

高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS)による牛乳中のテトラサイクリン系抗生物質とその代謝物の定量

アプリケーションノート

食品

著者

Yanyan Fang, Hao Zhai, and Yun Zou
Agilent Technologies (Shanghai), Co.
412 Yin Lun Road 200131
China

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

概要

テトラサイクリン系抗生物質は、畜産業で最も使用頻度の高い抗生物質です。本アプリケーションノートでは、牛乳および動物組織中に残留したテトラサイクリン系抗生物質を同時に定量する高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (HPLC /MS/MS) メソッドを開発しました。定量の対象となる抗生物質は、ミノサイクリン、4 エピオキシテトラサイクリン、4 エピテトラサイクリン、テトラサイクリン、4 エピクロルテトラサイクリン、デメクロサイクリン、クロルテトラサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、オキシテトラサイクリンの 10 種類です。このメソッドでは、精製および分離にアジレントの新しい固相抽出カートリッジと Agilent ZORBAX RX C8 逆相カラム (5 μ m, 150 mm \times 2.1 mm) を使用しました。検出限界 (LOD) は 0.5 ~ 10.0 μ g/kg の範囲になり、定量限界 (LOQ) は 50 μ g/kg 未満でした。直線性は 5 ~ 1000 μ g/kg の範囲で得られました。全体の回収率は 76.4 % ~ 101 % の範囲になり、相対標準偏差 (RSD, n = 6) は 8.4 % 未満でした。このメソッドは、高速で感度に優れた簡便かつ堅牢なメソッドであり、牛乳に残留している複数のテトラサイクリン系抗生物質とその代謝産物の同時分析が可能でした。



Agilent Technologies

はじめに

抗生物質は、乳牛の感染症予防と健康増進のために世界中で使用されています。テトラサイクリン系化合物は、広域抗生物質であることから、広く使用されています。しかし、こうした物質が乳製品に残留することは望ましくありません。

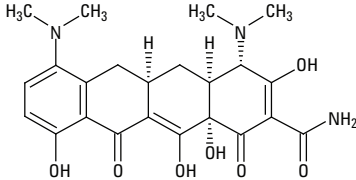
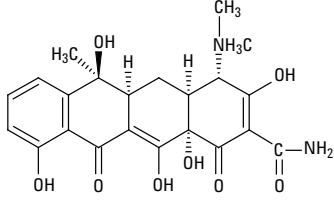
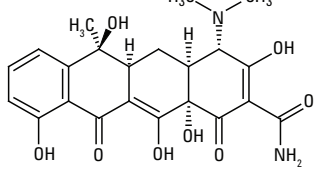
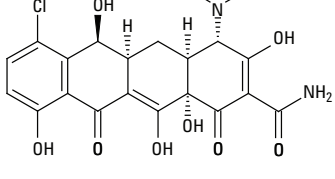
オキシテトラサイクリンやクロルテトラサイクリンをはじめとしたテトラサイクリン系化合物に関しては FDA の規制が設けられ、1 日当たりの許容摂取量 (ADI) および牛乳中の許容残留量が規定されています。こうした化合物の総残留量に関する ADI は、体重 1 キログラムにつき 1 日当たり 25 マイクログラムです。ADI の 60 % は牛乳からの摂取を見込んだもので、40 % は食肉からの摂取を見込んだものです。この ADI 値に基づいて、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリンといったテトラサイクリン系化合物の牛乳中の総残留量に関しては 300 ppb という許容量が設定されています。テト

ラサイクリン系化合物の総残留量について 300 ppb という許容量が確立された結果、上記 3 種のテトラサイクリン系抗生物質についても 300 ppb までの残留が許容されます。

欧州 (EU) では、抗生物質の最大残留限度 (MRL) が (EEC) 2377/90 に基づいて制定され、牛乳中のテトラサイクリン系化合物の MRL は 100 µg/kg (100 ppb) と定められています。中国の国家基準 (GB/T 21317-2007) でも、牛乳と動物組織に残留するテトラサイクリン系化合物の定量手順が定められています。この規制は 2008 年 4 月 1 日付けで発効されました。

本実験の目的は、Agilent 6410 LC/MS/MS システムで牛乳に残留しているテトラサイクリン系化合物とその代謝産物の定量メソッドを開発することです。このメソッドは迅速で簡便なメソッドです。テトラサイクリン系化合物とその代謝産物を表 1 に示します。

表 1. 本調査の対象となる化合物

番号	化合物名	CAS 番号	構造式
1	ミノサイクリン	10118-90-8	
2	オキシテトラサイクリン	6153-64-6	
3	テトラサイクリン	60-54-8	
4	デメクロサイクリン	127-33-3	

(続く)

表 1. 本調査の対象となる化合物

番号	化合物名	CAS 番号	構造式
5	クロルテトラサイクリン	57-62-5	
6	メタサイクリン	914-00-1	
7	ドキシサイクリン	564-25-0	
8	4 エピテトラサイクリン	64-75-5	
9	4 エピオキシテトラサイクリン	35259-39-3	
10	4 エピクロルテトラサイクリン	14297-93-9	

実験

試薬および化学物質類

水とメタノールは HPLC グレードのものを使用し、ギ酸と共に Fluka 社から購入しました。標準溶液類は Sigma-Aldrich 社から購入しました。

分析条件設定

表 2. LC/MS/MS の条件

HPLC システム

カラム	ZORBAX RX-C8、2.1 mm x 150 mm、5 μm (部品番号 883700-906)
流量	0.3 mL/min
移動相	A:0.1 % のギ酸水溶液 B:メタノール
グラジエント	0 ~ 10 min、移動相 B、5 % ~ 30 % 10 ~ 12 min、移動相 B、30 % ~ 40 % 12.5 ~ 18 min、移動相 B、65 % 18.5 ~ 25 min、移動相 B、95 % 25.5 min、移動相 B、5.0 %
トータル分析時間	28 min
ポストタイム	5 min
温度	30 °C
注入量	5 μL

MS のイオン源設定

イオン源	ESI
極性	ポジティブ
乾燥ガス温度	350 °C
乾燥ガス流量	10 L/min
ネブライザー	45 psi
キャピラリー電圧	4000V

マルチブルリアクションモニタリング (MRM) の設定

化合物名	フラグメンター電圧	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE	リテンションタイム (分)
ミノサイクリン	120	458	352 441	35 20	8.58
4 エピテトラサイクリン	120	445	410 427	20 10	8.60
4 エピオキシテトラサイクリン	120	461	426 444	20 15	9.47
テトラサイクリン	120	445	410 427	20 15	9.90
オキシテトラサイクリン	120	461	426 443	20 10	9.95
デメチルクロサイクリン	120	465	430 448	25 15	11.25
4 エピクロルテトラサイクリン	120	479	444 462	22 15	11.59
クロルテトラサイクリン	120	479	444 462	22 15	12.95
メタサイクリン	120	443	381 426	25 15	13.98
ドキシサイクリン	120	445	154 428	30 15	14.08

サンプル調製

抽出手順:

1. 牛乳サンプルを (0.01 g の精度で計量) 5 g 計量して 50-mL の比色管に移し、0.1 mol/L の Na₂EDTA Mcllvaine 緩衝液で希釈して 50 mL の量にします。
2. 1 分間攪拌し、氷を入れた水槽の中で抽出液を 10 分間超音波振盪器にかけます。
3. サンプルを 50 mL のポリプロピレン遠心分離管に移し、0 °C ~ 4 °C まで冷却します。
4. サンプルを 5000 rpm の速度で 10 分間 (15 °C 未満の温度で) 遠心分離します。
5. ろ過します。

精製手順:

1. 抽出液を 10 mL (サンプル 1 g に相当する量) を正確に計り、SampliQ OPT カートリッジ (部品番号 5982-3036) に毎秒 1 滴の速度で注入 (滴下) します。
2. サンプルを完全に溶出させたのち、トリフルオロ酢酸で pH 4.5 に調整した 3 mL の水でカートリッジを洗浄してから溶出物をすべて破棄します。
3. 2.0 kPa 未満の陰圧でカートリッジを 5 分間乾かします。
4. シュウ酸 10 mmol を含んだメタノール溶液 10 mL で溶出します。
5. 溶出液を捕集し、40 °C 未満の窒素で乾固します。
6. 乾燥後の残さを 1.0 mL の初期移動相で溶解します。
7. 0.45 μm のフィルタでろ過したものをカラムに注入します。

結果と考察

最適化と分離

フラグメンター電圧とコリジョンエネルギー (CE) の最適化

周知の通り、食品マトリックスの中にある分析対象物の同定および定量には LC/MS/MS トリプル四重極システムが最適な機器です。最良のレスポンスを引き出すためには、ターゲット化合物に合わせて 2 つパラメータ、つまり、フラグメンター電圧とコリジョンエネルギーを最適化する必要があります。正しいフラグメンター電圧を設定することで、プリカーサイオンを質量分析計へ高いトランスミッション効率で送ることができます。また、正しいコリジョンエネルギーを設定することで、定量に利用可能なクォリファイアイオンが効率良く生成されます。

1 回の分析を複数のセグメントに分け、セグメントごとにフラグメンター電圧の設定を変えながらサンプルをインジェクションしてゆくという最適化の手法があります。このような最適化をミノサイクリンについて行った結果を図 1 に示します。この化合物の場合、フラグメンター電圧の上昇に伴い、検出感度が若干向上しました。コリジョンエネルギーも同じ手法で最適化しました。テトラサイクリンについての最適化の結果を図 2 に示します。

最近、アジレントでは "オブティマイザー" という自動最適化プログラムを導入しました。オブティマイザーは、最適なフラグメンター電圧およびコリジョンエネルギーを自動的に決定し、その結果をオブティマイザーデータベースに保存するプログラムです。ユーザーは、この自動最適化プログラムと (カラムあり、またはカラムなしの) フローインジェクションを使用することにより、まず、最適化したい化合物とその分子式を入力します。すると、その分子式から化合物の整数質量値が自動的に計算されます。次に、ポジティブ/ネガティブモードで予想される付加イオン、低質量カットオフ、除外するイオン、および使用するメソッド (移動相の条件など) を指定します。オブティマイザーを起動すると、このプログラムは、サンプルを注

入し、プリカーサイオンを決定した上で、1 回の注入でフラグメンター電圧を所定の増加幅 (ユーザー指定値) に従って徐々に上げてゆくという方法でフラグメンター電圧を最適化します。これにより、オブティマイザーは、プリカーサイオンの強度が最大になる電圧を選択します。こうした最適化をテトラサイクリンについて実行した結果を図 3 に示します。

その後、オブティマイザーは、同じサンプルの 2 度目の注入でプロダクトイオンをスキャンし、最も優勢なプロダクトイオンを 4 つ選び出します。同じサンプルを再度注入し、ユーザーの指定した電圧範囲内で徐々にコリジョンエネルギーを上げながらそれぞれのイオンのマルチブルリアクションモニタリング (MRM) を実行します。各プロダクトイオンについて最大のイオン強度を生じるコリジョンエネルギーが自動的に決定され、また、そのデータはオブティマイザーデータベースに保存することも可能となります。こうしたコリジョンエネルギー最適化をテトラサイクリンについて実行した結果を図 4 に示し、そのイオン強度の変動曲線を図 5 に示します。化合物とプロダクトイオンの情報は、ユーザーの取り込みメソッドへ直接インポートできます。

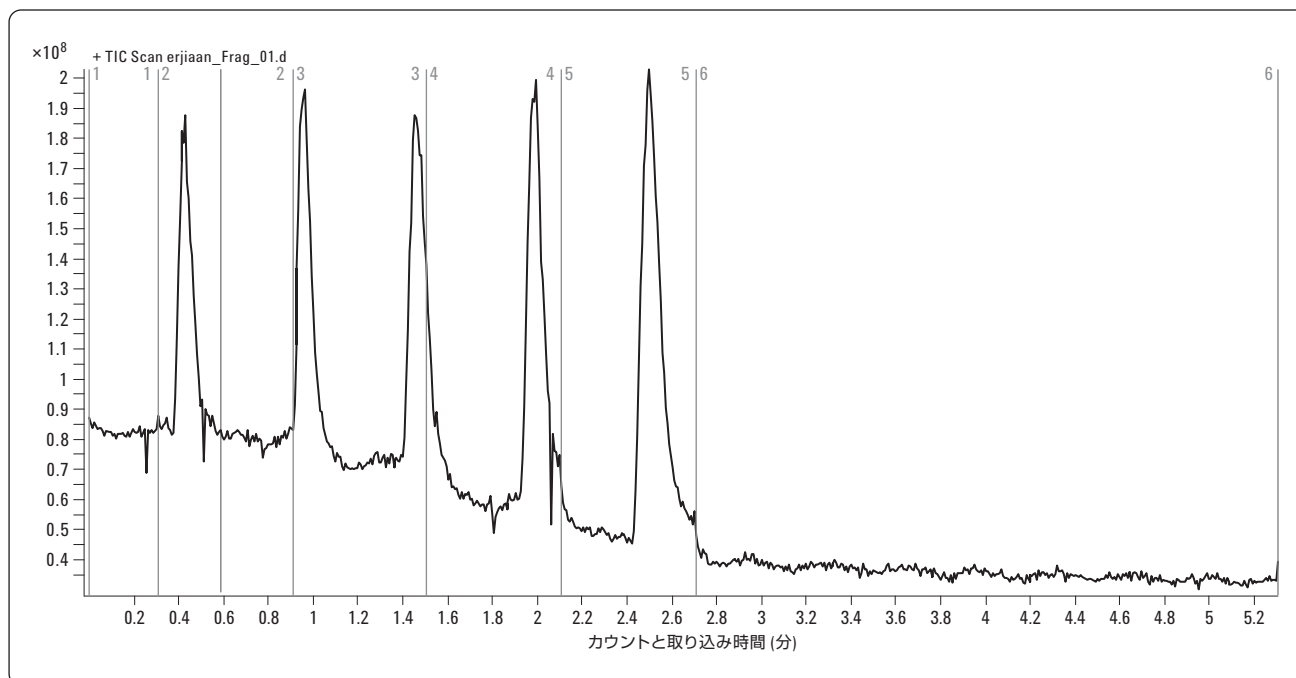


図 1. ミノサイクリンに関するフラグメンター電圧の最適化 (60 ~ 160 V の電圧範囲で 20 V ずつ増加)

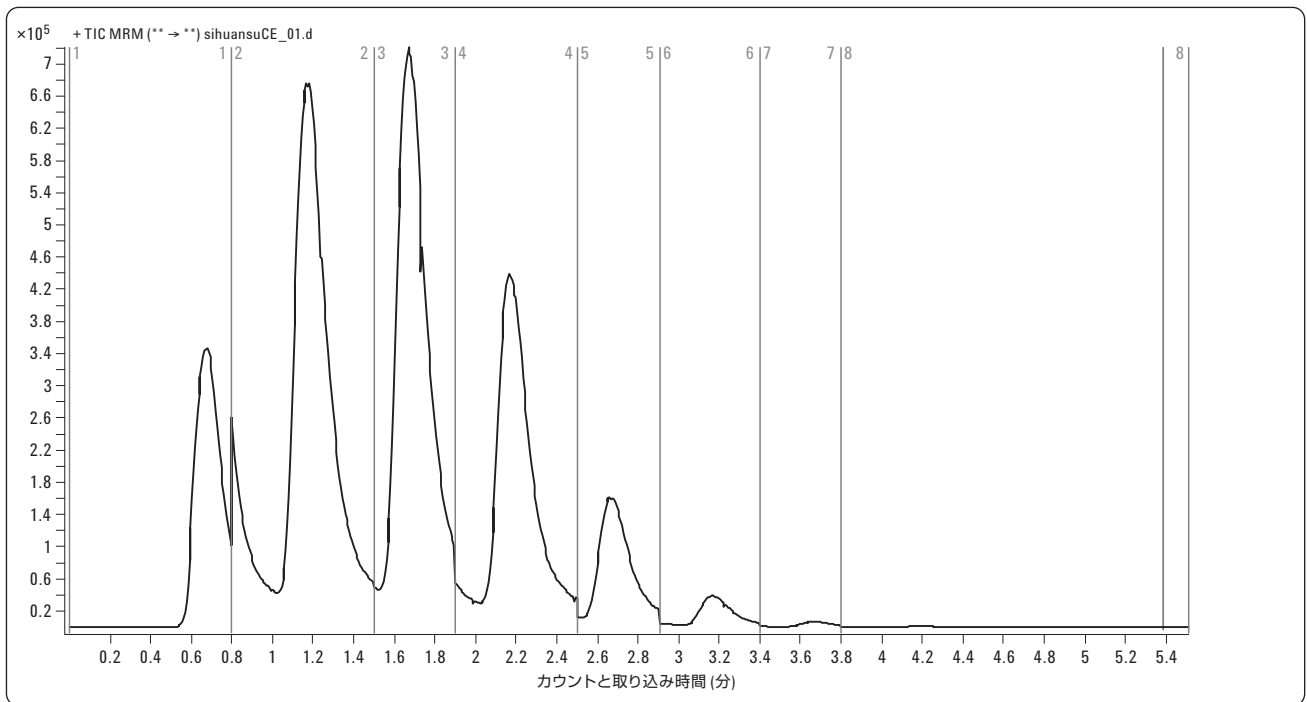


図 2. テトラサイクリンに関するマニュアルによるコリジョンエネルギーの最適化

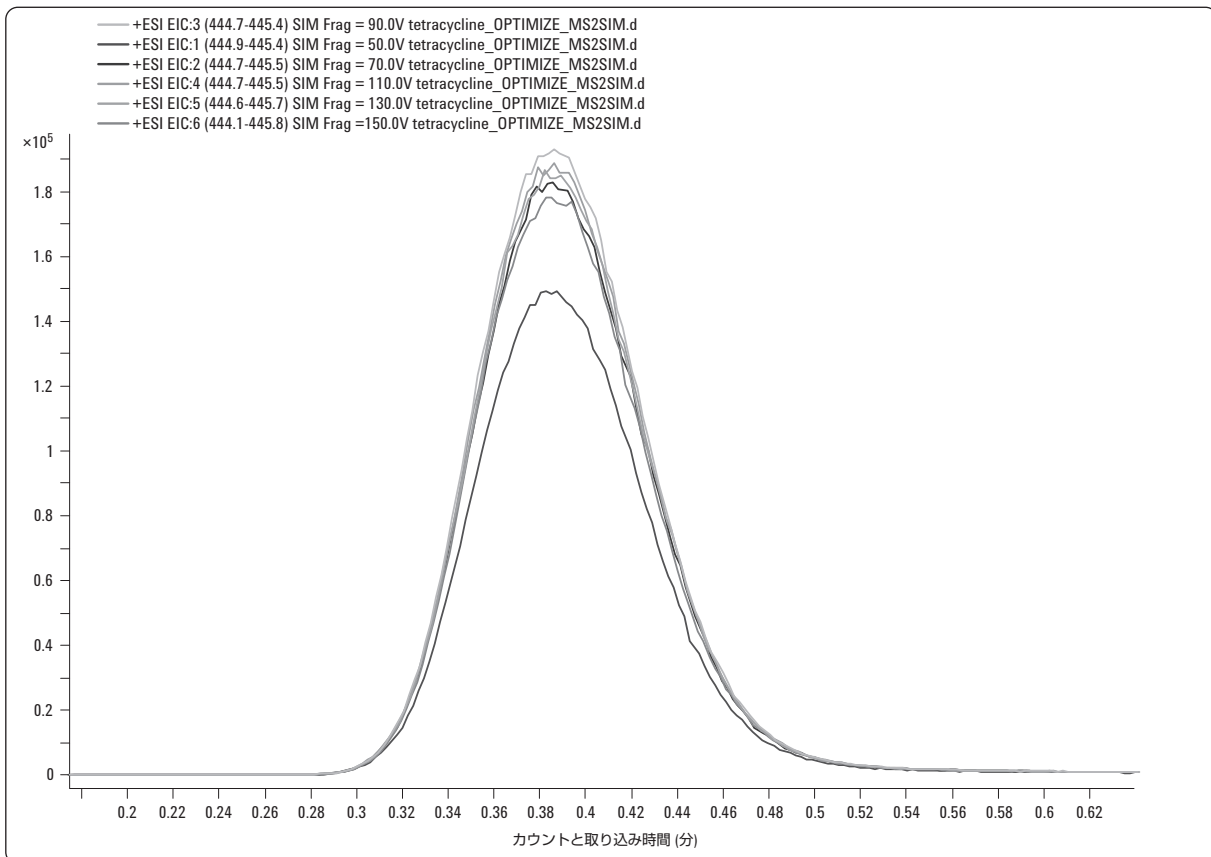


図 3. オプティマイザーを使用したテトラサイクリンに関するフラグメンター電圧の最適化

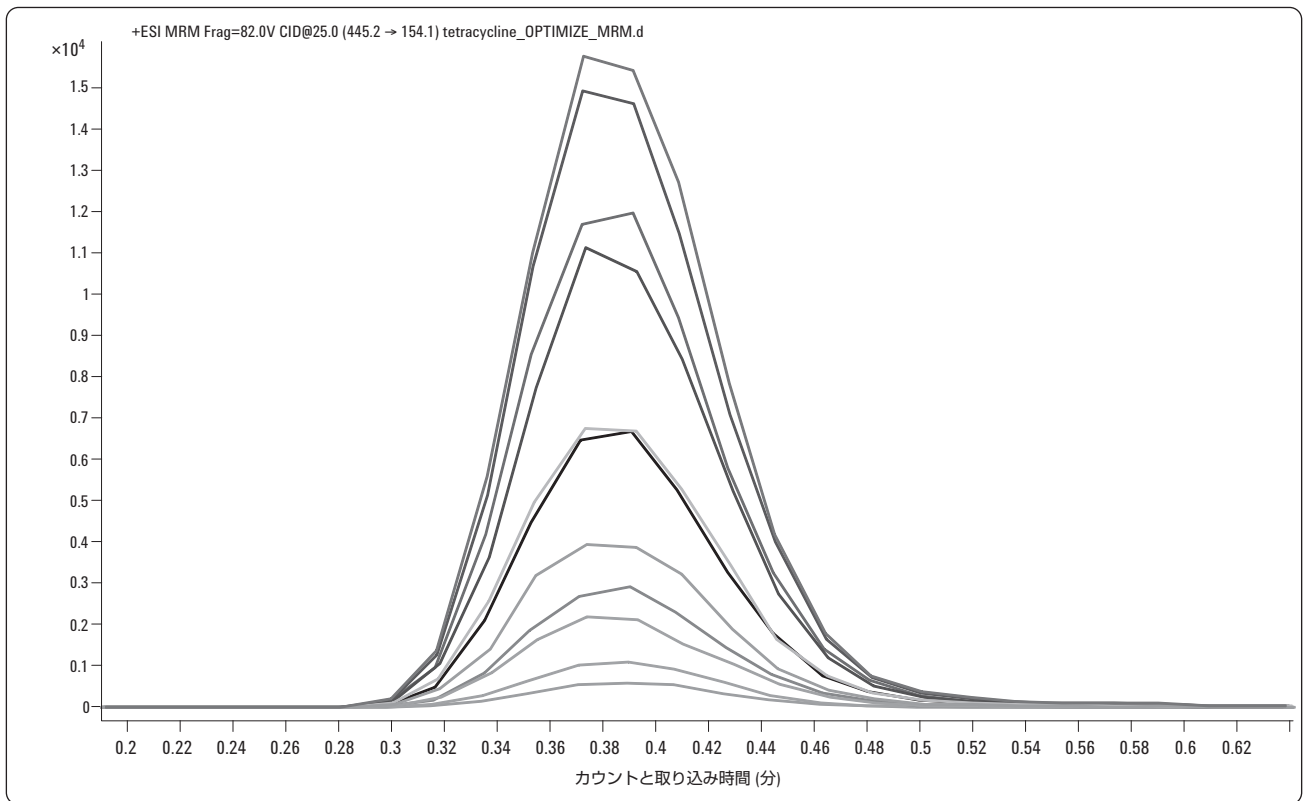


図 4. オプティマイザーを使用したテトラサイクリンに関するコリジョンエネルギーの最適化

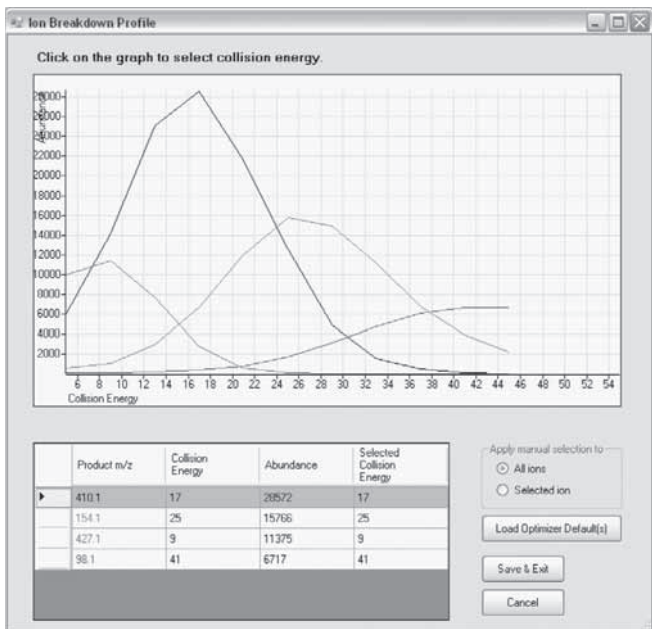


図 5. テトラサイクリンに関するイオン強度の変動プロフィール (オプティマイザーによる判定結果)

分離

テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、およびオキシテトラサイクリンのサンプル調製と分離は重要です。この種の化合物を分離する際の問題は、弱酸、強酸、強塩基、および加熱条件下で劣化しやすい物質で、ジアステレオマーがジアゾ化されたエピマーに変化するという点にあります。テトラサイクリンの典型的な劣化プロセスを以下に示します。

テトラサイクリンの典型的な劣化プロセスを以下に示します。

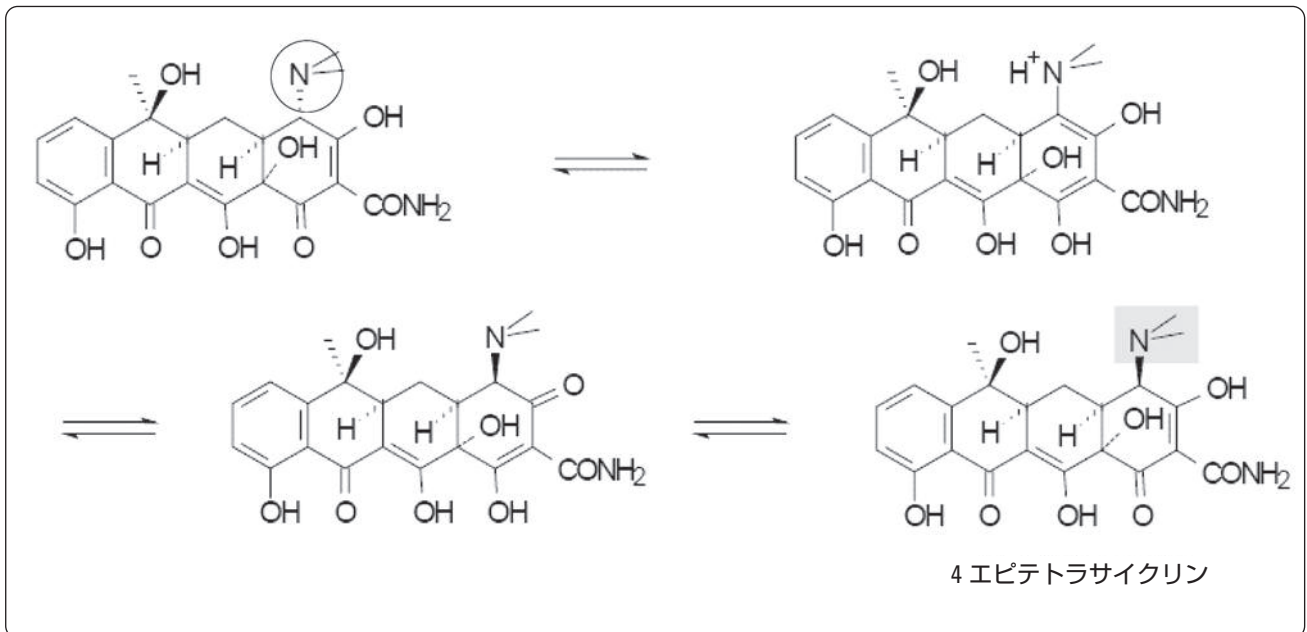


図 6. テトラサイクリンから 4 エピテトラサイクリンへの劣化

テトラサイクリンとその劣化物は同じ化学式を持つジアステレオマーであるため、MS/MS では同じフラグメントイオンが形成されます。したがって、プリカーサイオン、定性イオン、定量イオンも同じです。こうした化合物の同定/定性を高速分離液体クロマトグラフィー (RRLC) システムで行うときには、十分に分離できるかどうか重要です。Agilent ZORBAX Rx-C8、2.1 mm × 150 mm、粒径 5- μ m のカラムと単純なグラジェントを使用することにより、これらの化合物の 3 組のエピマーが十分に分離されます。分離の結果を、リテンションタイムと併記して表 2 に示します。図 7 は、テトラサイクリンとそのエピマーの分離に関するクロマトグラムです。

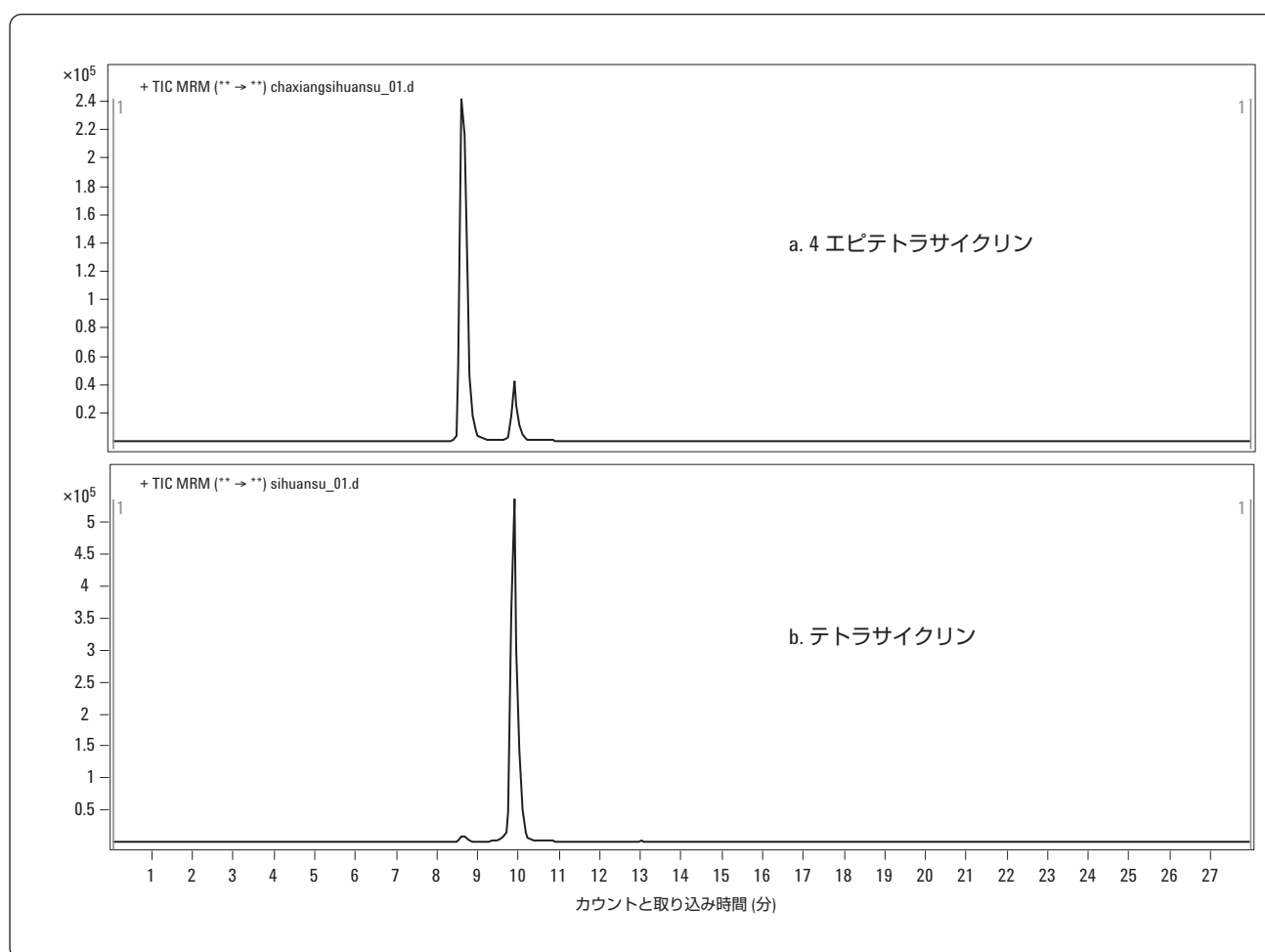


図 7. テトラサイクリンとその劣化物 (4 エピテトラサイクリン) との分離

直線性、検出限界 (LOD)、定量限界 (LOQ)

直線性、検出限界 (LOD)、および定量限界 (LOQ) は、試料溶媒 (校正用の標準溶液) と牛乳マトリックス中の両方について評価しました。評価結果を表 3 に示します。溶媒中および牛乳マトリックス中でも類似した直線性が観察され、決定係数はおおむね 0.99 以上を示しました。エレクトロスプレーではテトラサイ

クリン系化合物が十分にイオン化されないにもかかわらず、検出限界 (LOD) は、10 種類のどの化合物についても (オンカラム量で) 低ピコグラムのレベルが維持されています。定量限界は、通常、シグナル/ノイズ (S/N) 比で 10:1 で評価しますが、本検討では、これを倍のレベルに引き上げ、定量限界としました。ミノサイクリンに関する検量線を図 8 に示します。

表 3. 溶媒と牛乳マトリックスからのテトラサイクリンの定量結果

化合物名	試料溶媒中*			牛乳マトリックス中*	
	R ²	LOQ (S/N=20) pg の オンカラム量	LOD (S/N=3) pg の オンカラム量	R ²	LOD (S/N=3) pg の オンカラム量
ミノサイクリン	0.999	41.5	6.2	0.990	16.3
4 エピテトラサイクリン	0.991	10.8	1.6	0.994	8.7
4 エピオキシテトラサイクリン	0.996	14.7	2.2	0.996	12.8
テトラサイクリン	0.998	9.4	1.4	0.994	10.2
オキシテトラサイクリン	0.996	10.7	1.6	0.991	8.6
デメチルクロサイクリン	0.999	22.8	3.4	0.993	8.1
4 エピクロルテトラサイクリン	0.986	38.2	5.7	0.987	11.9
クロルテトラサイクリン	0.986	8.1	1.2	0.994	7.6
メタサイクリン	0.999	20.8	3.1	0.994	12.3
ドキシサイクリン	0.999	32.2	4.8	0.995	11.2

注* 検量線は、5 uL の注入量で 1 ppb ~ 1 ppm の範囲

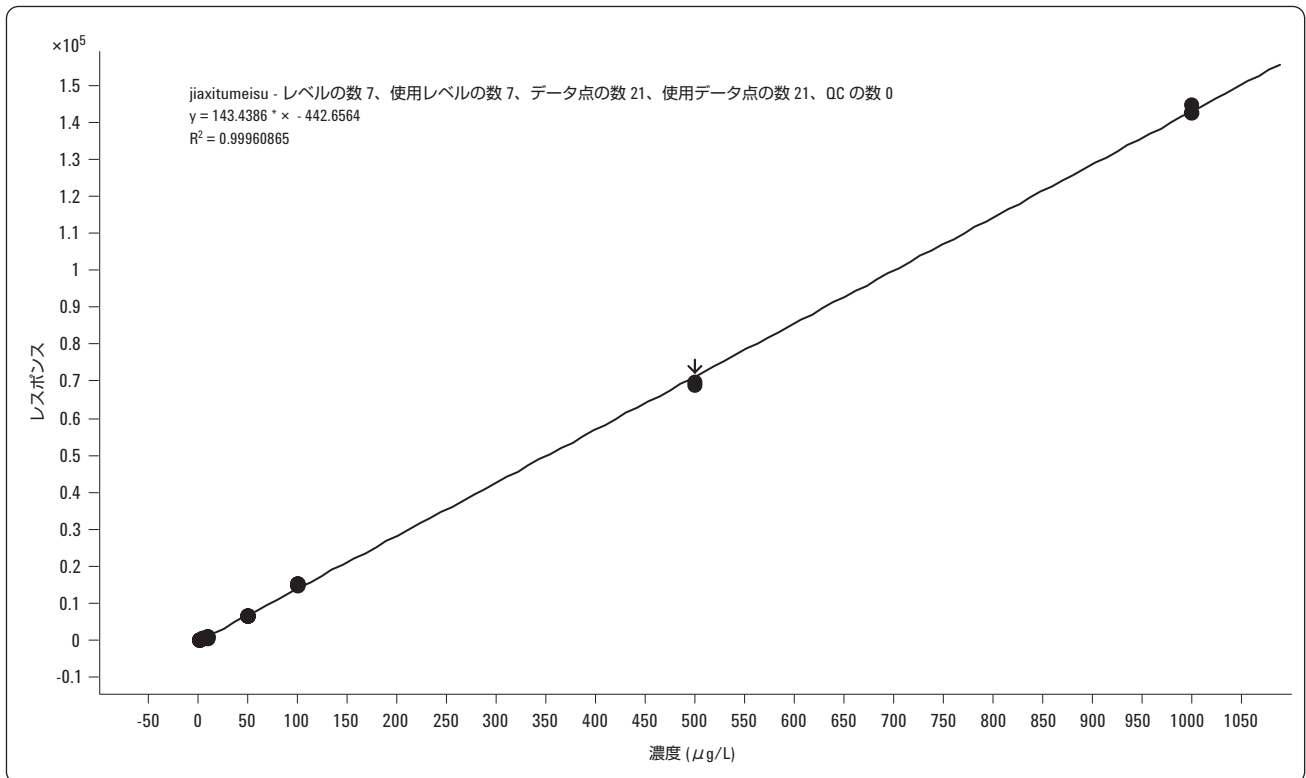


図 8. 1 ppb から 1000 ppb までのテトラサイクリンの検量線

回収率と再現性

このメソッドの回収率と再現性に関する評価の結果を表 4 に示します。すべての回収率が、一般に十分とされる 80 % という値を超えていました。さらに、精度は、表に示した通り、低い濃度で 5 % あるいはそれより良好、高い濃度で 2 % 未満になり

ます。性能を判定する際にはイオン比 (定量用イオンと定性用 (クオリファイアイオン) の比率) を確認しておくことが極めて重要です。表 4 の結果を見ると、優れた再現性のあることが分かります。ミノサイクリンに関するそれらのイオン比のグラフを図 9 に示します。イオン比とリテンションタイムの一致は定性作業に必要な情報です。

表 4. 牛乳マトリックスでの回収率と再現性

化合物名	牛乳マトリックスでの回収率 (濃度 50 ppbn=6)	RSD % (シグナルレスポンス n=6)	RSD % (イオン比 n=6)	牛乳マトリックスでの回収率 (濃度 100 ppbn=6)	RSD % (シグナルレスポンス n=6)	RSD % (イオン比 n=6)
ミノサイクリン	96.5	4.9	2.1	101.4	1.6	1.0
4 エピテトラサイクリン	89.2	3.8	1.5	96.3	1.6	0.9
4 エピテトラサイクリン	84.4	5.4	1.3	88.2	0.9	0.6
テトラサイクリン	86.1	2.5	1.2	90.7	1.1	1.2
オキシテトラサイクリン	77.6	3.8	1.6	82.5	1.2	0.9
デメチルクロサイクリン	79.2	2.0	3.1	84.7	0.9	0.6
4 エピクロルテトラサイクリン	76.4	5.5	5.4	84.3	1.1	0.5
クロルテトラサイクリン	94.3	4.5	1.5	100.9	1.8	1.1
メタサイクリン	86.3	1.0	1.9	91.2	1.2	0.8
ドキシサイクリン	78.7	3.6	6.7	82.4	1.0	0.8

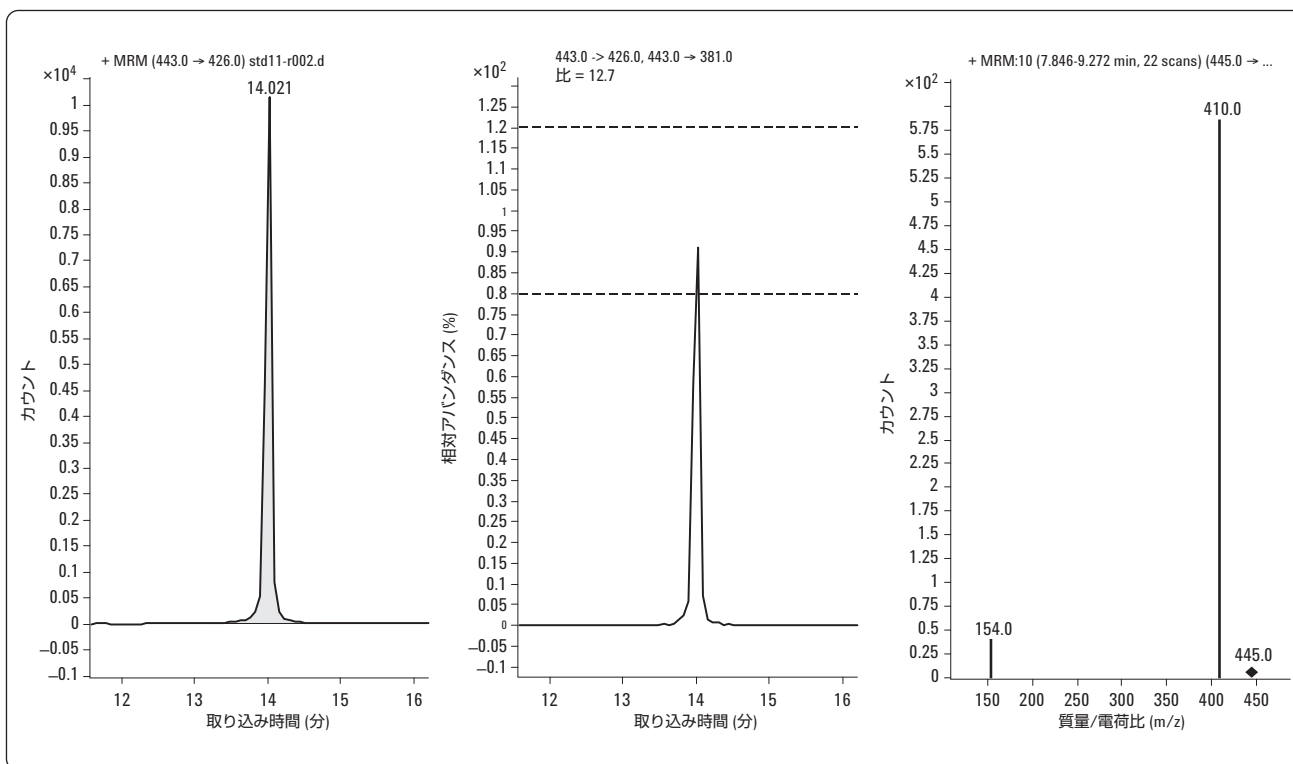


図 9. メタサイクリンのクオリファイアイオンと定量イオンのイオン比

イオン抑制について

一般的に、タンデム MS (MS/MS) は、化学的ノイズを除去して、汚れた複雑な食品マトリックスの中からも「きれいな」スペクトルを引き出せます。しかし、マトリックスには分析対象物のイオン化を抑制する成分が含まれている場合もあります。図 10 は、溶媒の中にあるときと牛乳の中にあるときのメタサイクリンとテトラサイクリンのレスポンスを比較したものです。牛乳マトリックスの抑制効果がそれぞれの曲線の傾きの差となって現れています。

強力な抑制効果が観察されたため、外部標準メソッド (ESTD) を使用して検量線を出す場合には、抗生物質を一切含まない牛乳 (つまり、分析対象物の含有率がゼロであることを判明している牛乳) を使用して、マトリックスの一致した標準溶液を調製する必要があります。こうした方法により、マトリックスの影響を牛乳サンプルと同じ条件にして検量線を出しました。

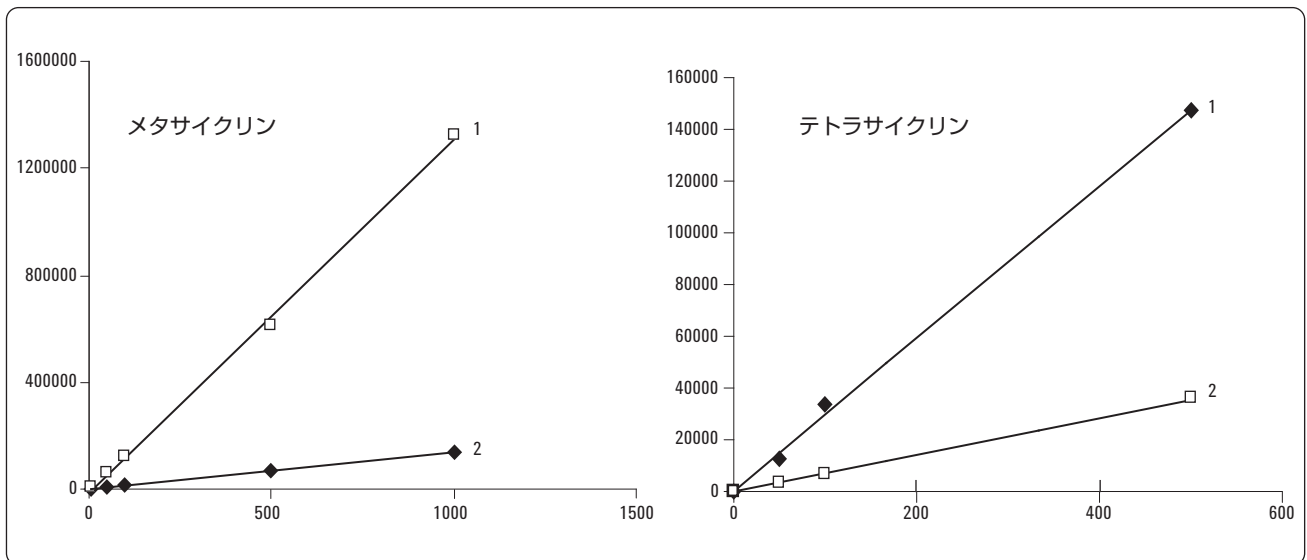


図 10. 牛乳に含まれる 2 つのテトラサイクリン系化合物のイオン抑制。
1) マトリックスなし (試料溶媒) のレスポンス、2) 牛乳の中にあるときのレスポンス

結論

本実験の結果から、Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS システムは、牛乳マトリックス中の残留テトラサイクリン系化合物を検査するための機器として、堅牢性、感度、および再現性の点で優れたシステムであることが判明しました。中国では、国家基準 (GB/T 21317-2007) により、100 μ L の注入量で 50 ppb という検出限界が要求されています。このメソッドはこうした要件を難なくクリアします。また、テトラサイクリン系の抗生物質は弱酸や塩基などの条件下ですぐに劣化する化合物でもありません。本実験で使用した調製メソッドは、こうした劣化反応を回避し、LC メソッドによる各化合物の異性体の分離を可能にして信頼性の高い定性および定量を実現するものです。最後に、この LC/MS/MS メソッドでは、牛乳サンプルと同じマトリックスの中にあるときの各化合物のレスポンスと、溶媒 (較正用の標準溶液) の中にあるときのレスポンスを比較する際に、イオン抑制の影響を考慮しています。サンプル調製の回収率は 80% を超える値と測定されていますが、ESTD メソッドを使用する場合、正確な結果を得るためには、マトリックスの一致した標準溶液を使用して検量線を出す必要があります。

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., 2009
Published in Japan
April 9, 2009
5990-3816JAJP



Agilent Technologies