

サケ中の動物用医薬品分析のための 高速サンプル前処理ワークフロー

Agilent Captiva EMR-Lipid および LC/MS/MS

著者

Xia Yang
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

サケに含まれる 7 クラス 53 種の薬物を分析するために、シンプルで迅速かつ堅牢なサンプル前処理ワークフローと分析メソッドを開発しました。これらの薬物は、水産養殖産業で幅広く使用されており、欧州、米国、カナダ、およびアジア各国で検査対象薬物に指定されています¹。1 ステップの溶媒抽出に続いて Agilent Captiva EMR-Lipid でパススルークリーンアップを行った後、その抽出液中の複数の動物用医薬品を分析しました。これにより得られた結果の回収率と精度は満足できるものでした。

装置および消耗品

- Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ、3 mL、300 mg (部品番号 5190-1003)
- SPEX SamplePrep 社 2010 Geno/Grinder (米国ニュージャージー州メアチエン)
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド、13 × 100 mm 試験管用コレクションラック付き (部品番号 12234101)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (部品番号 695975-302)
- Agilent 1290 Infinity LC
- Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS システム、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン源搭載

サンプルの前処理と最適化

サケは含水量が多いため、最終抽出液の組成がほぼ 80/20 ACN/水となるように、動物用医薬品の抽出溶媒として 9 mL の 80/5/5 アセトニトリル (ACN)/H₂O/ギ酸 (FA) をサンプルに加えしました。抽出溶媒は、3 種類の組成 (H₂O と、それぞれ 2 % FA、5 % FA、および FA なし) を評価し、抽出効率と回収率が最も高かった 5 % FA のものを使用しました (図 1)。

メソッドバリデーション

検量線作成用の溶媒標準溶液を濃度 0.1、0.5、1、5、10、20、50、および 100 ng/g で調製しました。対応する成分の選択的キャリブレーションを行うために、マラカイトグリーン-D₃、ロイコマラカイトグリーン-D₄、およびクロラムフェニコール-D₆ を含む内部標準混合液を 10 ng/g でスパイクしました。同じサンプル前処理ワークフローで処理したマトリックスブランクに標準溶液をスパイクし、マトリックス適合検量線を作成しました。

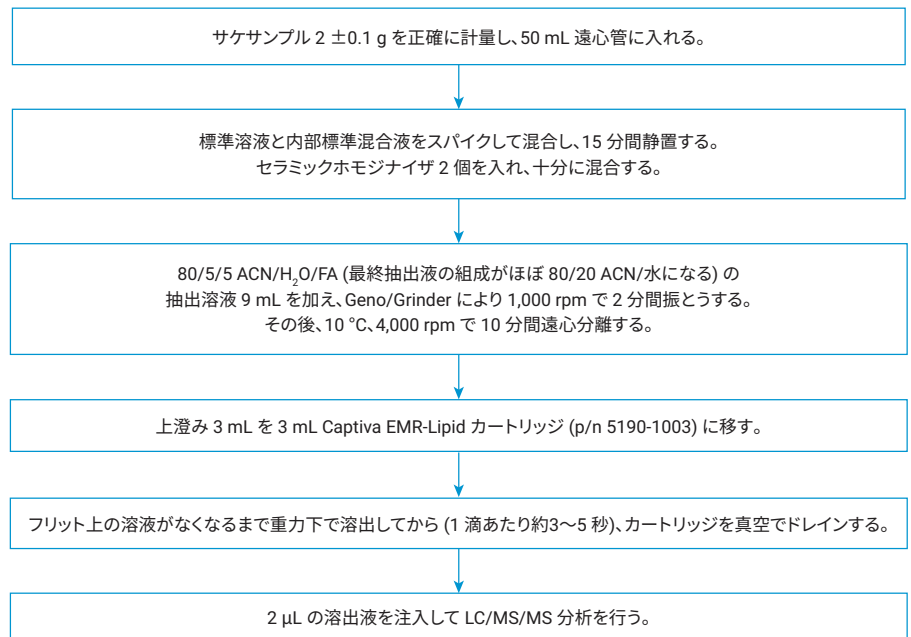


図 1. サケサンプルの抽出と Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジ (部品番号 5190-1003) によるクリーンアップ

検量線の定量下限と直線範囲をもとに、薬物を 3 つのグループに分けました。プレスバイク QC サンプルとして、ホモジナイズしたサケサンプルに適切な作業用標準溶液を低濃度、中濃度、高濃度でスパイクしたものをそれぞれ n=6 で調製しました。具体的なスパイク濃度は、グループ 1 については 5 ppb/10 ppb/50 ppb、グループ 2 については 1 ppb/10 ppb/50 ppb、グループ 3 については 1 ppb/5 ppb/50 ppb としました。

直線性

データは Agilent MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。1/x の重み付き回帰直線適合により求めた動物用医薬品の検量線の R² 値は、0.993 ~ 0.999 の範囲でした。

真度と精度の結果

真度と精度を確認するために、5 % FA と 80 % ACN による 1 ステップの溶媒抽出に続いて Captiva EMR-Lipid でパススルークリーンアップを行い、その抽出液に標準溶液をスパイクした 3 種類の QC 濃度のサンプルを分析しました。その結果を図 3 に示します。このメソッドの回収率は、60 ~ 120 % でした。今回調査した 53 種類の動物用医薬品については、3 種類の QC 濃度で得られた回収率のデータポイントの 96 % が 70 ~ 120 % の範囲内にあり、60 ~ 70 % だったのは残り 4 % のみでした。

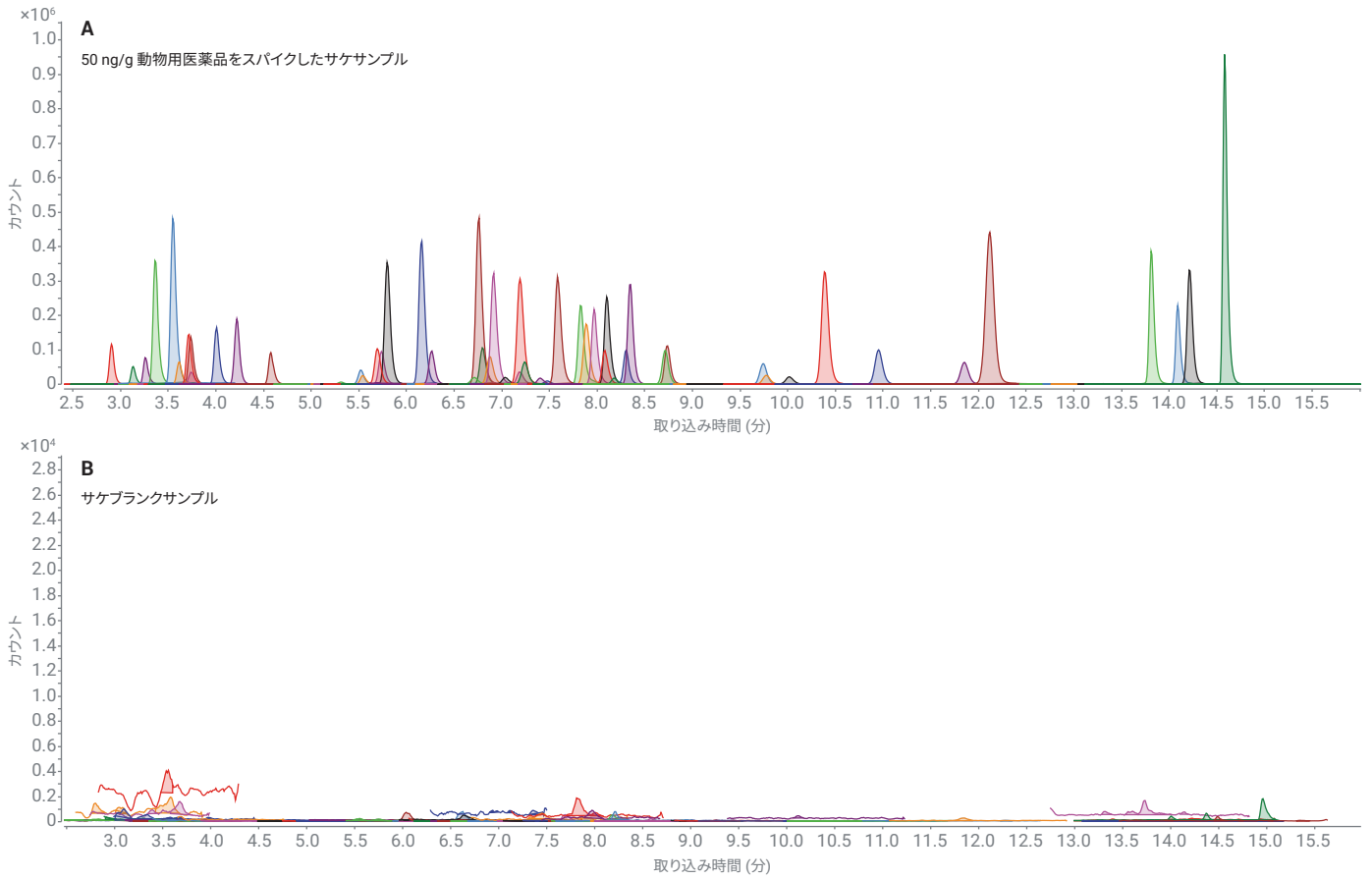


図 2. 50 ng/g 動物用医薬品標準溶液をスパイクしたサケ抽出液 (A) とサケ抽出液のマトリックスブランク (B) の LC/MS/MS クロマトグラム

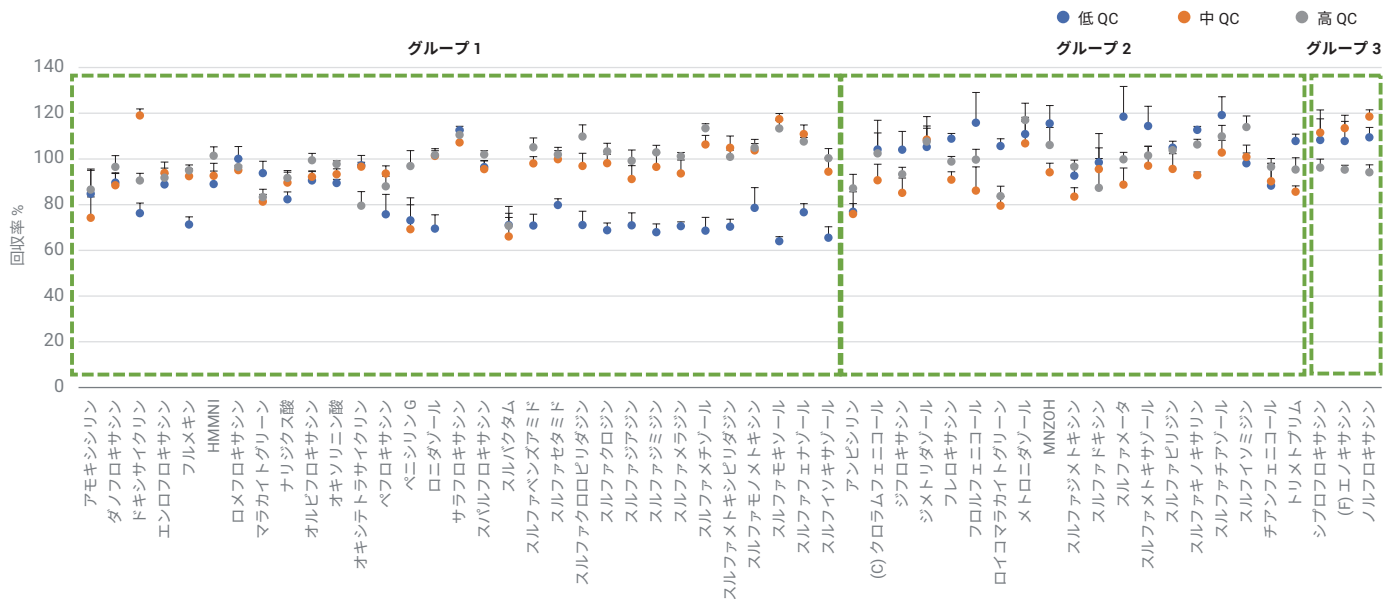


図 3. 3 種類の QC 濃度における調査対象のサケ中動物用医薬品 53 種の回収率および精度データ

結論

今回の実験により、この調査で使用した前処理メソッドが、サケに含まれる複数の動物用医薬品の分析に適した、簡単で迅速かつ堅牢なサンプル前処理ワークフローであることが実証されました。このワークフローに含まれるステップは、5 % FA を含む ACN 溶媒による 1 ステップ抽出と、Agilent Captiva EMR-Lipid を使用した重力下でのパススルークリーンアップの 2 つのみです。このメソッドにより、魚介類で一般的に試験対象となっている動物用医薬品クラスについて、十分に許容できる回収率と RSD が得られました。

参考文献

1. Love, D. C. *et al.* Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009. *Environmental Science and Technology* **2011**, 45, 7232–7240.

付録:MRM のパラメータ

分類	成分	リテンション タイム(分)	極性				
				定量の MRM	CE (V)	確認の MRM	CE (V)
サルファ剤	スルファベンズアミド	8.5	ポジティブ	277.1 → 155.9	12	277.1 → 92.0	36
	スルファセタミド	3.2	ポジティブ	215.0 → 156.0	8	215.0 → 108.0	16
	スルファクロロピリダジン	6.7	ポジティブ	285.0 → 156.0	12	285.0 → 108.1	24
	スルファクロジン	9.5	ポジティブ	285.0 → 155.9	20	285.0 → 108.1	24
	スルファジアジン	3.7	ポジティブ	251.1 → 92.1	28	251.1 → 108.1	20
	スルファジミジン	5.6	ポジティブ	279.1 → 92.1	38	279.1 → 186.1	12
	スルファメラジン	4.6	ポジティブ	265.1 → 92.1	28	265.1 → 156.0	12
	スルファメチゾール	5.7	ポジティブ	271.0 → 92.0	29	271.0 → 156.0	9
	スルファメキシピリダジン	6.2	ポジティブ	281.1 → 92.1	32	281.1 → 108.1	28
	スルファモノメトキシ	7.3	ポジティブ	281.0 → 126.0	20	281.0 → 156.0	10
	スルファモキソール	5.4	ポジティブ	268.1 → 155.9	20	268.1 → 112.5	24
	スルファフェナゾール	9.4	ポジティブ	315.1 → 158.1	40	315.1 → 92.0	40
	スルファイソキサゾール	7.9	ポジティブ	268.1 → 156.0	10	268.1 → 92.0	40
	スルファジメトキシ	10.4	ポジティブ	311.1 → 156.0	16	311.1 → 108.1	28
	スルファドキシ	7.7	ポジティブ	311.1 → 156.0	16	311.1 → 92.1	32
	スルファメータ	5.5	ポジティブ	281.1 → 92.0	40	281.1 → 215.1	20
	スルファメトキサゾール	7.1	ポジティブ	254.1 → 92.1	24	254.1 → 156.0	12
	スルファピリジン	4.2	ポジティブ	250.1 → 92.0	29	250.1 → 156.0	17
	スルファキノキサリン	11.2	ポジティブ	301.1 → 156.0	16	301.1 → 92.0	32
	スルファチアゾール	4.0	ポジティブ	256.0 → 156.0	12	256.0 → 92.1	28
スルファイソミジン	3.8	ポジティブ	279.1 → 124.1	20	279.1 → 186.0	20	
トリメブリン	5.6	ポジティブ	291.2 → 261.1	24	291.2 → 123.1	24	
テトラサイクリン	ドキシサイクリン	6.5	ポジティブ	445.2 → 410.0	24	445.2 → 428.1	16
	オキシテトラサイクリン	6.8	ポジティブ	461.2 → 426.1	14	461.2 → 201.1	48

分類	成分	リテンション タイム (分)	極性				
				定量の MRM	CE (V)	確認の MRM	CE (V)
キノロン	ダノフロキサシン	7.7	ポジティブ	358.2 → 340.1	20	358.2 → 82.1	48
	エンロフロキサシン	7.5	ポジティブ	360.2 → 316.2	16	360.2 → 342.2	20
	フルメキン	13.9	ポジティブ	262.1 → 244.1	12	262.1 → 202.0	32
	ロメフロキサシン	7.8	ポジティブ	352.2 → 308.2	16	352.2 → 265.0	20
	ナリジクス酸	13.6	ポジティブ	233.1 → 215.1	20	233.1 → 159.1	40
	オルビフロキサシン	8.1	ポジティブ	396.2 → 352.1	16	396.2 → 295.1	28
	オキソリニン酸	11.5	ポジティブ	262.1 → 243.9	16	262.1 → 159.9	40
	ペフロキサシン	6.5	ポジティブ	334.2 → 290.1	16	334.2 → 233.1	28
	サラフロキサシン	8.4	ポジティブ	386.1 → 368.1	20	386.1 → 342.1	20
	スパルフロキサシン	9.8	ポジティブ	393.2 → 349.0	20	393.2 → 375.2	20
	ジフロキサシン	8.0	ポジティブ	400.1 → 299.1	32	400.1 → 382.1	20
	フレロキサシン	6.0	ポジティブ	370.1 → 326.0	20	370.1 → 268.9	24
	シフロフロキサシン	7.3	ポジティブ	332.1 → 314.0	20	332.1 → 288.0	20
	エノキサシン	6.6	ポジティブ	321.1 → 303.3	16	321.1 → 231.8	40
	ノルフロキサシン	6.9	ポジティブ	320.1 → 302.1	20	320.1 → 282.1	40
ニトロイミダゾール	メトロニダゾール	3.4	ポジティブ	172.0 → 128.0	13	172.0 → 82.0	25
	MNZOH	3.0	ポジティブ	188.0 → 123.0	13	188.0 → 126.0	21
	HMMNI	3.3	ポジティブ	158.0 → 140.0	18	158.0 → 55.0	13
	ロニダゾール	3.8	ポジティブ	201.0 → 140.0	9	201.0 → 55.0	25
	ジメトリダゾール	3.6	ポジティブ	142.0 → 96.0	21	142.0 → 54.0	40
クロラムフェニコール	(C) クロラムフェニコール	9.8	ネガティブ	321.0 → 151.9	21	321.0 → 257.0	9
	フロルフエニコール	7.3	ネガティブ	356.0 → 185.1	12	356.0 → 336.0	0
	チアンフェニコール	5.3	ネガティブ	354.0 → 289.9	8	354.0 → 185.0	16
β-ラクタム	アモキシシリン	3.8	ポジティブ	366.1 → 349.1	4	366.1 → 114.1	32
	ペニシリン G	14.0	ポジティブ	335.1 → 160.1	8	335.1 → 176.0	8
	スルバクタム	3.8	ネガティブ	232.0 → 140.1	12	232.0 → 64.1	44
	アンピシリン	8.0	ポジティブ	350.0 → 106.0	16	350.0 → 114.0	36
マラカイトグリーン	マラカイトグリーン	14.3	ポジティブ	329.3 → 313.3	40	329.3 → 284.0	50
	ロイコマラカイトグリーン	14.2	ポジティブ	331.2 → 239.2	28	331.2 → 316.2	20

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, July 2, 2019
5994-1124JAJP

