

シーフード組織中の動物用医薬品分析

Agilent 6400 シリーズトリプル四重極質量分析計 (QQQ-MS) によるリアルタイム直接分析 (DART) と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のメソッド開発

著者

Cheryl L. Lassitter
Lead Chemist, DOC, NOAA,
NMFS, NSIL

Sheher Bano Mohsin
Senior Applications Scientist,
Agilent Technologies, Inc.

Joan M. Stevens
Senior Applications Scientist,
Agilent Technologies, Inc.

概要

水産養殖は世界規模で成長し続ける産業であり、2030 年以降の全世界での生産量は 93,000 トンを超えるものと推定されています¹。生産量の増加に伴い、水産用医薬品の使用量の増加が国際的な懸念となってきました。水産用医薬品および非処方の抗生物質の管理や規制があるにもかかわらず、一部の国では抗菌剤耐性や毒性に対する懸念が高まっています。米国の食品の輸入は増え続けているため、シーフード中の未承認の水産用医薬品を検出するための高速かつ高い感度のスクリーニング技術の必要性が増しています。複数の機器メーカーが酵素免疫測定法 (ELISA) を使用し、動物用医薬品の残留物を測定するための高速スクリーニングプロトコルを開発してきました。最適で高い感度の機器メソッドは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) をタンデム質量分析計 (MS/MS またはトリプル四重極/MS) と組み合わせたものです。この機器のプラットフォームにより、バックグラウンド信号が大幅に低減され、サンプルマトリックス中の非常に低濃度の動物用医薬品を正確に定量測定することができます²。

しかし、Ionsense, Inc., 社のリアルタイム直接分析質量分析計 (DART-MS) を使用すると、動物組織製品に含有される広い範囲の動物用医薬品のリアルタイムラボ分析を容易に実現でき、代表的な HPLC-MS で必要とされる標準的なプロトコルと手順が不要になります。通常、時間のかかる ELISA キットは、分析対象別にターゲットを絞って使用されます。DART-MS を用いた分析では、多くの動物用医薬品クラスを即座にリアルタイムで同時に検出することができます。

DART-MS のようなイオン源技術は、一般環境の大気圧下、接地電位下での物質やサンプルマトリックスの高速、非接触分析用に開発されたもので、最少量のエネルギーにより分子をイオン化し荷電状態を実現します。揮発性サンプルが真空源の下で導入され、準安定原子と相互作用することによってイオン化されます。この 2005 年に開発された技術は、州および連邦研究所のいずれにおいても人の使用する違法薬物の検査に使用され、確認メソッドとして HPLC-MS 技術で実証されてきました。この手法に適したアプリケーション例には、医薬、代謝物、ペプチド、オリゴ糖、合成有機物、有機金属化合物、依存性薬物、爆発物、毒性工業化学物質の検出などがあります。DART-MS は現在、さまざまな物質表面、例えばコンクリート、アスファルト、皮膚、通貨、航空搭乗券、名刺、果実、野菜、香辛料、飲料、体液、園芸品の葉、カクテルグラス、衣類に使用されています。ハイスループットを実現するために重要なリアルタイムでの瞬時応答、向上した分析機能を提供します³。

トリプル四重極 (QQQ) MS 技術の使用によって、これまでに多くの成果がありました。その一例である Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムは、Agilent iFunnel 技術の性能がベースになっており、非常に低い濃度の動物用医薬品を検出できます。6495 システムは、分析感度、ダイナミックレンジ、堅牢性、精度、真度をこれまでは実現不可能だったレベルにまで拡張します⁴。このアプリケーションノートでは、アジレント独自の iFunnel QQQ 技術を DART イオン源のリアルタイム分析機能と組み合わせ、動物用医薬品の標準ミックスを組織にスパイクしたエビや魚のシーフードマトリックスを分析するための革新的な使用方法を解説します。

Agilent 6400 シリーズトリプル四重極/MS を使用した DART と HPLC-ESI (エレクトロスプレーイオン化) の両方の機能を包括的に調査するために、Agilent 1290 HPLC-6495 システムを DART-6495 QQQ/MS とともに使用して、一連の動物用医薬品分析を並行して実施しました (図 1)。

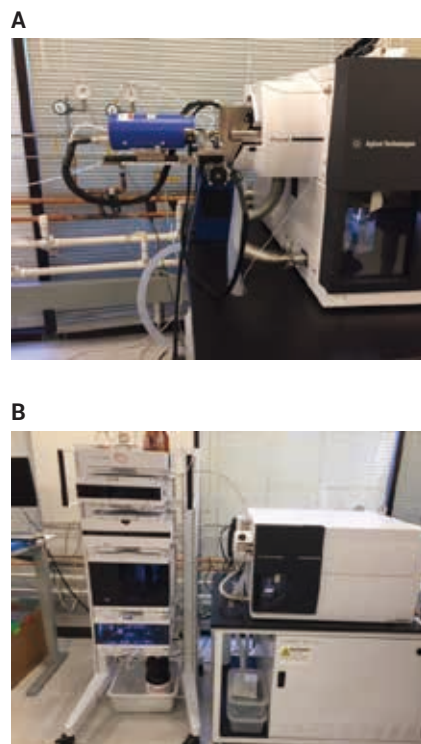


図 1. A) Agilent 6495 トリプル四重極 MS と組み合わせた Ionsense, Inc., 社 SVP-DART
B) Agilent 6495 トリプル四重極 MS と組み合わせた Agilent 1290 HPLC

実験方法

分析対象物の分離には、Agilent 6495 iFunnel (トリプル四重極 MS、モデル G6495A) と Ionsense, Inc. 社の Vapur インタフェース付き SVP-DART の両方を使用しました。9 種類の動物用医薬品の混合標準 (図 2、Sigma-Aldrich 社) を分析し、定量、検出、リニアダイナミックレンジを求めるためのベアスライン、および 9 種類の化合物に対する DART-QQQ の分析感度を測定しました。

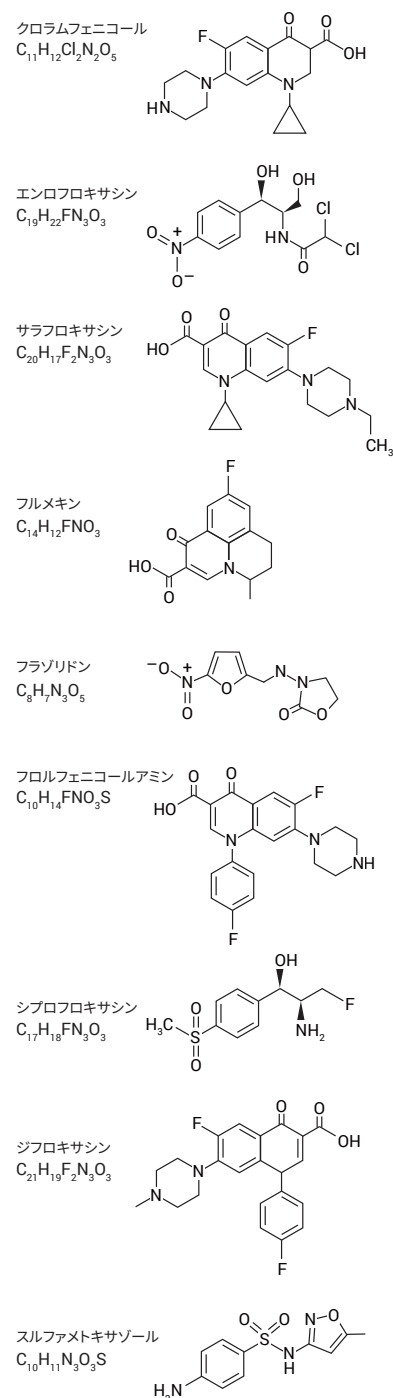


図 2. DART-MS と HPLC-MS で分析した水産用医薬品

Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) を使用して魚とエビの組織を抽出しました。EMR-Lipid dSPE キットには 15 mL 遠心分離チューブ (EMR-Lipid、p/n 5982-1010) 中の計量済み分散吸着剤および、充填済み MgSO_4 脱水パウダー (p/n 5982-0102) が含まれています。それぞれ約 15 g の *L. setiferus* (ホワイトシュリンプ) と約 5 g のオレオクロミス属のもの (ティラピア) をセラミックス製乳鉢に移し、完全に柔らかくして組織の細胞壁を溶解しました。柔らかくした組織、各 2 g を 50 mL ポリプロピレン遠心分離チューブに移しました。スパイク化合物水溶液 (クロラムフェニコール以外、クロラムフェニコールは EtOH で調製、Fisher Chemical 社、LC/MS グレード) を作製した後、図 2 に記載した 9 種類の薬物の混合スパイク溶液を脱イオン水で調製しました。混合溶液スパイクの濃度は、500 ppb、250 ppb、100 ppb、50 ppb、10 ppb でした。

組織をスパイクした後、サンプルを 15 分間放置しました。次に、スパイク済み組織を 30 秒間ボルテックスした後、10 mL の 5 % ギ酸アセトニトリル溶液 (Fisher Chemical 社、LC/MS グレード) を遠心分離チューブに加えました。このチューブを 1 分間ボルテックスして、4,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。遠心分離後、5 mL の 5 mM 酢酸アンモニウムを充填済みの 15 mL 分散固相抽出ポリプロピレンチューブ (p/n 5982-1010) に加え、1 分間ボルテックスすることによって分散 EMR-Lipid 吸着剤を活性化しました。後の実験では酢酸アンモニウムの代わりに 18 Ω の純水を実験で使用すると、より有望な結果を得ることができました。分散ステップで純水を酢酸アンモニウムの代わりに用いるプロトコルは今後発行する文献で紹介します。

分散吸着剤および酢酸アンモニウムのボルテックス後すぐに、抽出したサンプルチューブからの 5 mL の上澄みを分散吸着剤および酢酸アンモニウムとともにチューブに加え、1 分間ボルテックスした後、4,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。次に、抽出物すべてを EMR-Lipid 遠心分離済みチューブから 50 mL 遠心分離チューブに静かに注いで、1 個の MgSO_4 脱水キットパックの内容物を加えました。最初にこのチューブを振とうして、1 分間ボルテックスし、4,000 rpm で 10 分間遠心分離しました。次に、遠心分離したチューブの上層と MgSO_4 パウダーをきれいな 15 mL ポリプロピレンチューブに移し、 $65 \pm 5^\circ\text{C}$ の水槽中で N_2 ガスを用いてチューブに 10 μL 残るまで蒸発させました。

100 μL の 1:1 5 mM ギ酸アンモニウム/MeOH (Fisher Chemical 社、LC/MS グレード) を用いて 15 mL チューブに再調製しました。再調製したチューブの内容物を 30 分間ボルテックスしました。1 スクリーンスポットあたり 5 μL の量を DART QuickStrip カードのスポットに適用します。HPLC 分析を完了するために、50 μL の再調製済み溶液を 2 mL 小型遠心管チューブに移して 30 秒間遠心分離しました。次に、30 μL の遠心分離後の溶液をポリマーインサート (p/n 5180-1270) 付きの Agilent HPLC バイアルに移します。図 3 は Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE のフローチャート図を示しています。Bond Elut EMR キットの有益なクリーンアップの効果を、図 4 のクロマトグラムに示します。

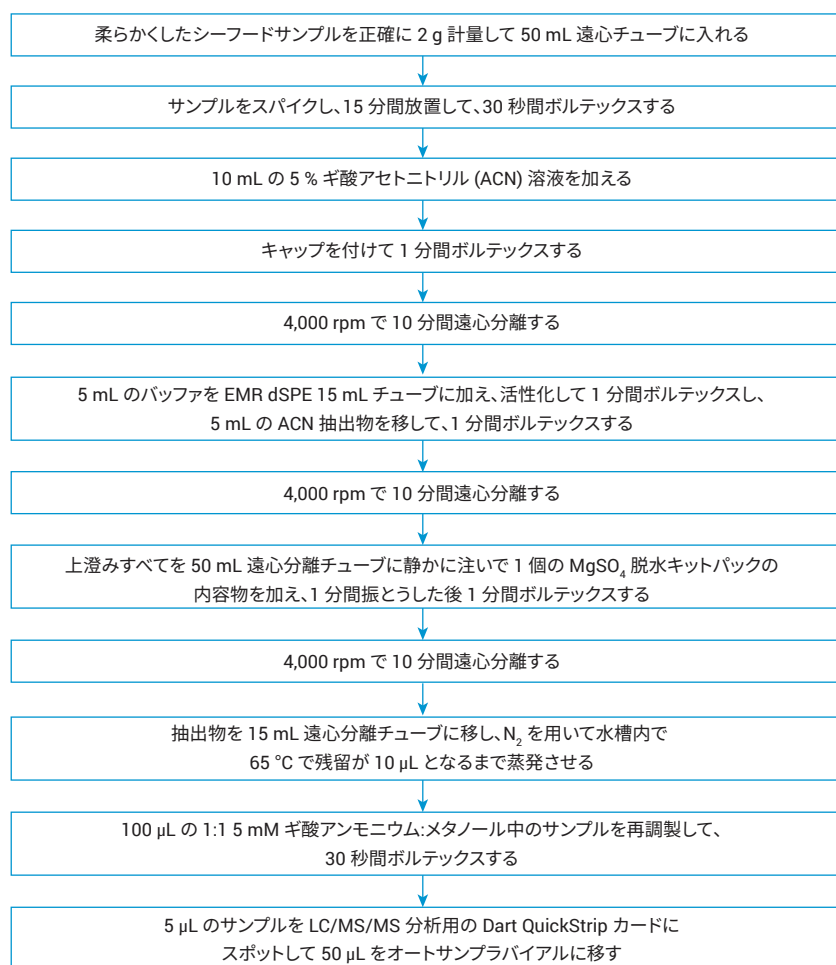


図 3. シーフード中の動物用医薬品の分析に Agilent Bond Elut EMR-Lipid dSPE を使用するサンプル前処理手順

DART – Agilent 6495 トリプル四重極/MS による分析

図 5 は DART イオン源用に使用したパラメータの表示です。目的の分析対象物に合わせて正または負の極性を設定しました。400 °C の分析温度、ヒーター待ち時間を 30 秒、サンプリング速度を 0.5 mm/s、コンタクトクロージャージヤ遅延を 2 秒に設定して、QuickStrip サンプルングの設定をしました。反復実験の後に、同じ DART QuickStrip の 2 回目の分析パスで最適なピーク高と分離能が得られることがわかりました (図 6 の 50 ppb スルファメトキサゾール)。図 7 に 6495 QQQ/MS ソフトウェアの最適化されたプログラム設定値を示します。図 8、9、10 は分析した水産用医薬品用で使用した MRM トランジションのリストの表示です。図 5 は Ionsense, Inc. 社の DART イオン源のためのプログラム設定を示しています。

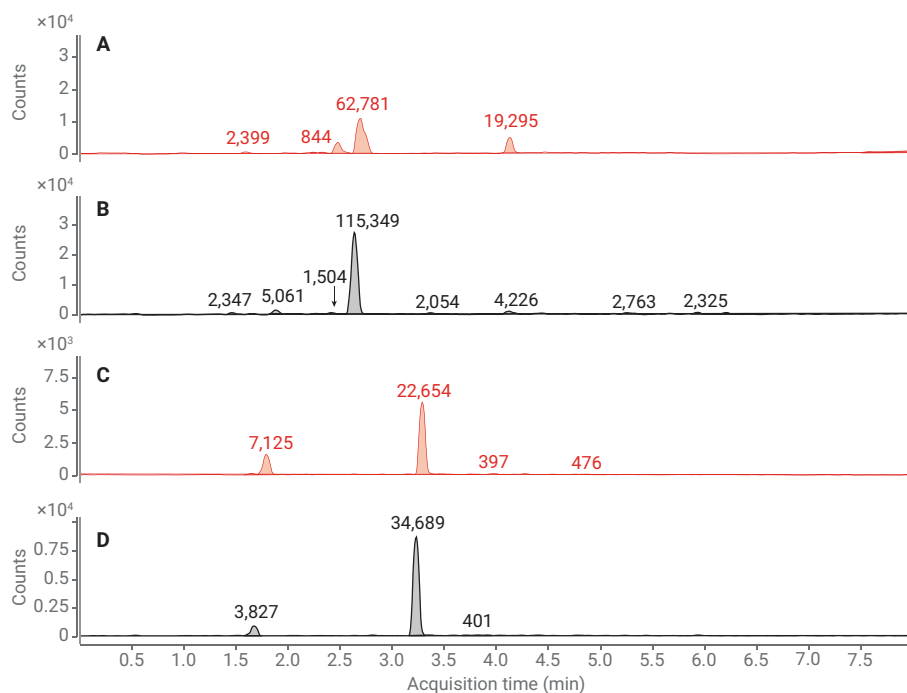


図 4. EMR-Lipid クリーンアップ前後のフラゾリドンとクロラムフェニコールのクロマトグラム。クリーンアップ前のクロマトグラムの余分なピークはクリーンアップ後に大幅に低減していることが分かります。

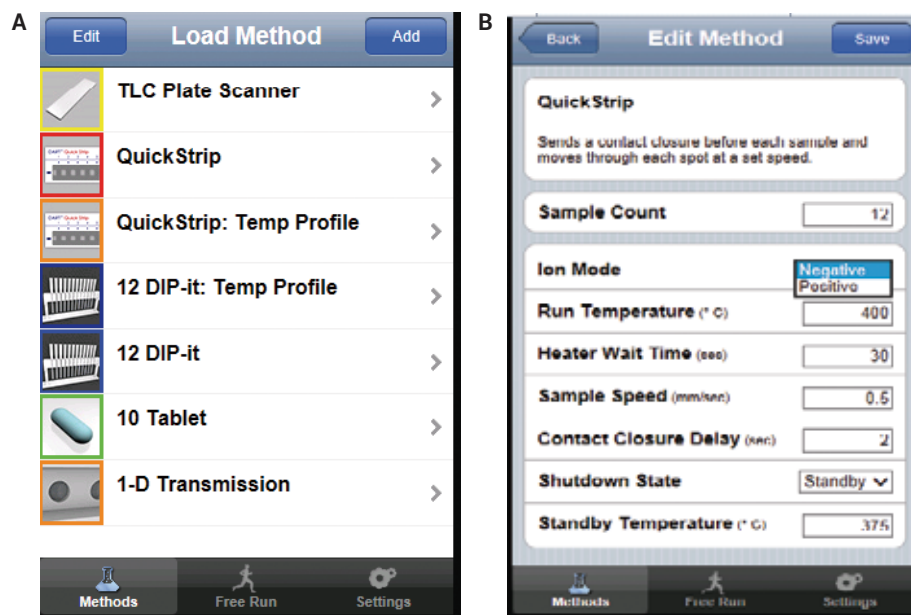


図 5. DART イオン源のソフトウェアプログラム設定

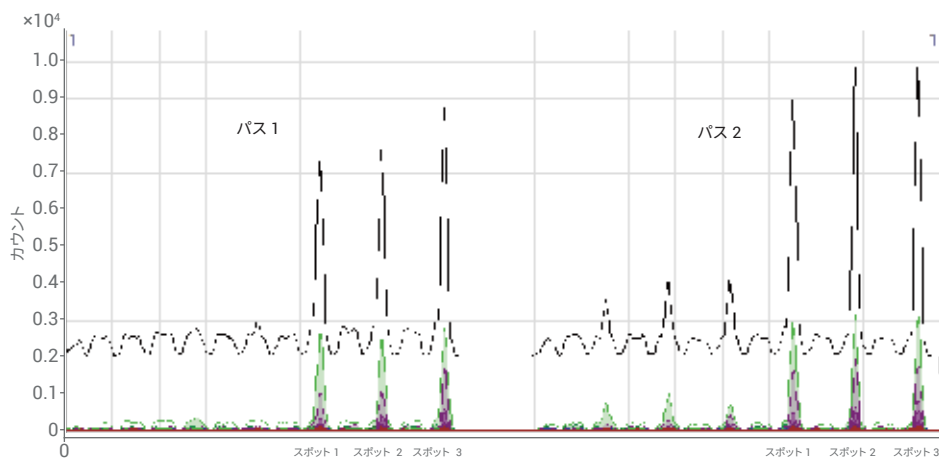


図 6. 50 ppb スルファメトキサゾール ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$)、1 回目と 2 回目の DART QuickStrip パス

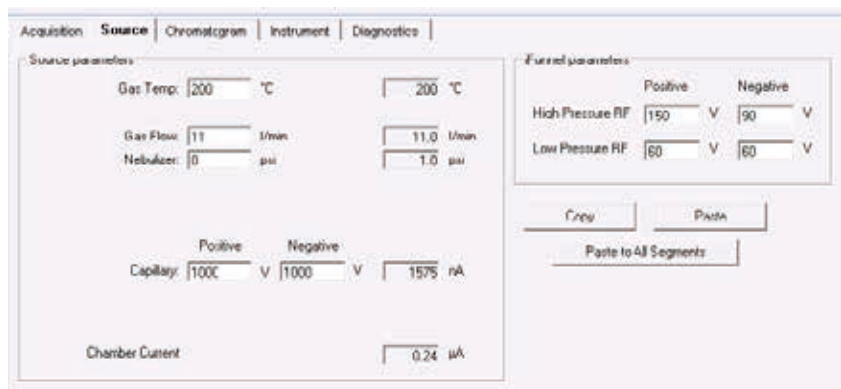


図 7. Agilent 6495 トリプル四重極/MS の最適化プログラムメソッドの設定

Acquisition	Source	Chromatogram	Instrument	Diagnostics							
Scan segments											
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
▶	Difloxacin	☐	400.1	Unit	382.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Difloxacin	☐	400.1	Unit	356.2	Unit	5	380	16	2	Positive
	Difloxacin	☐	400.1	Unit	334.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Difloxacin	☐	400.1	Unit	306.1	Unit	5	380	36	2	Positive
	Difloxacin	☐	400.1	Unit	299.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Sarafloxacin	☐	386.1	Unit	368.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Sarafloxacin	☐	386.1	Unit	348.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Sarafloxacin	☐	386.1	Unit	342.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Sarafloxacin	☐	386.1	Unit	320.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Sarafloxacin	☐	386.1	Unit	299.1	Unit	5	380	40	2	Positive
	Enrofloxacin	☐	360.2	Unit	342.2	Unit	5	380	20	2	Positive
	Enrofloxacin	☐	360.2	Unit	316.2	Unit	5	380	16	2	Positive
	Enrofloxacin	☐	360.2	Unit	286.1	Unit	5	380	36	2	Positive
	Enrofloxacin	☐	360.2	Unit	245.1	Unit	5	380	32	2	Positive
	Enrofloxacin	☐	360.2	Unit	203.1	Unit	5	380	44	2	Positive
	Ciprofloxacin	☐	332.1	Unit	314.1	Unit	5	380	20	2	Positive
	Ciprofloxacin	☐	332.1	Unit	288.2	Unit	5	380	20	2	Positive
	Ciprofloxacin	☐	332.1	Unit	245.1	Unit	5	380	20	2	Positive

図 8. ジフロキサシン ($C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$)、サラフロキサシン ($C_{20}H_{17}F_2N_3O_3$)、エンフロキサシン ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$)、シプロフロキサシン ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$) の MRM トランジション

Acquisition	Source	Chromatogram	Instrument								
Scan segments											
Compound Group	Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
	Chloramphenicol	☐	321	Unit	46.1	Unit	5	380	60	4	Negative
	Flumequine	☐	262.1	Unit	244.1	Unit	5	380	12	4	Positive
	Flumequine	☐	262.1	Unit	202	Unit	5	380	32	4	Positive
	Flumequine	☐	262.1	Unit	126	Unit	5	380	52	4	Positive
	Flumequine	☐	262.1	Unit	99.1	Unit	5	380	70	4	Positive
	Flumequine	☐	262.1	Unit	75.1	Unit	5	380	70	4	Positive
	Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	156	Unit	5	380	12	4	Positive
	Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	108.1	Unit	5	380	24	4	Positive
	Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	92.1	Unit	5	380	24	4	Positive
	Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	80.1	Unit	5	380	56	4	Positive
	Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	65.1	Unit	5	380	48	4	Positive
	florfenicol amine	☐	248.1	Unit	230	Unit	10	380	12	4	Positive
	florfenicol amine	☐	248.1	Unit	130.1	Unit	10	380	24	4	Positive
	Furazolidone	☐	226	Unit	95	Unit	5	380	20	3	Positive
	Furazolidone	☐	226	Unit	83	Unit	5	380	20	3	Positive
	Furazolidone	☐	226	Unit	67	Unit	5	380	40	3	Positive

図 9. シプロフロキサシン ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$)、クロラムフェニコール ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$)、フルメキン ($C_{14}H_{12}FNO_3$)、スルファメトキサゾール ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$)、フロルフエニコールアミン ($C_{10}H_{14}FNO_3S$) の MRM トランジション

Acquisition	Source	Chromatogram	Instrument	Diagnostics								
Scan segments												
Compound Group		Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
		Ciprofloxacin	☐	332.1	Unit	245.1	Unit	5	380	20	2	Positive
		Ciprofloxacin	☐	332.1	Unit	231.1	Unit	5	380	40	2	Positive
		Chloramphenicol	☐	321	Unit	257	Unit	5	380	0	2	Negative
		Chloramphenicol	☐	321	Unit	152.1	Unit	5	380	4	2	Negative
		Chloramphenicol	☐	321	Unit	121	Unit	5	380	36	2	Negative
		Chloramphenicol	☐	321	Unit	46.1	Unit	5	380	60	2	Negative
		Flumequine	☐	262.1	Unit	244.1	Unit	5	380	12	2	Positive
		Flumequine	☐	262.1	Unit	202	Unit	5	380	32	2	Positive
		Flumequine	☐	262.1	Unit	126	Unit	5	380	52	2	Positive
		Flumequine	☐	262.1	Unit	99.1	Unit	5	380	70	2	Positive
		Flumequine	☐	262.1	Unit	75.1	Unit	5	380	70	2	Positive
		Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	156	Unit	5	380	12	2	Positive
		Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	108.1	Unit	5	380	24	2	Positive
		Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	92.1	Unit	5	380	24	2	Positive
		Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	80.1	Unit	5	380	56	2	Positive
		Sulfamethoxazole	☐	254.1	Unit	65.1	Unit	5	380	48	2	Positive
		florfenicol amine	☐	248.1	Unit	230	Unit	10	380	12	2	Positive
		florfenicol amine	☐	248.1	Unit	130.1	Unit	10	380	24	2	Positive

図 10. クロラムフェニコール ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$)、フルメキン ($C_{14}H_{12}FNO_3$)、スルファメトキサゾール ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$)、フラゾリドン ($C_8H_7N_3O_5$) の MRM トランジション

Agilent 1290 Infinity HPLC と Agilent 6495 トリプル四重極/MS による分析

表 1 は使用した Agilent 1290 Infinity HPLC カラムとメソッドパラメータのリストです。HPLC 分析に使用した 6495 QQQ/MS の最適化されたプログラムメソッド設定は、DART-QQQ/MS 分析に使用した設定と一致しました。

結果と考察

サンプルのマトリックス干渉の影響を補正するために、エビと魚の組織のマトリックスマッチング標準（動物用医薬品標準をスパイクした組織サンプル）を分析して、調査対象の組織での動物用医薬品の検出下限を求めました。2 回目の分析 DART パス（図 6）では、すべてのマトリックスマッチング医薬品標準が 50 ppb で分析可能で、いくつかのマトリックスマッチング医薬品ではわずか 1 ppb で検出可能でした。図 11 と 12 は、マトリックスマッチング標準を 1 ppb の濃度で分析したシプロフロキサシンとフルメキンについての DART-QQQ/MS のデータの結果を示しています。

サンプルのマトリックス干渉の影響を補正するために、混合マトリックスマッチング標準を分析し、HPLC-QQQ/MS プロトコルを使用して調査した組織での動物用医薬品の検出下限を測定しました。エンロフロキサシンの例に示すように、マトリックスマッチング標準中の分析対象物を 10 ppt で容易に検出できました（図 13）。

表 1. カラムとメソッドパラメータ

パラメータ	設定値		
カラム	Agilent Pursuit 3 PFP, 100 × 3 mm, 3 μm (p/n A3051100X030)		
移動相	アセトニトリル/水 0.1 % ギ酸溶液		
注入量	2 μL		
HPLC 分離プログラム	時間 (分)	% 水	% アセトニトリル
	0.10	95.00	5.00
	1.00	80.00	20.00
	5.00	40.00	60.00
	5.10	10.00	90.00
	6.00	10.00	90.00
	6.10	100.00	0.00

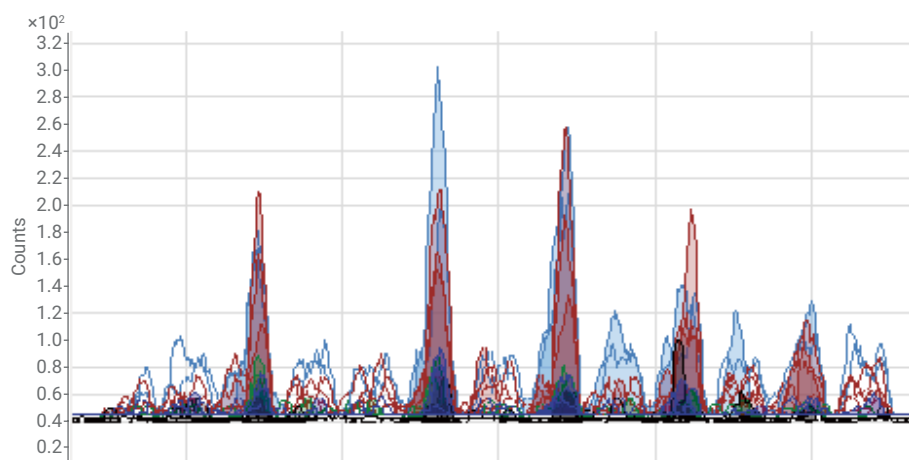


図 11. シプロフロキサシン ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$)、マトリックスマッチング混合標準、1 ppb

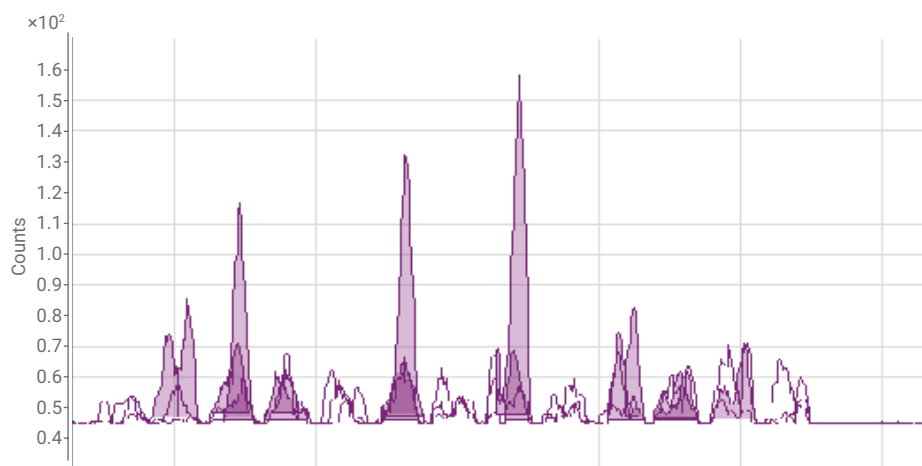


図 12. フルメキン ($C_{14}H_{12}FNO_3$)、マトリックスマッチング混合標準、1 ppb

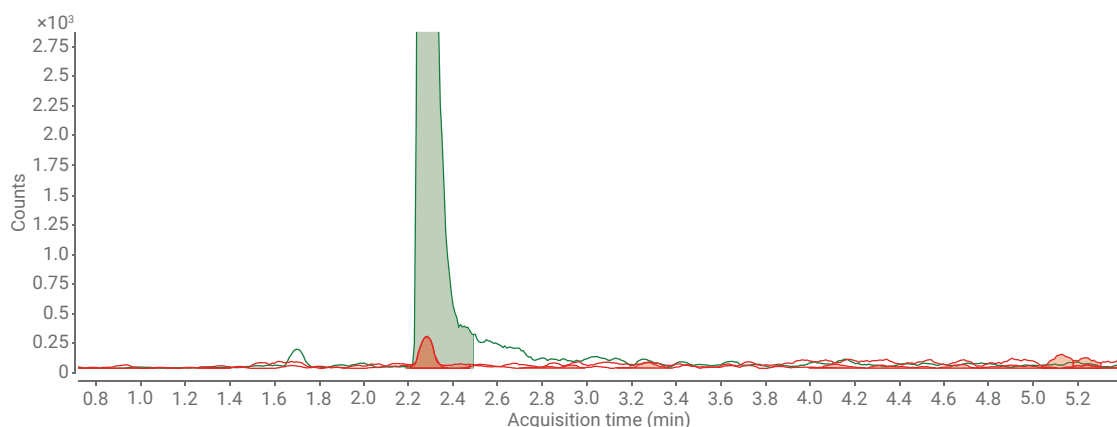


図 13. エンロフロキサシン ($C_{19}H_{22}FN_3O_3$)、10 ppb 標準 (緑色のピーク) および 10 ppt マトリックスマッチング標準 (赤色のピーク)

結論

DART-QQQ/MS 分析は、シーフード中の動物用医薬品の有害レベルを容易に、短時間で、ごく少量の試薬で分析できるため、特に確認分析としての HPLC-QQQ/MS メソッドとの併用において、最初の評価スクリーニングとして最適です。Agilent 6400 シリーズトリプル四重極/MS を使用した動物用医薬品の検出のための DART-QQQ/MS メソッドと HPLC-QQQ/MS メソッドの両方が開発されました。1 つは、DART を Agilent 6495 トリプル四重極/MS と組み合わせてイオン源として使用する分析で、高速かつ広範囲での分析薬品スクリーニングに対応しています。もう 1 つは、Agilent 1290 HPLC のサンプル分離を ESI ソースと 6495 シリーズトリプル四重極/MS とともに使用する低濃度レベルでの定量技術です。さらに実験を重ねることにより、このアプリケーションノートで示した 2 つのメソッドを使用する水産用医薬品の分析が改善すると考えられます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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おりません。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, November 28, 2017

5991-8748JAJP

今後発表するプロトコルテストには、分析の分散抽出ステップでのバッファとしての水と酢酸アンモニウムと比較、スクリーニング結果を向上させるための DART イオン源サンプルメソッドおよびプログラムプロファイルのさらなる最適化などが含まれる予定です。

参考文献

1. Fish to 2030 Prospects for Fisheries and Agriculture, Agricultural and Environmental Services Discussion Paper 03, for Fisheries and Aquaculture, World Bank Report Number 83177-GLB A.
2. Detection and Confirmation of Veterinary Drug Residues in Commercially Available Frozen Shrimp, A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The School of Nutrition and Food Sciences by Jessica Danielle Johnson B.S., Louisiana State University, May 2014.

3. Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 2297–2302.
4. Agilent Technologies, publication number 5991-4541EN, **2014**.

謝辞

Andre Szczesniowski, Applications Scientist, Agilent Technologies, Jon W. Bell, Director, DOC, NOAA, NMFS, NSIL, Janet E. Whaley, D.V.M., NOAA, Office of Seafood Inspection, Angela D. Ruple, Lead Analyst, DOC, NOAA, NMFS, NSIL, Gregory L. Feister, Chemist, DOC, NOAA, NMFS, NSIL, Greg Bartosiewicz, Agilent Technologies, Michael Woodman, Applications Scientist, Agilent Technologies, Shannara N. Lynn, Microbiologist, DOC, NOAA, NMFS, NSIL and Johnathan M. Likens, Sample Custodian, DOC, NOAA, NMFS, NSIL