

Agilent Captiva EMR-Lipid および LC/MS/MS による 卵中のニトロイミダゾール類の分析

著者

Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、使いやすかつ堅牢なパススルークリーンアップと LC/MS/MS 分析による鶏卵中の 4 種類のニトロイミダゾール (メトロニダゾール、ジメトリダゾール、ロニダゾール、イプロニダゾール) とその水酸化代謝物の測定について説明します。QuEChERS 抽出と Captiva EMR-Lipid カートリッジのクリーンアップによるサンプル前処理手順で、非常に優れた結果が得られ、脂質と色素が除去されました。このメソッドは極めて良好な確度 (85.6–118.3 %) と精度 (RSD <6 %) を 3 つの QC レベルすべてで実現しています。

はじめに

ニトロイミダゾール類は、家禽の活性抗生物質で、食用の動物の成長促進剤としてもよく使用されています。しかし、潜在的なリスクのために、多くの国で禁止されてきました¹。溶媒抽出^{2,3}および固相抽出 (SPE)⁴を使用したニトロイミダゾール類の分析に関するレポートはいくつかあります。しかし、溶媒抽出では酢酸エチルやジクロロメタンなどの強い溶媒を使用することが多く、余計なマトリックスを抽出することもあるため、LC/MS 分析中に干渉を引き起こす可能性があります⁴。アセトニトリル抽出とその後のカチオン交換クリーンアップを含む SPE メソッドでは、クリーンな溶出液を得られますが、サンプル前処理で複数の手順を踏み、pH を調整する必要があります。

脂質除去製品である Captiva EMR-Lipid は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることにより、ターゲット化合物の回収率を落とさずに脂質炭化水素鎖を選択的に保持できます。EMR 独自のパススルー機能により、サンプル前処理ワークフローを SPE のマルチステップ操作と比べて大幅に簡素化できます。このアプリケーションノートでは、鶏卵中のニトロイミダゾール類とその水酸化代謝物の分析におけるサンプルクリーンアップに Captiva EMR-Lipid を使用し、その結果、優れた回収率と精度が得られました。図 1 に、4 種類のニトロイミダゾール類とその代謝物の化学構造を示します。

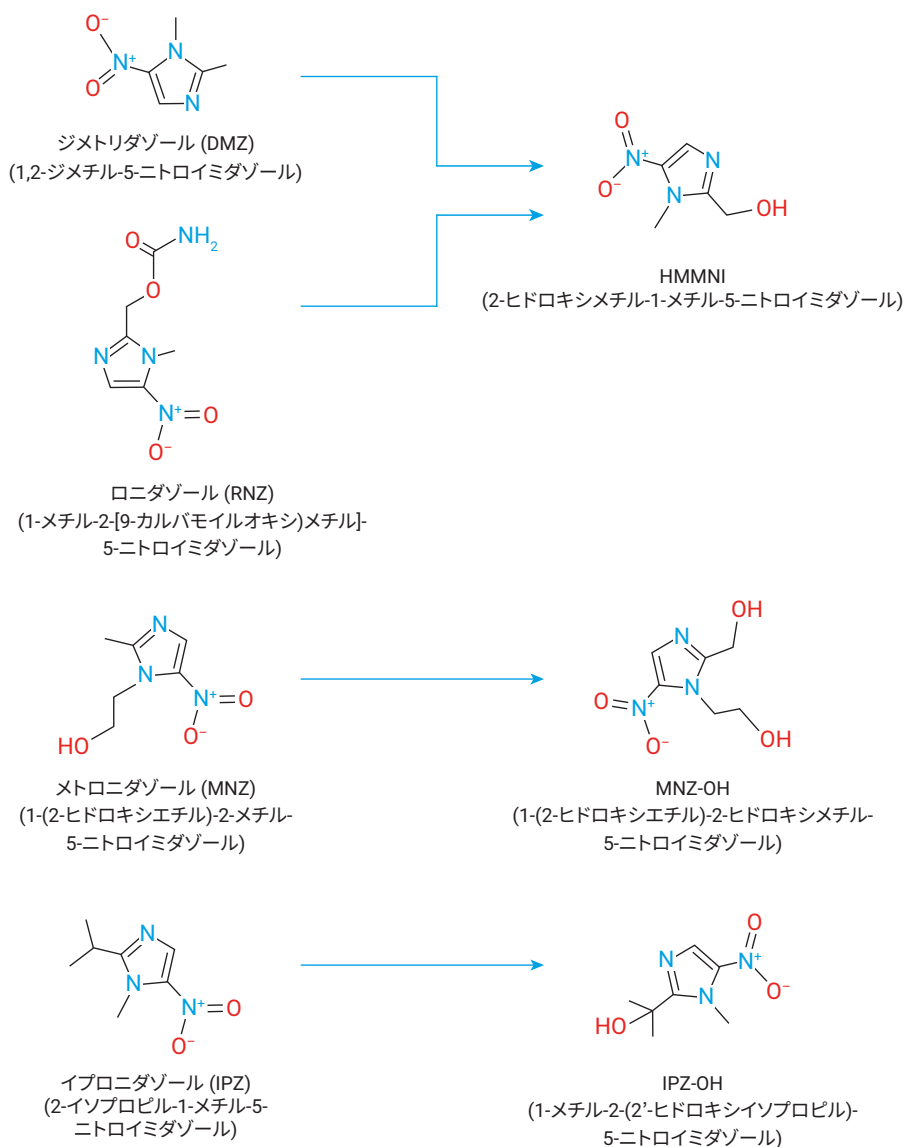


図 1. 4 種類のニトロイミダゾールとその代謝物の化学構造

実験方法

試薬および調製

試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリル (ACN) およびメタノール (MeOH) は Honeywell (マスキゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。ギ酸 (FA) は J&K Scientific Ltd. (北京、中国) から購入しました。ニトロイミダゾール類と内部標準は Dr. Ehrenstorfer GmbH (アウクスブルク、ドイツ) から購入しました。

溶液および標準試料

個々の標準原液を、茶色のガラス製バイアルに MeOH 中で 10 mg/mL となるように作成し、 -20°C で保管しました。使用直前に、混合標準スパイク溶液 (1 mg/mL) と内部標準混合物 (1 mg/mL) を MeOH を用いて調整しました。

試薬およびサンプル

Agilent 1290 Infinity LC と、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース (EI) を搭載した Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS システムとを組み合わせ使用し、分離を実行しました。マトリックスの除去は、Agilent 7000 GC/MS トリプル四重極と組み合わせた Agilent 9000 GC システムで、GC/MS フルスキャンによって評価しました。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理に用いたその他の装置および材料は以下のとおりです。

- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Eppendorf Centrifuge 5810R (ハンブルグ、ドイツ)
- Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ、3 mL、300 mg (p/n 5190-1003)
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド (p/n 12234101)
- Agilent 動物用医薬品用 QuEChERS 抽出キット (p/n 5982-0032)

分析条件

図 2 は、卵中に 1 ng/g の濃度でスパイクした 7 種類のニトロイミダゾールおよび代謝物と 3 種類の内部標準の代表的な MRM クロマトグラムを示しています。内部標準は 10 ng/g の濃度でスパイクしました。

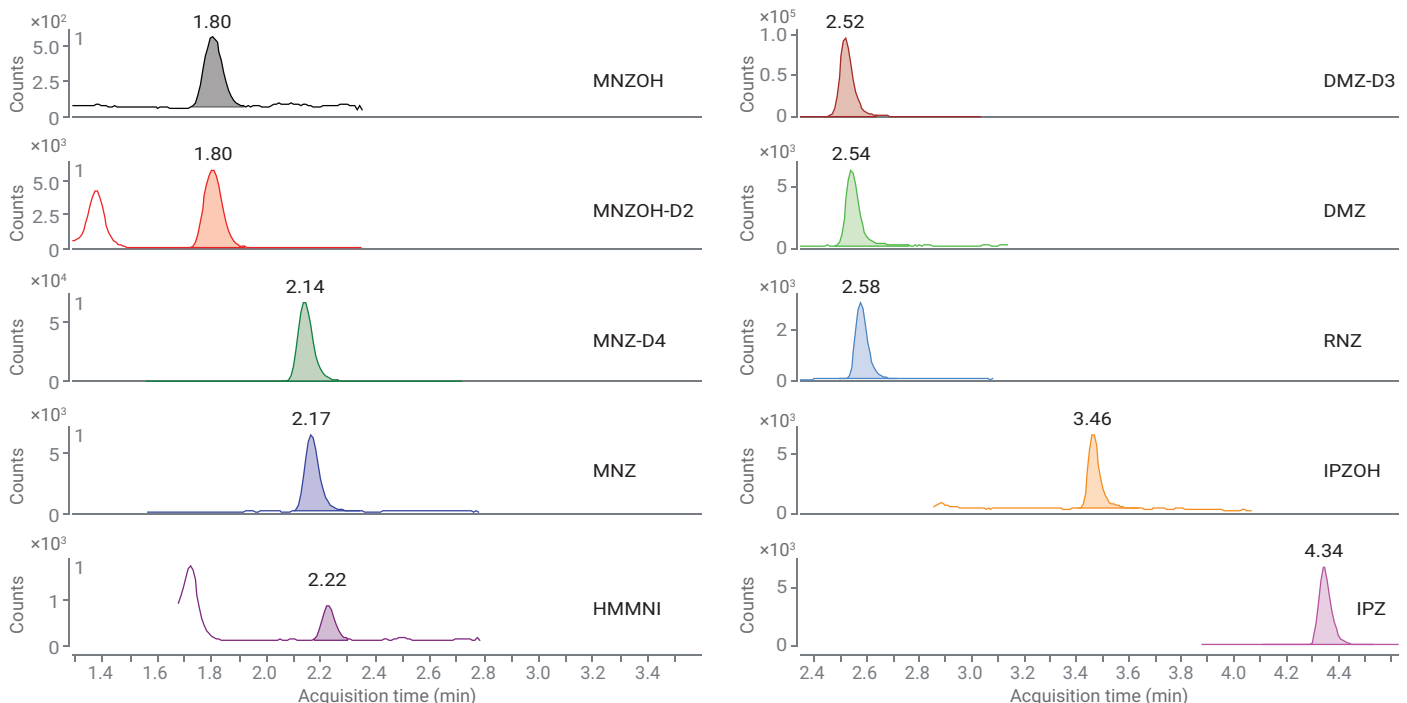


図 2. 1 ng/g の各ニトロイミダゾールと 10 ng/g の内部標準をスパイクした卵の代表的なクロマトグラム

HPLC 条件

パラメータ	設定値																		
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)																		
カラム温度	35 °C																		
オートサンブラ温度	15 °C																		
注入量	1 μL																		
移動相	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液																		
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>% B</th> <th>流量 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>10</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>50</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>5.0</td> <td>95</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>6.0</td> <td>95</td> <td>0.5</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	% B	流量 (mL/min)	0	10	0.5	0.5	10	0.5	4.5	50	0.5	5.0	95	0.5	6.0	95	0.5
時間 (分)	% B	流量 (mL/min)																	
0	10	0.5																	
0.5	10	0.5																	
4.5	50	0.5																	
5.0	95	0.5																	
6.0	95	0.5																	
ストップタイム	8.5 分																		

MS 条件

パラメータ	設定値
ポジティブ/ネガティブモード	ポジティブ
フラグメンタ	380 V
セル加速電圧	3
ガス温度	210
ガス流	13 L/min
ネブライザ	35 psi
ソースガスヒーター	400
ソースガス流量	12
キャピラリー	3,500 V
デルタ EMV (+)	400

MRM のパラメータ

成分	リテンションタイム (分)	イオンランジション (m/z)	コリジョンエネルギー (eV)
DMZ	2.54	142 → 96	21
		142 → 81	33
DMZ-D3	2.52	145 → 99	17
MNZ	2.17	172 → 128	13
		172 → 82	25
MNZ-D4	2.15	176 → 128	15
MNZOH	1.83	188 → 123	13
		188 → 126	21
MNZOH-D2	1.82	190 → 128	17
HMMNI	2.18	158 → 55	18
		158 → 140	13
IPZ	4.35	170 → 109	25
		170 → 124	33
IPZOH	3.46	186 → 168	13
		186 → 121	29
RNZ	2.58	201 → 140	9
		201 → 55	25

サンプル前処理

図 3 は、サンプル前処理の手順を示しています。卵サンプルは十分に混ぜて正確に計量しました (5 g)。次に、抽出のために 5 % ギ酸を ACN に加えました。より良好なタンパク質沈殿処理を実現するために、高濃度のギ酸が必要でした。これは、より多量の沈殿物が形成されることによって確認できます。卵サンプルから極性干渉物をクリーンアップするために、4 g の Na₂SO₄ と 1 g の NaCl を用いた QuEChERS 抽出を選択しました。遠心分離の後、上部アセトニトリル層 (2.4 mL) を新しいチューブに移して 0.6 mL の水 (容量で 20 % の水) で希釈し、十分にボルテックスしました。次に、この混合溶液を 3 mL Captiva EMR-Lipid チューブにロードし、自然落下で流しました。その後、カートリッジを真空中で乾燥させました。最後に、溶出液を採取して攪拌し、注入の準備が完了しました。

キャリブレーション標準と品質管理 (QC) サンプル

検量線を作成するための溶媒標準溶液を、0.1、0.5、1、5、10、50、100 ng/g で準備しました。DMZ-D3、MNZ-D4、MNZOH-D2 を含んだ内部標準混合物を 10 ng/g でスパイクしました。

適切な標準液を低 (1 ng/g)、中 (5 ng/g)、高 (10 ng/g) のレベルで、均質化した卵サンプルにスパイクすることにより、プレススパイクした QC サンプルを 6 点ずつ作成しました。

結果と考察

直線性

データは Agilent MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。7 種類のニトロイミダゾール類および代謝物に対して、直線回帰と 1/x の重み付けを使用した場合の検量線の R² 値は 0.993 ~ 0.995 でした。

回収率と精度の結果

表 1 は、QuEChERS 抽出とその後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップメソッドを、3 つの QC レベルでスパイクしたサンプルを分析することによって確認した結果を示しています。回収率は 86.5 ~ 118.3 %、RSD は <6 % でした。利用できる内部標準が限られているため、MNZOH は MNOH-D3 で、MNZ は MNZ-D4 で、DMZ、RNZ、IPZ、IPZOH は DMZ-D3 でキャリブレーションしました。HMMNI は、その異なる化学特性のために、内部標準によるキャリブレーションは行いませんでした。

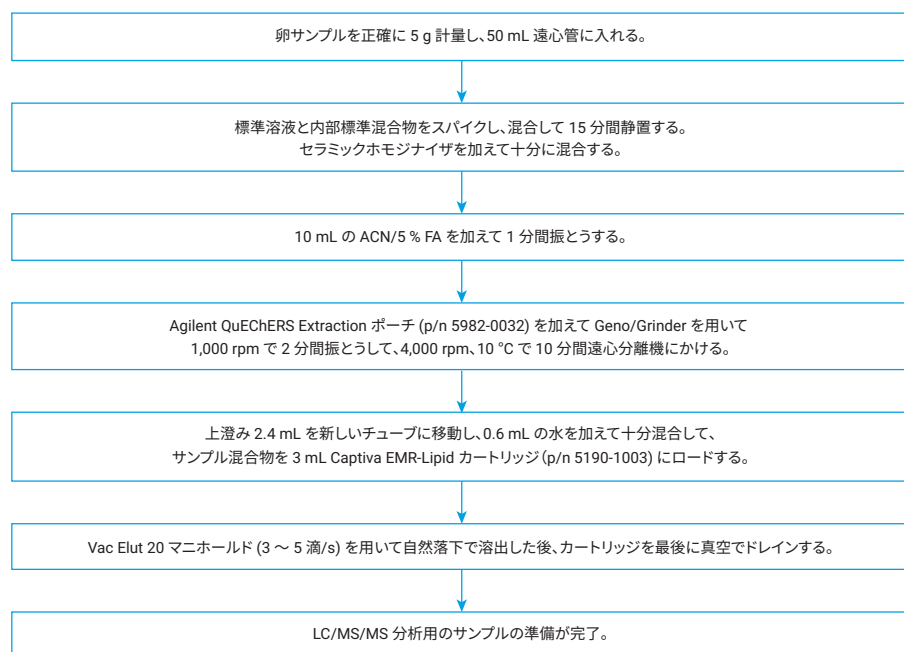


図 3. 卵のサンプル抽出とその後の Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジを使用したクリーンアップ

表 1. 卵の 3 つの QC レベルでのメソッドの定量結果

成分	R ²	直線範囲 (ng/g)	1 ng/g QC (n = 6)		5 ng/g QC (n = 6)		10 ng/g QC (n = 6)	
			回収率 %	RSD%	回収率 %	RSD%	回収率 %	RSD%
DMZ	0.994	0.1 ~ 50	89.6	3.2	89.6	2.4	88.8	2.6
HMMNI	0.993	0.5 ~ 100	118.3	4.7	103.9	4.3	110.9	2.5
IPZ	0.994	0.1 ~ 50	93.3	3.5	93.1	2.9	93.0	3.0
IPZOH	0.995	0.1 ~ 50	94.2	5.0	91.3	3.5	90.0	3.3
MNZ	0.994	0.1 ~ 50	91.5	3.5	87.6	3.7	86.5	3.6
MNZOH	0.995	0.1 ~ 50	94.3	5.4	88.4	4.8	87.3	3.4
RNZ	0.994	0.1 ~ 50	99.3	5.9	99.7	3.5	98.9	3.4

GC/MS によるマトリックス除去の モニタリング

卵はタンパク質とさまざまな種類の脂質を含んでいます。図 4 は、Captive EMR-Lipid クリーンアップを使用した場合と使用しなかった場合の GC/MS フルスキャンを比較した結果です。赤色のクロマトグラムは酸性のアセトニトリル抽出のみ、黒色のクロマトグラムは酸性のアセトニトリル抽出の後に Captive EMR-Lipid クリーンアップした場合の分析結

果を示しています。このクロマトグラムから、EMR-Lipid によってマトリックスの 76 % が除去されたことがわかります。この値は、2 つの条件下の総ピーク面積を比較することによって計算しました。図 5 は、この 2 つの異なる条件を使用した前処理後の乾燥サンプルです。Captive EMR-Lipid でマトリックスと色素の大部分が除去されたことが、はっきりとわかります。

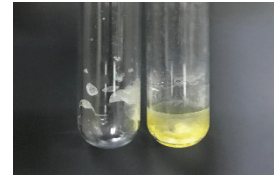


図 5. (左) 酸性の ACN での抽出後に Captive EMR-Lipid クリーンアップを実行し、乾燥させた卵サンプル。(右) 酸性の ACN での抽出のみを実行し、乾燥させた卵サンプル

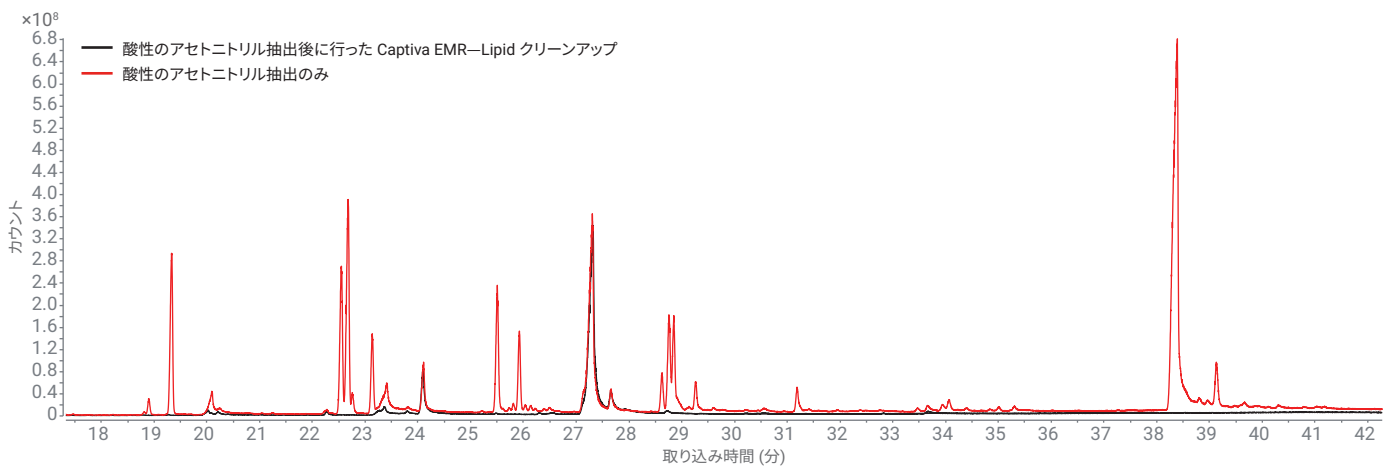


図 4. 溶媒抽出のみ実行した後 (赤色) と Captive EMR-Lipid クリーンアップと溶媒抽出を実行した後 (黒色) の卵サンプルの GC/MS フルスキャンクロマトグラム比較によるマトリックス除去の評価

結論

この分析から、卵中の動物用医薬品の分析において、Captiva EMR-Lipid によって効率よく簡単にクリーンアップを実行できることが示されました。7 種類のニトロイミダゾールと代謝物のバリデーションで、優れた回収率 (86.5 ~ 118.3 %) と精度 (RSD <6 %) が得られました。GC/MS フルスキャンでは、Captiva EMR-Lipid を使用することによって脂質および色素を極めて効率的にクリーンアップできることが示されました。総じて Captiva EMR-Lipid により、卵中の動物用医薬品分析において、分析対象物の回収率に悪影響を与えることなく、シンプルで選択性があり効率的な脂質/マトリックスの除去が可能になります。

参考文献

1. Establishment of MRLs of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation (EEC) no. 2377/90, Official Journal of the European Communities L224, **1990**.
2. Cronly, M.; *et al.* Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A* **2009**, *1216*, 8101–8109.
3. Granja, R.; *et al.* Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole, and their metabolites in bovine muscle by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2013**, *30*, 970–976.
4. Mitrowska, K.; Posyniak, A.; Zmudzki, J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma, and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **2010**, *81*, 1273–1280.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタム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. 2019
Printed in Japan, January 18, 2019
5994-0641JAJP

