

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS システムによる豚肉および鶏卵中の 残留動物用医薬品の一斉分析

著者

Tony Zhang,
Dan-Hui Dorothy Yang
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

動物用医薬品は主に抗菌剤とホルモンから構成されており、疾病の治療と予防、成長の促進、および飼料効率の改善に幅広く使用されています。ただ世界規模で問題になっているのは、動物由来の製品を消費する際、製品内に残留している動物用医薬品によりアレルギー反応や抗生物質耐性を引き起こす場合があるという点です。アメリカ食品医薬品局 (US FDA) は公衆衛生を守るため、2015年6月発行の『動物用飼料指示書』において、抗菌薬の使用を規制するための最終規則を発表しました¹。EUによる規制は立法上の提案 2014/0257(COD)²に記載されていますが、これは指令 2001/82/EC を廃止して新たに法案化されたものです。この新しい規制の目的は、影響評価によって規定された目標の達成に取り組む、抗菌剤耐性の公衆衛生リスクに対処することです。中国では、動物由来の食品中の動物用医薬品基準値の上限を設定するために³、農務部大臣が告知 235³ を発表しました。分析対象物とマトリックスに応じて、正確な定量を実施するための要件は ppt レベルから ppb レベルまでの範囲にわたります。動物用医薬品は分類がさまざまにマトリックスや特性が複雑になるため (例えば、異なる pH 下での疎水性や安定性など)、1回の分析で複数の分類の分析対象物を検出することが困難になります。一般的な標準メソッドが対応している動物用医薬品の分類は、1つまたは類似した分類の小規模のコホートです。動物用医薬品を効率的にモニタリングして公衆衛生を守るためには、1回の分析で複数の分類の分析対象物を検出する手法が必要になります。

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS は、この点において非常に適したシステムです。Ultivo は、特に環境および食品安全分野において、ルーチン生産や分析を行うラボが直面する多くの課題に対処するように設計されています。このシステムには複数の画期的な革新技術が組み込まれており、性能を損なわずに前世代のトリプル四重極システムよりも大幅に小型化されています。また、デュアルヘキサポール構造により、優れたイオン透過効率が実現します。ハードウェアとエレクトロニクスの技術も向上しているため、極性切り替えが高速化しています。さらに、Ultivo ではユーザーのシステムメンテナンスの負担が低減されており、VacShield と取り外し可能な検出器が実装されているため、質量分析を専門としない MS ユーザーもシステムの運用やメンテナンスの管理を行うことができます。

このアプリケーションノートでは、Ultivo トリプル四重極 LC/MS を Agilent 1290 Infinity II UHPLC と組み合わせて使用し、豚肉と鶏卵中の 27 分類にわたる 151 種類の動物用医薬品を分析する分析スクリーニングメソッドについて説明します。さらに、Agilent EMR-Lipid サンプル前処理キットの幅広い適応性についても示します。EMR-Lipid は、動物由来のマトリックスから脂質含有量の高い成分を効率的に除去し、動物用医薬品において適正な回収率を達成しました。

実験方法

標準試料および試薬

動物用医薬品の標準試料は、Dr. Ehrenstorfer GmbH、WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH、Toronto Research Chemicals (TRC)、または AccuStandard, Inc. から購入しました。

表 1 は、この溶液で分析した 151 種類の化合物を示しています。移動相の前処理には、超純水 (> 18.2 MΩ、Milli-Q 純水装置)、アセトニトリル (LC-MS グレード、Fluka)、およびギ酸 (~ 98 %、質量分析用、Fluka) を使用しました。サンプル前処理には、アセトニトリル (HPLC グレード、Sigma-Aldrich)、ジメチルスルホキシド (DMSO、> 99.9 %、Aldrich)、酢酸アンモニウム (≥ 98 %、Sigma-Aldrich)、およびギ酸 (~ 98 %、HPLC グレード、Fluka) を使用しました。

表 1. 分析対象となった 151 種類の動物用医薬品

分類	品名	CAS
β-アゴニスト	シマテロール	54239-37-1
	クレンブテロール	21898-19-1
	クロルプレナリン	3811-25-4
	ベンブテロール	38363-40-5
	プロプラノロール	318-98-9
	ラクトバミン	90274-24-1
	サルブタモール	18559-94-9
	テルブタリン	23031-32-5
	ツロブテロール	56776-01-3
アンドロゲン	酢酸メゲステロール	595-33-5
	メチルテストステロン	58-18-4
	ナンドロロン/19-ノルテストステロン	434-22-0
	テストステロン	58-22-0
ベンズイミダゾール	2-アミノフルベンダゾール	82050-13-3
	5-ヒドロキシメベンダゾール	60254-95-7
	アルベンダゾール	54965-21-8
	アルベンダゾールスルホン	75184-71-3
	アルベンダゾールスルホキシド	54029-12-8
	アルベンダゾール-2-アミノスルホン	80983-34-2
	カンベンダゾール	26097-80-3
	フェバンテル	58306-30-2
	フェンベンダゾール	43210-67-9
	フルベンダゾール	31430-15-6
	メベンダゾール	31431-39-7
	メベンダゾール-アミン	52329-60-9
	オクスフェンダゾール	53716-50-0
	オクスフェンダゾールスルホン/ フェンベンダゾールスルホン	54029-20-8
	オキシベンダゾール	20559-55-1
	チアベンダゾール	148-79-8
	チアベンダゾール-5-ヒドロキシ	948-71-0
	トリクラベンダゾール	68786-66-3
	クロラムフェニコール	クロラムフェニコール
フロラムフェニコール		73231-34-2
チアンフェニコール		15318-45-3

分類	品名	CAS
糖質コルチコイド	ベクロメタゾン	4419-39-0
	ベタメタゾン	378-44-9
	デキサメタゾン	50-02-2
	フルメタゾン	2135-17-3
	ヒドロコルチゾン	50-23-7
	メチルプレドニゾン	83-43-2
	プレドニゾン	50-24-8
	プレドニゾン	53-03-2
	トリアムシノロン	124-94-7
	トリアムシノロンアセトニド	76-25-5
マクロライド	酢酸イソ吉草酸タイロシン/チルパロシン	63409-12-1
	エリスロマイシン	59319-72-1
	キタサマイシン/ロイコマイシン	1392-21-8
	オレアンドマイシン	7060-74-4
ニトロイミダゾール	チルミコシン	108050-54-0
	タイロシン	74610-55-2
	ジメトリダゾール	551-92-8
	ジメトリダゾール-OH (HMMNI)	936-05-0
ペプチド	メトロニダゾール	443-48-1
	メトロニダゾール-OH	4812-40-2
	ロニダゾール	7681-76-7
キノロン	バージニアマイシン M1	211411-53-0
	シプロフロキサシン	85721-33-1
	ダノフロキサシン	112398-08-0
	ジフロキサシン	98106-17-3
	エノキサシン	74011-58-8
	エンロフロキサシン	93106-60-6
	フレロキサシン	79660-72-3
	フルメキン	42835-25-6
	ロメフロキサシン	98079-51-7
	ナリジクス酸	389-08-2
	ノルフロキサシン	70458-96-7
	オフロキサシン	82419-36-1
	オルビフロキサシン	113617-63-3
	オキサリオン酸	14698-29-4
	ペフロキサシン	70458-92-3
	サラフロキサシン	98105-99-8
	スパルフロキサシン	110871-86-8

分類	品名	CAS
スルホンアミド	スルファベンズアミド	127-71-9
	スルファセタミド	144-80-9
	スルファクロルピリダジン	80-32-0
	スルファクロジン	102-65-8
	スルファジアジン	68-35-9
	スルファジメトキシシ	122-11-2
	スルファドキシシ	2447-57-6
	スルファグアニジン	57-67-0
	スルファメラジン	127-79-7
	スルファメータ/スルファメトキシジアジン	651-06-9
	スルファメタジン/スルファジミジン	57-68-1
	スルファメチゾール	144-82-1
	スルファメトキサゾール	723-46-6
	スルファメトキシピリダジン	80-35-3
	スルファモノメトキシシ	1220-83-3
	スルファモキゾール	729-99-7
	スルファフェナゾール	526-08-9
	スルファピリジン	144-83-2
	スルファキノキサリン	59-40-5
	スルファチアゾール	72-14-0
テトラサイクリン	スルフィソミジン	515-64-0
	スルフィソキサゾール/スルファフラゾール	127-69-5
	トリメトプリム	738-70-5
トリフェニルメタン	クロルテトラサイクリン	57-62-5
	ドキシサイクリン	564-25-0
	テトラサイクリン	60-54-8
ジテルベン	クリスタルバイオレット/ベーシックバイオレット 3	548-62-9
	ロイコマラカイトグリーン	129-73-7
	マラカイトグリーン	569-64-2
フェノチアジン	バルネムリン	133868-46-9
	クロルプロマジン	50-53-3
キノキサリン	キシラジン	7361-61-7
	オラキンドックス	23696-28-8
吸虫駆除剤	ニトロキシニル	1689-89-0
抗コクシジウム剤	クロピドール	2971-90-6
	ジクラズリル	101831-37-2
	エトパベイト	59-06-3
	ハロフジノン	55837-20-2
	ナイカルバジン	330-95-0
	ロベニジン	25875-50-7
	トルトラズリル	69004-03-1
	トルトラズリルスルホン	69004-04-2
	トルトラズリルスルホキシド	69004-15-5
	ゾアレ	148-01-6

分類	品名	CAS
抗ウイルス剤	アマンタジン	768-94-5
農業	カルボフラン	1563-66-2
	クロロジメホルム	6164-98-3
	クマホス	56-72-4
	ジクロルボス	62-73-7
	フェンチオンスルホキシド	3761-41-9
	マラチオン	121-75-5
	ベンタクロロフェノール (PCP)	131-52-2
	プロベタンホス	31218-83-4
	トリクロルホン	52-68-6
	リンコサミド	リンコマイシン
ダブソン	ダブソン	80-08-0
	N-アセチルダブソン	565-20-8
有機酸	ヘプタデカフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)	1763-23-1
	ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOA)	335-67-1
ニトロ	4,6-ジニトロ-o-クレゾール (DNOC)	534-52-1
	ニトロピビン	2315-20-0
	ナトリウムニトロフェノレート/4-ニトロフェノール	100-02-7/63317-67-9
トランキライザー	アザペロール	2804-05-9
	アザペロン	1649-18-9
非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)	4-アセチルアミノアンチピリン	83-15-8
	4-ホルミルアミノアンチピリン	1672-58-8
	フルフェナム酸	530-78-9
	フルニキシシ	42461-84-7
	インドプロフェン	31842-01-0
	ケトプロフェン	22071-15-4
	メフェナム酸	61-68-7
	メロキシカム	71125-38-7
	ピロキシカム	36322-90-4
	スリンダク	38194-50-2
テノキシカム	59804-37-4	
トルメチン	26171-23-3	
抗寄生虫薬	レバミゾール	14769-73-4
オラキンドックス	3-メチルキノキサリン-2-カルボン酸	74003-63-7
	キノキサリン-2-カルボン酸	879-65-2

サンプル前処理

1. ホモジナイズしたサンプル 5 ± 0.05 g を計量して 50 mL 遠心分離チューブに入れます (キャリブレーションサンプルおよび品質管理サンプル用のスパイク標準)。
2. 1.0 mL の水と 2 つのセラミックホモジナイザ (部品番号 5982-9313) を加えてから、サンプルを振とう機で混合します (鶏卵ではこのステップを省略)。
3. アセトニトリルに 10 mL の 5 % ギ酸を加え、手で強く振とうしてサンプルを分散させてから、サンプルを振とう機で 5 分間混合します (2,000 rpm)。
4. 4,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
5. **EMR による活性化:** 5.0 mL の 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (鶏卵の場合は 3.0 mL) を 15 mL EMR-Lipid dSPE チューブ (部品番号 5982-1010) に加え、直ちに最低 30 ~ 60 秒間ボルテックスします (2,000 rpm)。EMR 充填剤全体が十分に水和されていることを確認します (エマルジョンの形成)。
6. 5.0 mL (鶏卵の場合は 7.0 mL) の上澄みを、活性化した EMR-Lipid dSPE チューブに移動します。
7. 直ちに 2 分間ボルテックスします (2,000 rpm)。
8. 4,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
9. 2 つのセラミックホモジナイザ (部品番号 5982-9313) を新しい 50 mL 遠心分離チューブに加え、全抽出物をそのチューブに静かに移してから、脱水キットパック (部品番号 5982-0102) の内容物を加え、強く振とうします。
10. 直ちに 2 分間ボルテックスします (2,000 rpm)。
11. 4,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
12. 2.0 mL の上澄み層をガラスチューブに移動し、50.0 µL の DMSO を加えてから、窒素流で一定体積まで濃縮します (40 °C、50 µL)。
13. 0.950 mL の 15 % ACN 水溶液で再溶解し、1 分間ボルテックスします (2,000 rpm)。
14. 溶液を 2.0 mL 遠心分離チューブに移動し、10,000 rpm で 5 分間遠心分離してから、透明な上澄み液を注入バイアルに移動し、LC/MS 分析を実施します。

分析条件

表 2. 分析パラメータ

LC パラメータ			
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 × 150 mm, 1.8 µm (部品番号 959759-302)		
注入量	15 µL		
カラム温度	40 °C		
流量	0.5 mL/min		
移動相	A) 0.2 % ギ酸水溶液 B) 0.2 % ギ酸アセトニトリル溶液		
グラジエント	時間 (分)	%A	%B
	0	98	2
	0.5	98	2
	1.8	85	15
	3.5	80	20
	6	75	25
	7	70	30
	11	65	35
	16	0	100
26	0	100	
分析時間	26 分		
ポストラン時間	4 分		
ニードル洗浄	洗浄モード: フラッシュポート ニードル洗浄溶媒: 95 % アセトニトリル/水 ニードル洗浄時間: 15 秒以上		
MS パラメータ			
イオン化モード	ポジティブ/ネガティブ		
スキャンタイプ	ダイナミック MRM		
ガス温度	200 °C		
ガス流量	11 L/min		
ネブライザ	35 psi		
シースガス温度	275 °C		
シースガス流量	11 L/min		
キャピラリ	3,000 (ポジティブ)、3,500 (ネガティブ)		
ノズル電圧	200 (ポジティブ)、1,500 (ネガティブ)		

結果と考察

検出感度

9 種類のマトリックススパイク標準溶液 (0.1 ng/g、0.2 ng/g、0.5 ng/g、1.0 ng/g、2.0 ng/g、5.0 ng/g、10 ng/g、20 ng/g、および 40 ng/g) を連続して分析しました。各分析対象物について、直線近似により検量線を作成しました。豚肉中の 87 % の化合物では $R^2 \geq 0.990$ 、鶏卵中の 89 % の化合物では $R^2 \geq 0.990$ でした。

図 1 に、鶏卵中の 8 種類の化合物について得られた検量線を示します。これらの化合物は、アルベンダゾール、ベクロメタゾン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、オレアンドマイシン、エノキサシン、スルファクロピリダジン、およびクレンプテロールという 8 つの異なる化学分類に属しています。

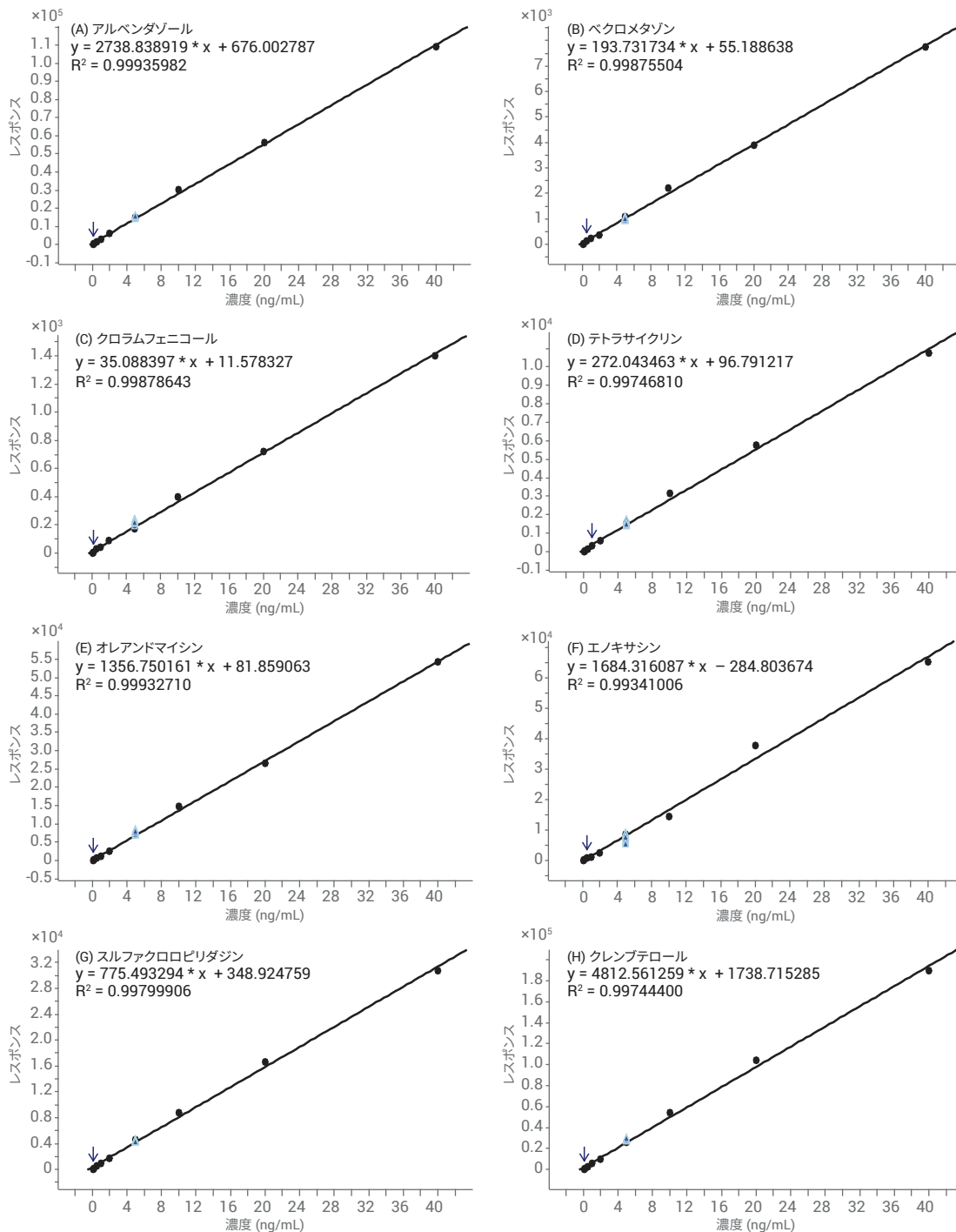


図 1. 鶏卵中のアルベンダゾール (A)、ベクロメタゾン (B)、クロラムフェニコール (C)、テトラサイクリン (D)、オレアンドマイシン (E)、エノキサシン (F)、スルファクロピリダジン (G)、およびクレンプテロール (H) の Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS による検量線

Ultivo は非常に高い感度を示しました。大部分の化合物は、マトリックス内の 2 ng/g スパイクレベルで検出できました。例えば、鶏卵中の 93 % の化合物は、定性と定量の両方において 10 を超える S/N 比で検出できました。図 2 に、鶏卵中の 2 ng/g スパイクによるサンプルクロマトグラムを示します。

図 3 は、マトリックス内の異なる濃度での定性と定量の両方において、S/N が 10 を超えた化合物の割合を示しています。

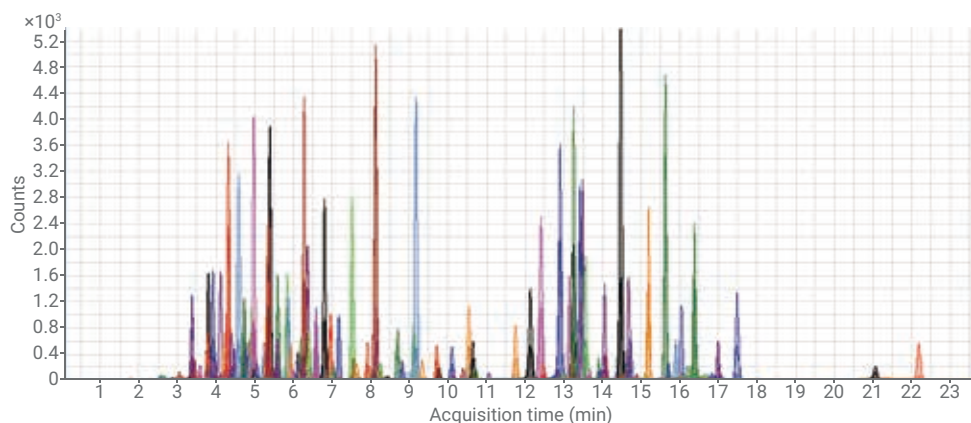


図 2. 151 種類の動物用医薬品を 2 ng/g で添加した鶏卵サンプルのクロマトグラム例

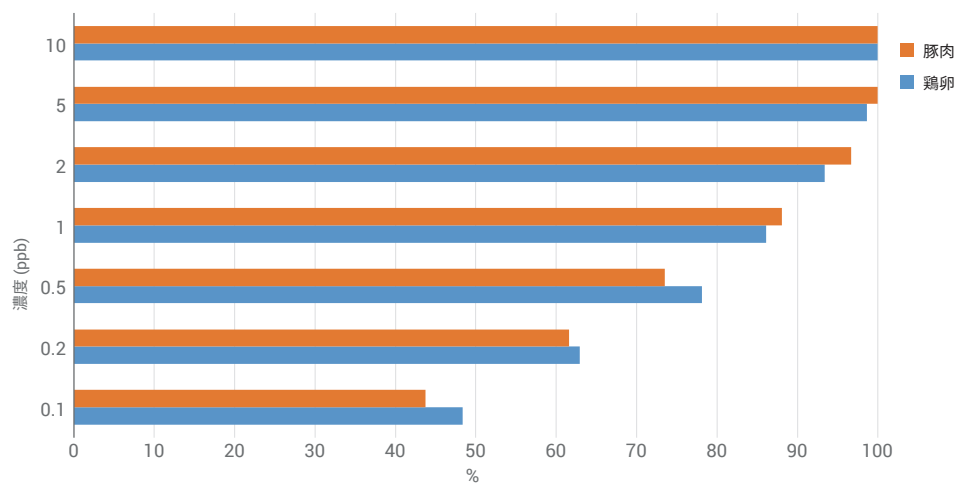


図 3. マトリックス内の異なる濃度で定性と定量の両方において、S/N が 10 を超えた化合物の割合

メソッドの精度

7 回の繰り返し分析により、5 ng/g スパイクレベルでの再現性を調べました。図 4 に、豚肉と鶏卵の 5 µg/kg スパイクレベルにおける %RSD の分布 (%) を示します (n = 7)。再現性の結果は良好で、92 % の化合物で %RSD が 20 % 以内に収まりました。

結論

豚肉と鶏卵中の 27 分類にわたる 151 種類の動物用医薬品を短時間で容易に分析するためのメソッドを開発しました。感度、真度、および精度の結果から、Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS が動物用医薬品分析に活用できるソリューションであることが実証されました。

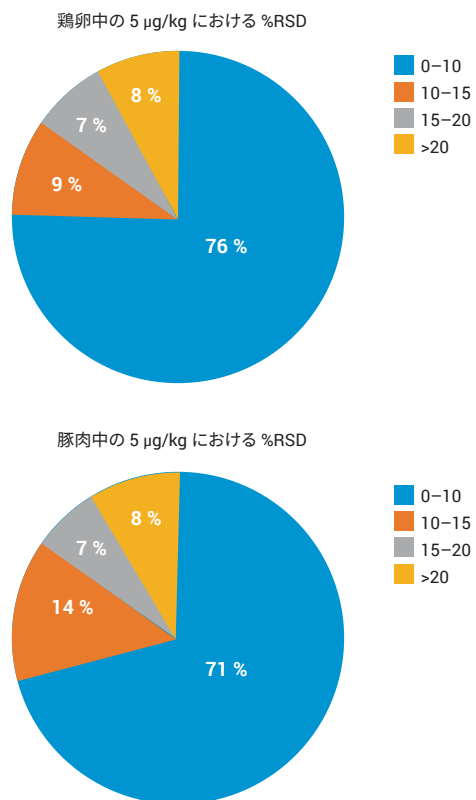


図 4. 豚肉と鶏卵の 5 µg/kg スパイクレベルにおける %RSD の分布 (n = 7)

参考文献

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 21 CFR Parts 514 and 558, FDA-2010-N-0155.
2. Proposal for a regulation of the European parliament and of the council on veterinary medicinal products, European Commission, 2014/0257 (COD).
3. Maximum residue limits in animal derived foods, Announcement No. 235, Ministry of Agriculture, China, **2002**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017
Printed in Japan, December 19, 2017
5991-8746JAJP