



# ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) に残留する抗生物質の LC/MS/MS 一斉分析

## アプリケーションノート

食品試験・農業

### 著者

Sérgio Henrique Monteiro  
Instituto Biológico,  
São Paulo, Brazil  
Valdemar Luiz Tornisielo and Jeane  
Gisele Francisco  
CENA/USP,  
Piracicaba, Brazil

### 概要

ナイルティラピア (*Oreochromis niloticus*) の筋肉に含まれる、異なる抗生剤クラスに属する 11 種類の薬剤 (クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、スルファジメトキシム、スルファチアゾール、スルファメタジン、エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、サラフロキサシン) の同時評価用にメソッドを開発し、バリデーションしました。サンプル前処理工程では、5 g の魚筋肉、1 mL の 0.1 M  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、および 24 mL のアセトニトリル:水 (0.1 % ギ酸) (70:30) を使用した抽出と、Captiva カートリッジを使用した精製を行いました。化合物は 1 回の分析で測定しました。定量下限 (LOQ) はすべての化合物で 4.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  未満であり、回収率の範囲は 83.8~110.1 %、真度は 5.5 % 未満でした。



Agilent Technologies

## はじめに

世界の水産養殖の年間成長率は約 9 % です [1]。ブラジルでは、2007 年から 2009 年の間に水産養殖の生産成長率だけで 60.2 % に達しました。ティラピアの生産量は 7 年間 (2003~2009 年) に 105 % 増加しました [2]。この結果、水産養殖システムは化学薬品の使用にますます依存するようになりました。高い飼養密度が必要なため、生物は常にストレスにさらされることになります。これが、特に抗生剤などの化学薬品の需要を高めています。ただし、EU や米国などの輸入国では、残留抗生剤についてますます厳しい制限を課しています。

濫用の結果、動物由来の製品に含まれる残留抗生剤は消費者にとっての懸念事項となっています。これらの残留抗生剤が毒性を示すことや、一部の過敏な人にアレルギー反応を引き起こすことがあります。さらに、食物に含まれる少量の抗生剤を長期間摂取し続けると、薬物耐性菌の拡散につながることがあります。

この実験では、Captiva カートリッジによる化学ろ過と ESI LC/MS/MS を使用した迅速なメソッドについて説明します。Captiva カートリッジ (p/n A5300002) の主な利点は、沈殿したタンパク質や粒状物質を効率的かつ簡単に除去できる点です。

信頼性の高い結果を得るために、重水素化スルファジメトキシシンド6 を内部標準として使用しました。開発したメソッドは、欧州連合委員会の決定 2002/657/EC に従い、選択性、直線性、真度、マトリックス効果、精度、および感度の点から完全にバリデーションされています [3]。



## 実験方法

### 化学薬品

使用した溶媒は、HPLC グレードのメタノールおよびアセトニトリルです (Tedia)。使用した試薬は、いずれも分析グレードのギ酸 (Vetec) および Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich) です。使用した水は Milli-Q システム (Millipore USA) で精製したものです。分析標準のオキシテトラサイクリン 97 % (OTC)、テトラサイクリン 97.5 % (TC)、クロルテトラサイクリン 93 % (CTC)、シプロフロキサシン 99.5 % (CFX)、エンロフロキサシン 99.0 % (EFX)、サラフロキサシン 97.2 % (SAR)、スルファチアゾール 98.0 % (STZ)、ノルフロキサシン 99 % (NFX)、および内部標準のスルファジメトキシナ-d6 99.4 % は Fluka Analytical から購入しました。スルファジメトキシシン (SDM) およびスルファメタジン (SMZ) (いずれも純度 99.5 %) は Chem Service から購入しました。クロラムフェニコール 98.5 % (CAP) は Ehrestorfer 博士から譲り受けました。

各化合物の標準原液 (100 µg/mL) をメタノールで調製し、褐色瓶中で 6 か月間 -20 °C で保管しました。原液を水で適切に希釈して多化合物作業用標準溶液 (1,000 µg/L) を調製し、冷蔵庫で (T < 5 °C) 保管して、1 週間ごとに調製直しました。

### サンプル前処理

5 g のサンプルを 50 mL のスクリーキャップテフロンチューブに入れました。50 mL のスルファジメトキシシン-d6 (1.0 µg/mL) を内部標準として添加し、1 mL の 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA 溶液、およびギ酸が 0.1 % 含まれる 24 mL のアセトニトリル:水 70:30 を添加しました。この混合物を Marconi ultraturrax (MA102) を使用して 5 分間ホモジナイズし、Hitachi CF16RXII 遠心分離機で 5 分間 1,370 xg で遠心分離しました。Manifold Supelco Visiprep システムを使用して 500 µL の上清を Captiva ND カートリッジ (A5300002) で 2 mL バイアルに溶出し、LC/MS/MS で分析しました。

## LC/MS/MS メソッド

### LC 条件

機器	Agilent 1200 Infinity シリーズ LC システム		
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (3 × 100 mm, 3.5 µm)		
カラム温度	30 °C		
移動相	A) 0.1 % ギ酸水溶液 B) 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	95	5
	13	5	95
流速	0.4 mL/min		
注入量	10 µL		

### MS 条件

機器	Agilent 6430 トリプル四重極 LC/MS システム		
イオンモード	ESI (ポジティブ)		
乾燥ガス流量	10 L/min		
ネブライザ	50 psi		
乾燥ガス			
温度	350 °C		
キャピラリ電圧	4,000 V		
ソフトウェア	Agilent Mass Hunter (B.03.01)		
検出モード	マルチプルリアクションモニタリング (MRM)		

### バリデーションおよび定量手順

提案した手順のバリデーションは、委員会の決定 2002/657/EC の基準に従って特異性、検出下限 (LOD) および LOQ、精度、回収率などのパラメータを考慮して実施しました。

マトリックスマッチキャリブレーション (MMC) は、ブランクおよびスパイクサンプルを使用し、11 種類の対象化合物について 5~400 µg/kg 範囲内の 7 つの異なる濃度レベルで行いました。各レベルの濃度を 3 回ずつ分析しました。

サンプル中の対象化合物の濃度を内部標準メソッドを使用して測定しました。信頼性の高い結果を得るために、重水素化スルファジメトキシシン-d6 を内部標準として使用しました。

## 結果と考察

各化合物でモニタリングしたイオンのリストを表 1 に示します。  
最も強いトランジションを定量イオンとして、次に強いトランジションを、分析を確認するための定性イオンとして使用しました。

表 1. 選択した化合物のリテンションタイム (RT) と MS/MS 条件

化合物	RT (分)	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグメンタ 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (V)
クロルテトラサイクリン	10.610	479.1	462.2*	125	12
		479.1	444.1**	125	17
オキシテトラサイクリン	9.685	461.2	426*	115	16
		461.2	201.1**	115	41
テトラサイクリン	9.944	445.2	410.2*	115	17
		445.2	154.2**	115	30
サルファジメトキシシ	11.982	311.1	156*	120	16
		311.1	108**	120	28
スルファメタジン	10.127	279.1	186*	115	12
		279.1	156**	115	16
スルファチアゾール	9.128	256	156*	90	8
		256	108**	90	20
シプロフロキサシン	9.786	332.1	288.1*	125	13
		332.1	245.1**	125	22
エンロフロキサシン	10.021	360.2	342.2*	132	17
		360.2	316.2**	132	16
ノルフロキサシン	9.695	320.1	302.1*	125	20
		320.1	231.0**	125	44
サラフロキサシン	10.560	386.1	342.1*	119	15
		386.1	299.1**	119	26
クロラムフェニコール	11.563	323	305*	70	0
		323	275**	70	8
スルファジメトキシシ-d6	11.945	317.1	162.2*	65	20
		317.1	108.1**	65	28

\* 定量に使用したトランジション

\*\* 定性に使用したトランジション

太字の化合物は内部標準です。

残留抗生剤は、リテンションタイムと2つのMRM トランジションを使用して同定しました。化合物のクロマトグラムと分析用に選択したトランジションを図1に示します。

Captiva カートリッジの主な利点は、沈殿したタンパク質や粒状物質の効率的な除去に容易に使用できる点です。この利点はメソッドの選択性により証明され、ブランク魚サンプル (抗生剤なし) と抗生剤を添加した抽出物の注入により確認されました。ブランクの魚サンプルは、最高の選択性を示す化合物と同じリテンションタイムを使用して、実際の定量下限 (LOQ) である 5 µg/kg で 10 % 未満の干渉を示しました。

5~400 µg/kg の濃度範囲では、マトリックスの全化合物についての 0.99 を超える決定係数 ( $R^2$ ) からわかるように直線性を示しました (表 2)。図 2 に、このメソッドを使用したニルティラピアマトリックスの薬物分析の結果の例を示します。

この結果は、広い分析範囲で魚サンプル中の抗生剤を検出できること、また曲線上のポイントでのばらつきが 10 % 未満であることも示しています。曲線、S/N、および計算は Agilent MassHunter ソフトウェア (B.03.01) で作成しました。

表 2 に示した LOD および LOQ は魚中の抗生剤分析には十分でした。

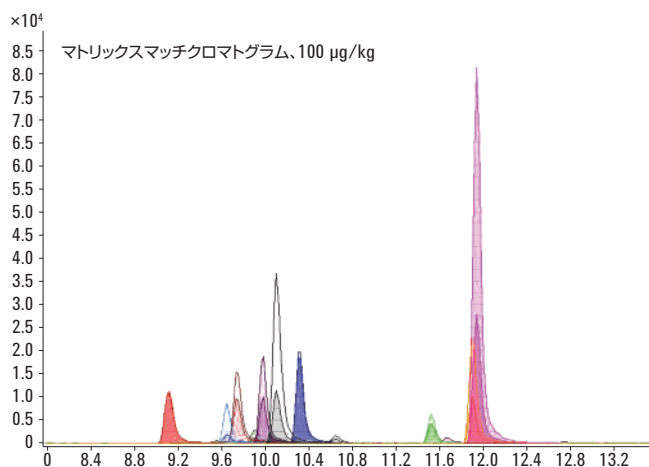


図 1. スパイクした魚サンプル (100 µg/kg) の全イオンクロマトグラム (TIC)

表 2. ニルティラピアの筋肉に含まれる抗生剤の LOD、LOQ、決定係数 ( $R^2$ )

化合物	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	$R^2$
クロルテトラサイクリン	0.91	3.00	0.9992
オキシテトラサイクリン	1.20	4.00	0.9994
テトラサイクリン	1.00	3.20	0.9994
サルファジメトキシシン	0.30	0.90	0.9995
スルファメタジン	0.80	2.56	0.9992
スルファチアゾール	1.30	4.00	0.9990
シプロフロキサシン	0.40	1.20	0.9994
エンロフロキサシン	0.50	1.50	0.9976
ノルフロキサシン	1.30	4.30	0.9992
サラフロキサシン	0.60	1.90	0.9986
クロラムフェニコール	1.00	3.50	0.9992

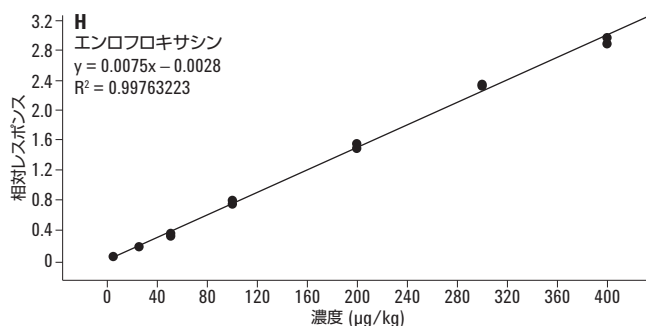
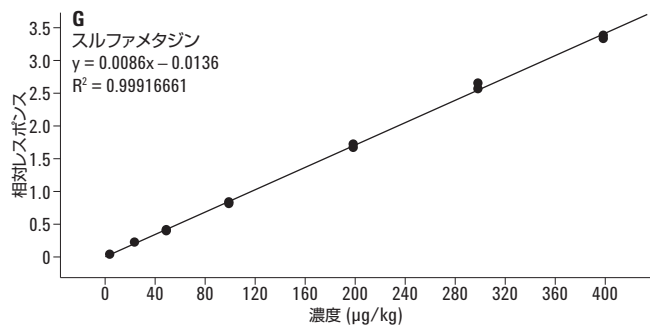
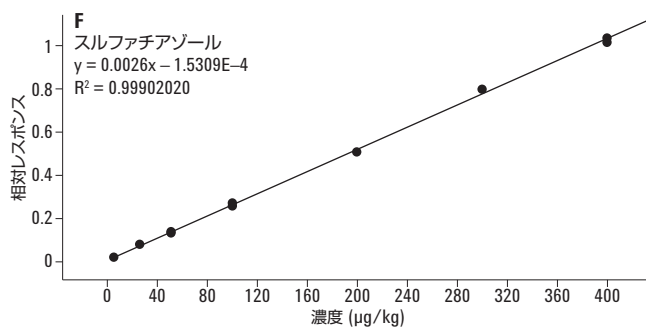
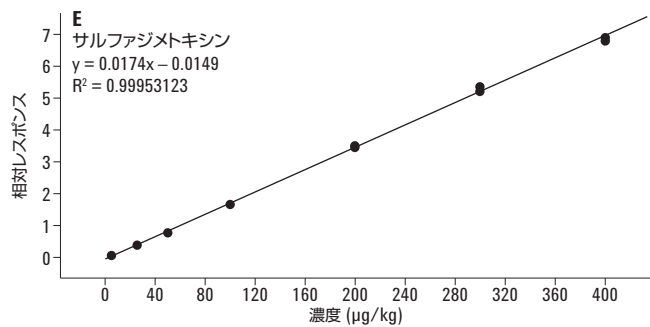
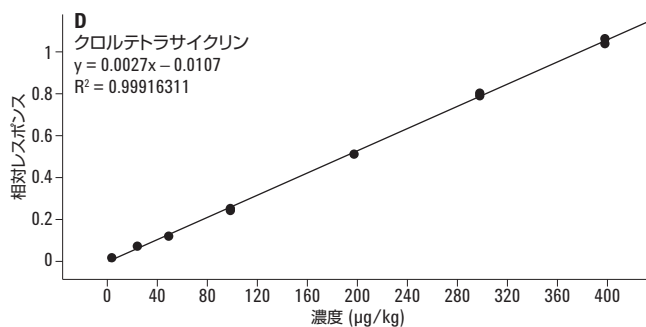
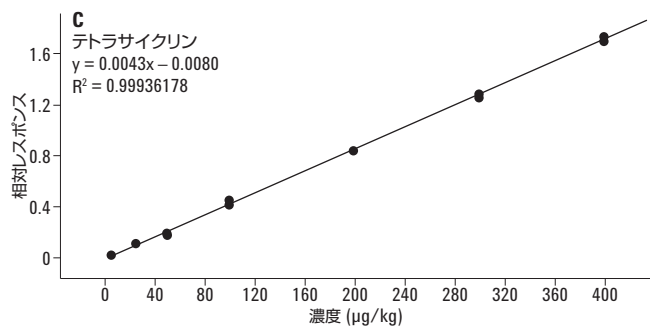
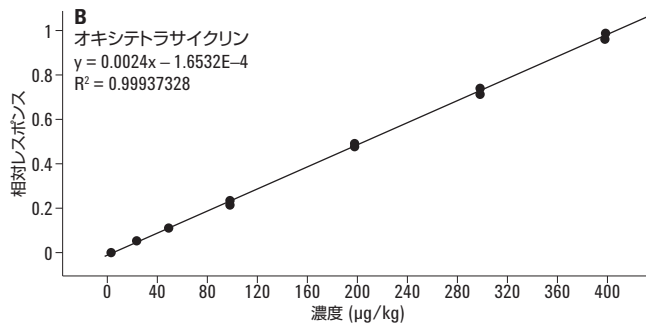
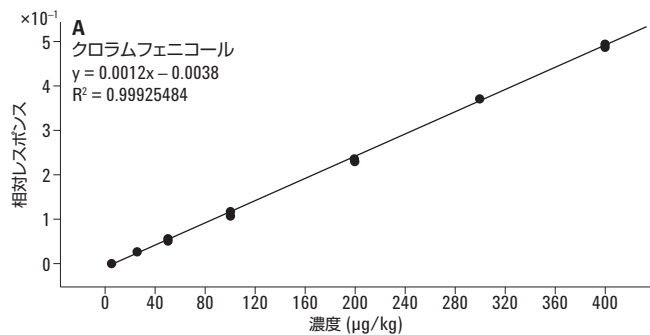


図 2. 魚サンプル中の 5.0~400 µg/kg のクロラムフェニコール (A)、オキシテトラサイクリン (B)、テトラサイクリン (C)、クロルテトラサイクリン (D)、サルファジメトキシシン (E)、スルファチアゾール (F)、スルファメタジン (G)、およびエンロフロキサシン (H) の検量線。次ページに続く

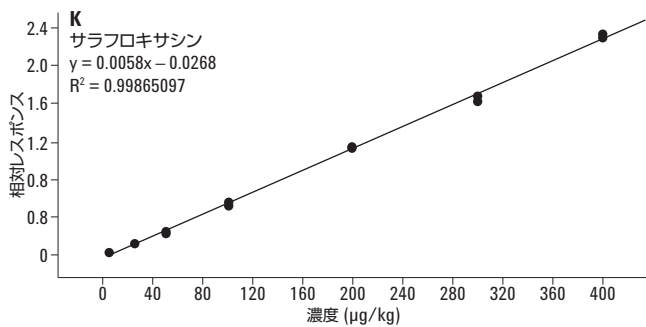
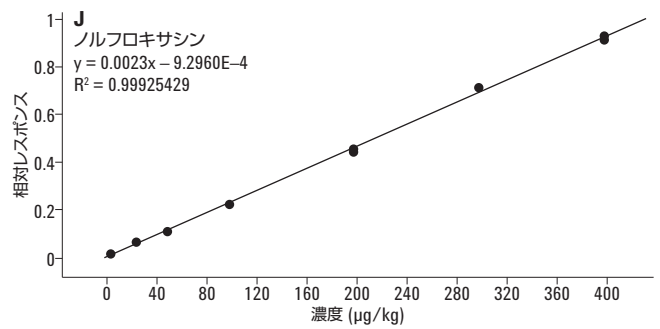
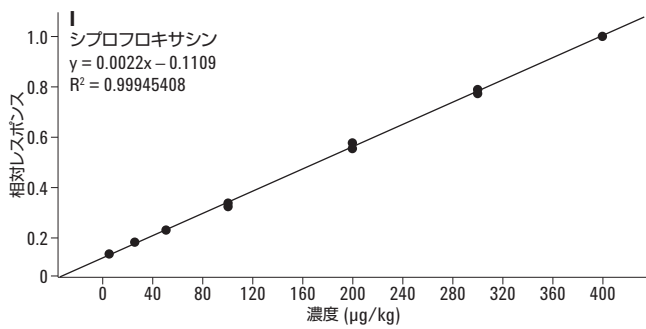


図 2. 魚サンプル中の 5.0~400 µg/kg のシプロフロキサシン (I)、ノルフロキサシン (J)、およびサラフロキサシン (K) の検量線

ナイルティラピアの筋肉からの回収率で表した精度および真度を、濃度 50、100、および 200 µg/kg でスパイクしたサンプルを分析することで確認しました。前述の濃度レベルで日内精度を 7 回の繰り返し測定により調べました。結果を表 3 に示します。

日間精度は、30 日間のシステムのルーチン操作中に濃度 100 µg/kg で 7 回繰り返し求めました。得られた結果は 2.8~10.3 % で、許容範囲と見なされました。

表 3. 魚の 3 つの添加レベルの回収率および日内精度 (相対標準偏差)、および 100 µg/kg の日間精度

化合物	50 µg/kg	RSD (%)	100 µg/kg	RSD (%)	200 µg/kg	RSD (%)	日間 RSD (%)
クロルテトラサイクリン	108.1	3.7	100.8	4.5	87.5	7.7	6.1
オキシテトラサイクリン	103.8	4.6	96.8	11.5	86.3	8.3	8.5
テトラサイクリン	106.4	4.5	107.1	5.4	93.0	7.4	6.2
サルファジメトキシ	86.5	6.0	89.3	9.3	96.0	4.8	7.8
スルファメタジン	99.3	4.1	94.9	7.7	97.6	5.0	5.6
スルファチアゾール	92.5	3.3	92.3	7.2	95.8	5.8	7.7
シプロフロキサシン	87.9	6.5	87.2	8.6	82.8	6.2	9.1
エンフロキサシン	98.4	6.6	108.8	4.7	95.4	8.3	8.5
ノルフロキサシン	96.0	10.6	100.0	9.4	87.5	5.1	7.8
サラフロキサシン	98.1	3.0	90.0	5.4	90.7	4.4	4.7
クロラムフェニコール	93.2	5.2	90.5	13.2	94.5	5.5	10.3

回収率は、スパイクサンプルで検出された対象化合物のレスポンスとスパイクした内部標準のレスポンスの比として計算し、パーセンテージで表しました。開発したメソッドの精度と真度が高いことが証明されました。このメソッドは抗生剤の測定に高い信頼性で使用することができます。

## 結論

このアプリケーションノートでは、ナイルティラピアの筋肉に含まれるさまざまな抗生剤クラスを選択的に測定するメソッドの開発について詳細に説明しています。このメソッドではトリプル四重極 LC/MS/MS を使用し、高い真度、精度、および選択性によって特性評価します。その結果、養魚場の低 ppb レベルの対象化合物を同定し、定量できるようになります。

提案した抽出手順はシンプルで、サンプルの処理に満足できる回収率を得るための追加のクリーンアップステップは不要でした。

## 参考文献

1. FAO, 2009.State of world fisheries and aquaculture.FAO Fisheries and Aquaculture Department.Rome.176 p.
2. Brasil, 2013.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes> で入手可能。2013年10月8日にアクセス。
3. Commission Decision, 2002.2002/657/EC of 12 August 2002 *Off.J. Eur.Commun.*L221, 8–36.

## 詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://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。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

December 18, 2013

5991-3768JAJP



**Agilent Technologies**