuse," *Rapid Com. Mass Spectrom.*, submitted 2008
7. 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
8. B. Destrez, G. Pinel, F. Monteau, R. Lafont, and B. Le Bizec, "Detection and Identification of 20-Hydroxyecdysone Metabolites in Calf Urine by LC-HRMSn Measurements and Establishment of Their Kinetics of Elimination After 20E Administration," *Anal. Chim. Acta*, submitted June 2008

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。

www.agilent.com/chem/jp

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
September 9, 2008
5989-8879JAJP



Agilent Technologies