# Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS によるウシ肝臓中の残留動物用医薬品の多成分同時分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

## 著者

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品であり、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) に使用できます。この充填剤は、共抽出されたマトリックスに対して非常に選択性が高くなっています。特に脂質の多いサンプル (脂肪含有量が 5 % を超える) で選択性があり、分析対象物の回収率に悪影響を与えることはありません。今回の実験では、ウシ肝臓中の 30 種の代表的な動物用医薬品の分析に、この新しい製品が適用できることを示しています。手順では、酸性アセトニトリルによって迅速かつ効率的なタンパク質沈殿抽出を実施し、続いて EMR Lipid dSPE と脱水キットを使用してさらにクリーンアップします。EMR Lipid プロトコルによって除去されたマトリックスの量は、共抽出物の質量と、ポストカラムインフュージョンの実験によって測定しました。他のマトリックスクリーンアップ製品と比較して、EMR Lipid dSPE では、より効果的にマトリックスを除去することができ、分析対象物の回収率が向上します。最適化された EMR Lipid メソッドにより、あらゆるレベルで、30 種の動物用医薬品すべてについて優れたクリーンアップと非常に高い真度および精度を実現し、高脂質サンプルの堅牢な分析を高速かつ効果的に実行します。

Agilent Technologies

## はじめに

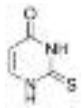
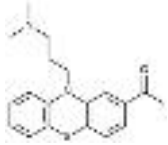
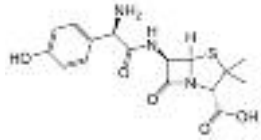
動物用医薬品は、病気の予防のため、または成長促進のために、食糧生産業界で動物に対して広く使用されています。これらの薬品は、動物の組織に蓄積します。不適切な使い方をすると、薬品の残留物が可食組織に蓄積する可能性があります。これは人間の健康に対するリスクになることが知られています。食品の安全性に対する注目度が高まったことから、ほぼすべての国で、食用動物の生産で使用される薬品を制限する規制が実施されています [1〜4]。

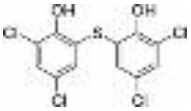
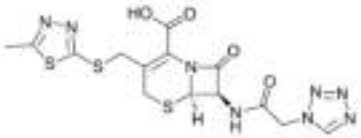
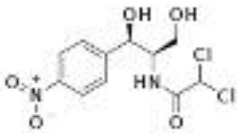
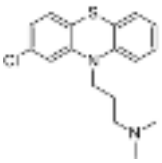
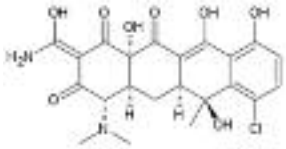
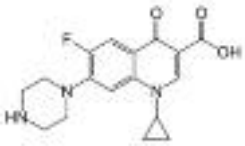
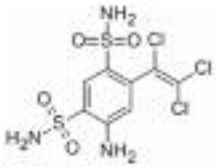
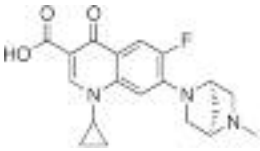
動物由来の食品 (筋肉、肝臓、卵など) は、通常、化学的に複雑であるため、一般的な抽出と効率的なクリーンアップを含む、効率的なサンプル前処理メソッドを適用することが非常に重要です。確立されたサンプル前処理メソッドとしては、従来から行われている溶媒抽出、固相抽出 (SPE)、または複数の手法の組み合わせなどがあります。それらのメソッドは、通常、作業量が多く、時間がかかり、限られたクラスの化合物のみに適しており、追加的なメソッド開発も必要とします。

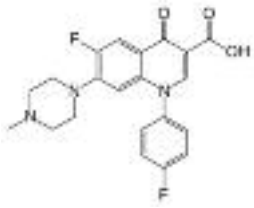
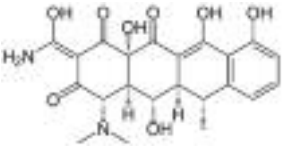
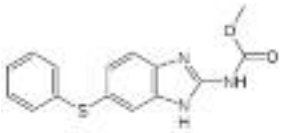
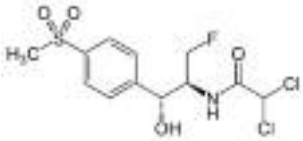
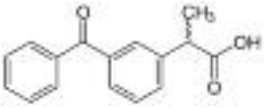
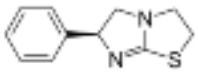
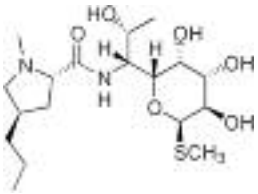
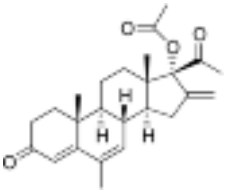
複数の種類の多成分残留物を対象とするメソッドが、法規制に基づく監視プログラムでますます使用されるようになっています。分析範囲が広く、ラボの効率を向上させるためです。監視対象の動物用医薬品の数は、この数年間で増加しており、現在では 100 を超える薬品が報告されています [5〜8]。サンプル前処理では、通常、アセトニトリルと水の混合液を使用した抽出が行われ、続いて C18 クリーンアップまたはその他のクリーンアップ手法、あるいはその両方が実施されます。C18 などの充填剤を使用した場合、共抽出された脂質の除去は限られています。そのため、希釈時または再溶解時に最終サンプルで沈殿が見られる可能性があります。沈殿物が生成されると、LC/MS/MS 注入の前にサンプルろ過が必要になり、分析対象成分が失われる可能性があります。分散固相抽出 (dSPE) 中にヘキサンを追加して、共抽出された脂質を除去できますが、これは選択性に欠け、時間がかかり、また疎水性物質を除去することになります。ジルコニア充填剤をクリーンアップに使用すると、C18 と比較してマトリックスのクリーンアップが改善されますが、フルオロキノロン、テトラサイクリン、およびマクロライドなどの、カルボン酸含有化合物やヒドロキシル含有化合物の場合は特に、分析対象成分が失われる量が増えます [7、8]。

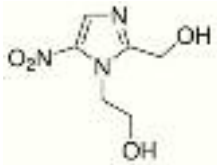
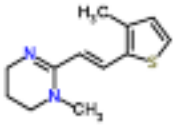
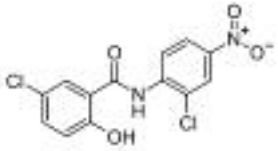
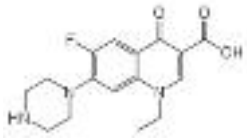
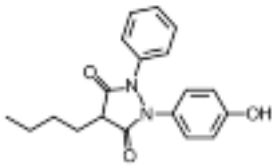
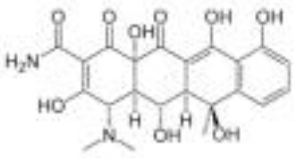
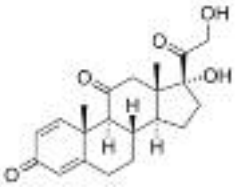
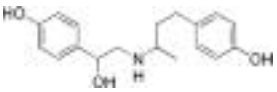
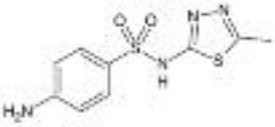
Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、分析対象の不要な保持を発生させずに、サンプルから主要な脂質類を選択的に除去する、まったく新しい充填剤です。複雑なマトリックスから脂質の干渉を除去することは、QuEChERS やタンパク質沈殿などの手法で特に重要になります。これらの単純なサンプル前処理メソッドでは、脂質の大半を除去することはできないため、共抽出物は、ターゲット化合物を含む最終サンプル抽出に残ります。これにより、クロマトグラフに異常が見られたり、データの精度および真度が低下したり、メンテナンス上の問題が増加したりすることになります。この実験では、ウシ肝臓中の分析が難しい 30 種の代表的な動物用医薬品を分析するための、新しいサンプル前処理のアプローチを調査しています。その際に、単純なタンパク質沈殿抽出の後に EMR Lipid によるクリーンアップを使用します。親水性から疎水性、酸性、中性、塩基性の薬物など、17 個の異なるクラスから、代表的な動物用医薬品を選択しました。表 1 に、これらの動物用医薬品の化学情報および規制情報を示しています。

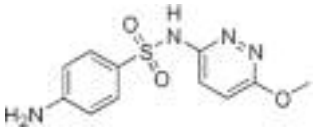
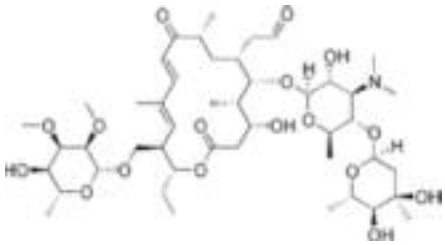
表 1. 動物用医薬品の化学的性質と物理的性質

| 名前 | 薬物クラス | Log P | pKa | 分子式 | 構造 | 米国の許容値 (µg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-チオウラシル | Thyreostat | –0.28 | 7.75 | $C_4H_4N_2OS$ |  | 該当なし |
| アセトプロマジン | トランキライザー | 3.49 | 9.3 | $C_{19}H_{22}N_2OS$ |  | 該当なし |
| アモキシシリン | b-ラクタム | 0.86 | 2.4 | $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ |  | 0.01 |

| 名前 | 薬物クラス | Log P | pKa | 分子式 | 構造 | 米国の許容値 (µg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ビチオノール | フルキシド | 5.51 | 4.82 | $C_{12}H_6Cl_4O_2S$ |  | 該当なし |
| セファゾリン | セファロスポリン | –1.5 | 2.3 | $C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$ |  | 該当なし |
| クロラムフェニコール | フェニコール | 1.14 | 5.5 | $C_{11}H_{12}C_{12}N_2O_5$ |  | (c) |
| クロルプロマジン | トランキライザー | 5.20 | 9.3 | $C_{17}H_{19}ClN_2S$ |  | 該当なし |
| クロルテトラサイクリン | テトラサイクリン | 0.24 | 3.3, 7.4, 9.3 | $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ |  | 2 (d) |
| シプロフロキサシン | フルオロキノロン | 0.28 | 6.09, 8.74 | $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ |  | (c) |
| クロルスロン | フルキシド | 1.25 | – | $C_6H_8Cl_3N_3O_4S_2$ |  | 0.1 (e) |
| ダノフロキサシン | フルオロキノロン | 1.2 | 6.04 | $C_{19}H_{20}FN_3O_3$ |  | 0.02 (a, e) |

| 名前 | 薬物クラス | Log P | pKa | 分子式 | 構造 | 米国の許容値 (µg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ジフロキサシン | b-ラクタム | 2.78 | 5.85 | $C_{21}H_{19}F_2N_3O_3$ |  | 該当なし |
| ドキシサイクリン | テトラサイクリン | –0.54 | 3.4 | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ |  | 該当なし |
| フェンベンダゾール | 駆虫薬 | 3.75 | 10.27 | $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ |  | 0.4 (e、h)、2 (b) |
| フロルフェニコール | フェニコール | –0.12 | 10.73 | $C_{12}H_{14}C_{12}FNO_4S$ |  | 0.2 (b) |
| ケトプロフェン | トランキライザー | 2.81 | 3.88 | $C_{16}H_{14}O_3$ |  | 該当なし |
| レバミゾール | 駆虫薬 | 1.85 | 8.0 | $C_{11}H_{12}N_2S$ |  | 0.1 (e) |
| リンコマイシン | リンコサミド | 0.91 | 7.8 | $C_{18}H_{34}N_2O_6S$ |  | 0.1(b) |
| 酢酸メレンゲステロール (MGA) | その他 | 4.21 | 11.42 | $C_{25}H_{32}O_4$ |  | 0.025 (g) |

| 名前 | 薬物クラス | Log P | pKa | 分子式 | 構造 | 米国の許容値 (µg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ミソニダゾール-OH | ニトロイミダゾール | –0.81 | 3.09 | $C_6H_9N_3O_4$ |  | (c) |
| モランテル | 駆虫薬 | 1.97 | >12 | $C_{12}H_{16}N_2S$ |  | 該当なし |
| ニクロサミド | フルキシド | 5.41 | 5.6 | $C_{13}H_8C_{12}N_2O_4$ |  | 該当なし |
| ノルフロキサシン | フルオロキノロン | 0.82 | 6.32 | $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ |  | (c) |
| オキシフェニルブタゾン | NSAID | 2.72 | 4.87 | $C_{19}H_{20}N_2O_3$ |  | 該当なし |
| オキシテトラサイクリン | テトラサイクリン | –1.5 | 3.27 | $C_{22}H_{24}N_2O_9$ |  | 2 (d) |
| プレドニゾン | コルチコステロイド | 1.57 | 12.58 | $C_{21}H_{26}O_5$ |  | 該当なし |
| ラクトパミン | b-アゴニスト | 1.65 | 9.4 | $C_{18}H_{23}NO_3$ |  | 0.03 (e) |
| スルファメチゾール | スルホンアミド | 0.51 | 5.45 | $C_9H_{10}N_4O_2S_2$ |  | N.A |

| 名前 | 薬物クラス | Log P | pKa | 分子式 | 構造 | 米国の許容値 (µg/g) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| スルファメトキシピリダジン | スルホンアミド | 0.32 | 6.7 | $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ |  | 該当なし |
| チロシン | マクロライド | 3.27 | 7.7 | $C_{46}H_{77}NO_{17}$ |  | 0.2 (f) |

a ウシ肝臓における許容値 (ツラスロマイシンの場合、マーカー残留物が規定されています)
b ブタの筋肉における許容値
c 適用外使用の禁止
d 許容値は、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびテトラサイクリンを含む、筋肉中のテトラサイクリンの残留量の合計です。
e ウシ筋肉中の許容値
f 未調理のウシの脂肪、筋肉、肝臓、および腎臓における許容値
g ウシの脂肪における許容値
h ヤギの筋肉における許容値

## 実験方法

すべての試薬と溶媒は、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) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。ジメチルスルホキシド (DMSO)、動物用医薬品標準液、および内部標準液は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。試薬グレードのギ酸 (FA) は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-86060)。酢酸アンモニウム ($NH_4OAc$) は Fisher Chemicals (フェアローン、ニュージャージー州、米国) から入手しました。

## 溶液および標準試料

ギ酸 (5 %) のアセトニトリル溶液は、5 mL のギ酸を 95 mL のアセトニトリルに加えることによって、新しく調製しました。酢酸アンモニウムの原液 (1 M) は、19.27 g の $NH_4OAc$ を 250 mL のミリ Q 水に溶解させて作成しました。この溶液は 4 °C で保管しました。5 mM の酢酸アンモニウム水溶液は、1 L のミリ Q 水に 1 M の酢酸アンモニウムを 5 mL 加えて作成しました。

標準原液および内部標準 (IS) 原液は、DMSO を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。ただし、DMSO を使用した 1.0 mg/mL のダノフロキサシン原液と DMSO を使用した 0.25 mg/mL のシプロフロキサシン原液は除きます。アモキシシリンおよびセファゾリンの原液は、水を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。プラスチックバイアルを使用したアモキシシリンおよびセファゾリンの原液を除き、すべての原液を、茶色ガラス製バイアルで調製しました。すべての原液は –20 °C で保管しました。30 種の化合物は、機器の反応に基づいて G1 および G2 という 2 つのグループに割り振りました。混合した 25/5 µg/mL (G1/G2) 標準作業用溶液は、1/1 のアセトニトリルと水で調製しました。フルニキシン-$d_3$ IS 作業用溶液 (25 µg/mL) は、1/1 のアセトニトリルと水で調製しました。

## 装置

サンプル前処理法用に使用した機器および材料は以下のとおりです。

- ジェノグラインダー (SPEX、メアチェン、ニュージャージー州、米国)
- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- エッペンドルフ微小遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- ボトルトップ型ディスペンサ (VWR、サウスプレインフィールド、ニュージャージー州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Agilent Bond Elut EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010)、Agilent Bond Elut EMR 脱水キット (部品番号 5982-0101)

## 使用機器

分析には、以下で構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプ (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付き Agilent1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)、および Agilent1290 Infinity サーモスタットカラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソースと iFunnel 技術を搭載した Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムに連結しました。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。

## 機器条件

### HPLC 条件

| | |
|---|---|
| カラム: | Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、2.7 µm (部品番号 693775-902)、Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard、2.1 × 5 mm、2.7 µm (部品番号 821725-911) |
| 移動相: | A) 0.1 % FA 水溶液<br>B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液 |
| 流量: | 0.3 mL/min |
| カラム温度: | 40 °C |
| オートサンプラ温度: | 4 °C |
| 注入量: | 3 µL |
| ニードル洗浄: | 1:1:1:1、ACN:MeOH:IPA:H2O と 0.2 % FA |

グラジエント:

| 時間 (分) | %B |
|---|---|
| 0 | 10 |
| 0.5 | 10 |
| 8.0 | 100 |

| | |
|---|---|
| ストップタイム: | 12 分 |
| ポストタイム: | 3 分 |

### 条件、MS

ポジティブ/ネガティブモード

| | |
|---|---|
| ガス温度: | 120 °C |
| ガス流量: | 14 L/min |
| ネブライザ: | 40 psi |
| シースガスヒーター: | 400 °C |
| シースガス流量: | 12 L/min |
| キャピラリ: | 3,000 V |

| iFunnel パラメータ: | | ポジティブ | ネガティブ |
|---|---|---|---|
| | 高圧 RF | 90 V | 90 V |
| | 低圧 RF | 70 V | 60 V |

分析対象成分に関連する MS DMRM 条件を表 2 に示し、典型的なサンプルクロマトグラムを図 1 に示します。

## サンプル前処理

最終のサンプル前処理手順は、次のステップを使用して最適化しました。

1. ホモジナイズしたウシ肝臓を 2 g (±0.1 g) 計量し、50 mL の遠心管に入れる
2. 10 mL の酸性アセトニトリル (5 % の FA を含む) を追加する
3. サンプルを振とう機で 2 分間混合する
4. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
5. 5 mL の酢酸アンモニウム緩衝液 (5 mM) を 15 mL の EMR Lipid 分散キットに入れる
6. 上澄み 5 mL を EMR Lipid 分散キットに移す
7. 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを撹拌した後、さらに 60 秒間、マルチポジションボルテクサテーブルで混合する
8. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
9. 上澄み 5 mL を塩 (1:4、NaCl:MgSO4) 2 g を含む 15 mL の EMR Lipid 脱水キットに移し、1 分間ボルテックスミキサーで撹拌する
10. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
11. アセトニトリル 層の上部 200 µL と水 800 µL を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで撹拌する

表 2.ターゲット化合物の LC/MS/MS DMRM パラメータおよびリテンションタイム

| 分析対象成分 | RT (分) | デルタ RT (分) | 極性 | プリカーサ イオン (m/z) | プロダクトイオン 定量 イオン | CE (V) | 定性 イオン | CE (V) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-チオウラシル | 1.41 | 2 | ネガティブ | 127 | 57.9 | 17 | – | – |
| アモキシシリン | 1.84 | 2 | ポジティブ | 366.1 | 349.2 | 5 | 114 | 25 |
| ミソニダゾール-OH | 2.07 | 2 | ポジティブ | 188.1 | 123.1 | 9 | 126.1 | 13 |
| レバミゾール | 3.4 | 2 | ポジティブ | 205.1 | 178.1 | 21 | 91.1 | 41 |
| リンコマイシン | 3.35 | 2 | ポジティブ | 407.2 | 126.1 | 37 | 70.1 | 80 |
| ノルフロキサシン | 4.22 | 2 | ポジティブ | 320.1 | 302.2 | 21 | 276.1 | 17 |
| オキシテトラサイクリン | 4.24 | 2 | ポジティブ | 461.2 | 426.1 | 17 | 443.2 | 9 |
| シプロフロキサシン | 4.31 | 2 | ポジティブ | 332.1 | 231 | 45 | 314.3 | 21 |
| ダノフロキサシン | 4.42 | 2 | ポジティブ | 358.2 | 340.2 | 21 | 81.9 | 53 |
| ラクトパミン | 4.4 | 2 | ポジティブ | 302.2 | 107 | 33 | 77 | 77 |
| モランテル | 4.9 | 2 | ポジティブ | 221.1 | 123.1 | 37 | 76.9 | 80 |
| セファゾリン | 4.65 | 2 | ポジティブ | 455 | 323.1 | 9 | 156 | 13 |
| スルファメチゾール | 4.65 | 2 | ポジティブ | 271 | 156.1 | 13 | 92 | 29 |
| スルファメトキシピリダジン | 4.69 | 2 | ポジティブ | 281.1 | 92 | 33 | 65.1 | 57 |
| ジフロキサシン | 4.83 | 2 | ポジティブ | 400.2 | 382 | 25 | 356.3 | 17 |
| クロルテトラサイクリン | 5.11 | 2 | ポジティブ | 479.1 | 444.2 | 21 | 462.1 | 17 |
| ドキシサイクリン | 5.24 | 2 | ポジティブ | 445.2 | 428.1 | 17 | 410.2 | 25 |
| フロルフェニコール | 5.47 | 2 | ネガティブ | 300.1 | 268.1 | 25 | 159.1 | 41 |
| クロラムフェニコール | 5.68 | 2 | ネガティブ | 321 | 152 | 17 | 257.1 | 9 |
| チロシン | 5.85 | 2 | ポジティブ | 916.5 | 173.9 | 45 | 772.5 | 33 |
| クロルスロン | 5.86 | 2 | ネガティブ | 377.9 | 341.9 | 9 | – | – |
| プレドニゾン | 5.88 | 2 | ポジティブ | 359.2 | 147.2 | 33 | 341.2 | 9 |
| アセトプロマジン | 5.93 | 2 | ポジティブ | 327.2 | 86 | 21 | 58 | 45 |
| クロルプロマジン | 6.49 | 2 | ポジティブ | 319.1 | 86 | 21 | 58.1 | 45 |
| フェンベンダゾール | 6.77 | 2 | ポジティブ | 300.1 | 268.1 | 25 | 159.1 | 41 |
| ケトプロフェン | 6.8 | 2 | ポジティブ | 255.1 | 208.9 | 13 | 77 | 57 |
| オキシフェンブタゾン | 7.27 | 2 | ネガティブ | 323.1 | 133.9 | 25 | 295 | 17 |
| フルニキシン-$d_3$ (NEG) | 7.53 | 2 | ネガティブ | 298.1 | 254.2 | 17 | 192 | 37 |
| フルニキシン-$d_3$ (POS) | 7.53 | 2 | ポジティブ | 300.1 | 282 | 25 | 264 | 41 |
| 酢酸メレンゲストロール | 8.78 | 2 | ポジティブ | 397.2 | 337.4 | 13 | 279.2 | 21 |
| ニクロサミド | 8.82 | 2 | ネガティブ | 325 | 170.9 | 25 | 289.1 | 13 |
| ビチオノール | 9.49 | 2 | ネガティブ | 352.9 | 161 | 21 | 191.8 | 25 |

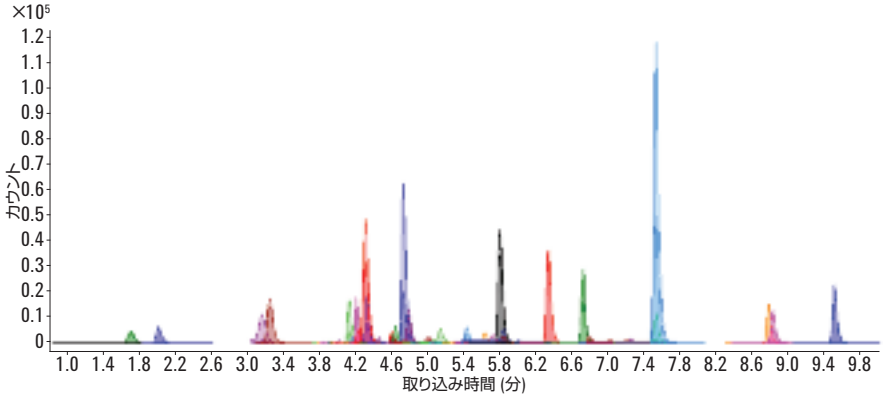



図 1. 50 ng/g の動物用医薬品標準液を添加し、タンパク質沈殿で抽出した後 Agilent Bond Elut EMR Lipid でクリーンアップしたウシ肝臓サンプルの典型的な LC/MS/MS サンプルクロマトグラム (DMRM)

これで、LC/MS/MS 分析の準備ができました。
図 2 にサンプル前処理法のフローを示します。

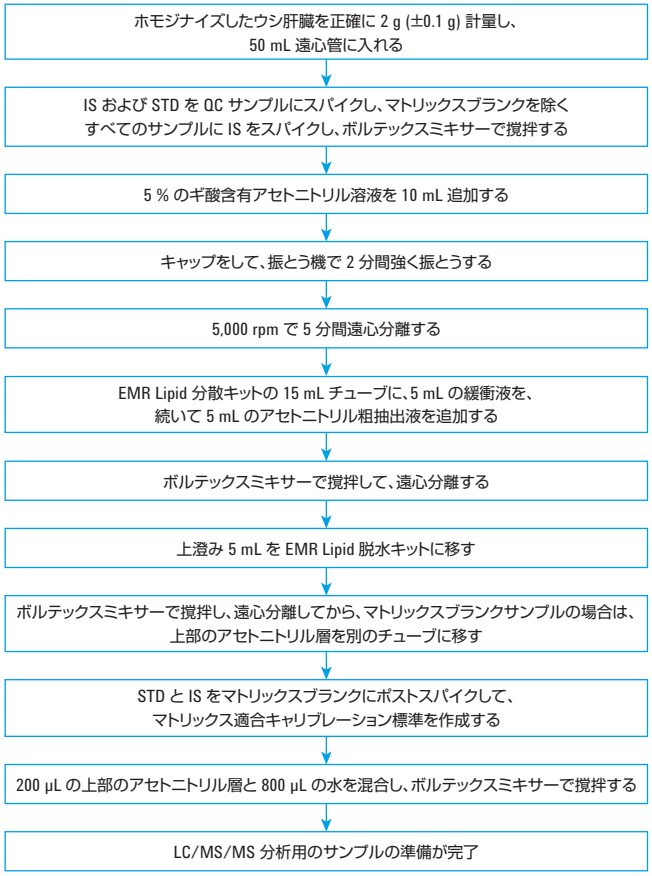



図 2. ウシ肝臓中の動物用医薬品の分析に Agilent Bond Elut EMR Lipid を使用するサンプル前処理手順

## キャリブレーション標準と品質管理サンプル

プレスパイクした QC サンプルを混合標準作業用溶液に適切に添加し、ステップ 1 以降を 6 回繰り返しました。G1 の分析対象成分については、QC サンプルは肝臓中の 10、50、250、および 750 ng/g に相当します。G2 の分析対象成分については、QC サンプルは肝臓中の 2、10、50、および 150 ng/g に相当します。IS 溶液をマトリックスブランク以外のすべてのサンプルにスパイクしました。これは肝臓中の 200 ng/g のフルニキシン-$d_3$ に相当します。

マトリックスキャリブレーション標準を標準および IS 作業用溶液を使用して調製しました。ステップ 8 の後のマトリックスブランクサンプルでの濃度は、肝臓中の 5、25、50、250、750、および 1,000 ng/g (G1)、肝臓中の 1、5、10、50、150、および 200 ng/g (G2)、肝臓中の 200 ng/g (IS) に相当します。

## 共抽出物量の測定

共抽出物の量は、C18、ジルコニア充填剤、および EMR Lipid という 3 つの異なるクリーンアップ手法について、重量測定法 [7] によって測定しました。サンプルは、以下のようにして準備しました。

1. ガラスチューブを約 1 時間以内 110 ℃で加熱し湿気を除去する
2. チューブを室温まで冷やす
3. テストチューブの質量をあらかじめ計る
4. 初期マトリックスブランク抽出物 (クリーンアップなし) 1 mL とさまざまなクリーンアップありのマトリックスブランクをそれぞれ 2 回同じ方法で正確に移す
5. 遠心濃縮機を 50 ℃にしてすべてのサンプルを 1 時間または乾燥するまで乾かす
6. ガラスチューブを約 1 時間以内 110 ℃で加熱し湿気を除去する
7. チューブを室温まで冷やす
8. チューブの質量をもう一度量る

ステップ 8 の後とステップ 3 の後の質量の差はサンプルの共溶出物の質量です。クリーンアップで除去された共溶出物の量はクリーンアップの前後のマトリックス共溶出の平均質量差でした。

## マトリックス効果の評価

ポストカラムインフュージョンの実験により、クロマトグラフのマトリックス効果を評価しました。10 ppb の動物用医薬品の標準原液の同時ポストカラムインフュージョンを 60 µL/min で実行して、マトリックスブランクサンプルを注入しました。化合物のすべてのトランジションを、LC サイクル全体にわたって監視しました。

さらに、分析対象成分の反応 (ピーク面積) を、ポストスパイクされた肝臓の抽出液と、同等の原液の間で比較しました。ポストスパイクされた肝臓の抽出液は、標準溶液をブランク肝臓マトリックス抽出液にポストスパイクすることによって作成しました。反応 (ピーク面積) の差は、マトリックス効果と直接相関しています。

## メソッドの最適化、バリデーション、および比較

さまざまな最適化テストを評価しました。タンパク質沈殿については 5 % の FA のアセトニトリル溶液と 1 % の FA のアセトニトリル溶液、EMR Lipid クリーンアップについては酢酸アンモニウム緩衝液と水を比較し、EMR Lipid クリーンアップの実施後については脱水用塩を使用する場合と使用しない場合を比較しました。分析対象物の回収率、精度、およびその他の定量パラメータに基づいて、結果を評価しました。その後、再作成した検量線標準ですべての QC サンプルをひとつにまとめた完全な定量バッチを実行して、最適化された最終メソッドを検証しました。

回収率の比較データは、肝臓サンプルを 50 ng/g でプレスパイクおよびポストスパイクすることによって収集しました。その後、抽出物は、許容できるクリーンアッププロトコルを使用して処理されました。タンパク質沈殿を実施する EMR Lipid プロトコルには、図 2 で説明するクリーンアップ手順を採用しました。QuEChERS には、以下のように C18 またはジルコニア充填剤の dSPE によるクリーンアップを使用しました。

1. 2 g の肝臓を量り、50 mL のチューブに入れる
2. 8 mL のリン酸緩衝液 (pH 7.0) および10 mL の酸性アセトニトリル (5% の FA) を追加する
3. サンプルを 30 秒間ボルテックスミキサーで撹拌する
4. 分離/抽出用の塩 (EN 法用) を追加し、振とう機で強く振とうする
5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する

さらにクリーンアップするために使用する未処理のアセトニトリルと肝臓の抽出液を、以下のように準備しました。

1. 1 mL の未処理のアセトニトリルと肝臓の抽出液を、25 mg の C18 と 150 mg の $MgSO_4$ が入っている 2 mL のバイアル (部品番号 5082-4021) に入れるか、100 mg のジルコニア充填剤が入っている 2 mL のバイアルに入れる
2. キャップをして 1 分間ボルテックスミキサーで撹拌する
3. 13,000 rpm で 3 分間遠心分離する (小型遠心分離)
4. 上澄み 200 µL を、800 µL の水が入っている別のバイアルに移す
5. 再生セルロースの 0.45 µm フィルタを使用して、ボルテックスミキサーで撹拌処理およびフィルタ処理を実施する

これで LC/MS/MS 分析用のサンプルの準備ができました。回収率は、プレスパイク済みサンプルとポストスパイク済みサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

## 結果と考察

### 共抽出の量

表 3 に、サンプル共抽出物の重量測定テストで得られた結果を示します。これは、C18 またはジルコニア充填剤を使用した dSPE と比較して、EMR Lipid dSPE のマトリックスクリーンアップの方が重量から見ると効率が良いことを明確に示しています。

表 3. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid、ジルコニア、および C18 によるクリーンアップによるウシ肝臓マトリックス共抽出物の重量測定結果

| クリーンアップ手法 | 1 mL のアセトニトリル最終抽出物別の共抽出物 (mg) (n = 2) | クリーンアップによるマトリックス共溶出物の除去効率 (%) |
|---|---|---|
| 追加クリーンアップなし | 12.1 | – |
| EMR Lipid dSPE | 5.3 | 56.2 |
| dSPE を使用したジルコニア分離 | 6.0 | 50.4 |
| C18 dSPE | 7.8 | 35.5 |

### マトリックス効果の評価

未処理のアセトニトリル抽出液と、EMR Lipid、C18、およびジルコニア充填剤でクリーンアップした 3 つの最終アセトニトリル抽出液におけるマトリックス効果の評価のために、動物用医薬品標準液のポストカラムインフュージョン (PCI) を使用しました。すべての分析対象成分を、LC サイクル全体にわたって監視しました。PCI サンプルクロマトグラムは、ポジティブモードとネガティブモードで監視された分析対象成分のマトリックス効果を反映しています。最終のアセトニトリル抽出液は、注入の前に希釈されていません。アセトニトリルは直接注入されました。PCI プロファイルは図 3 に示してあります。

赤いトレース線で示すように、いずれのクリーンアップも実施していない未処理の肝臓マトリックスブランクの注入で、かなりのマトリックス抑制 (低い方のベースライン) とマトリックス向上 (大きいピーク) が観察されました。これらのマトリックス効果は、メソッドの信頼性とデータ品質に、極めて大きい悪影響を及ぼします。それに対して、青いトレース線で示すように、EMR Lipid クリーンアップを使用した場合は大幅な改善が見られました。マトリックス抑制およびマトリックス向上が縮小していることが分かります。

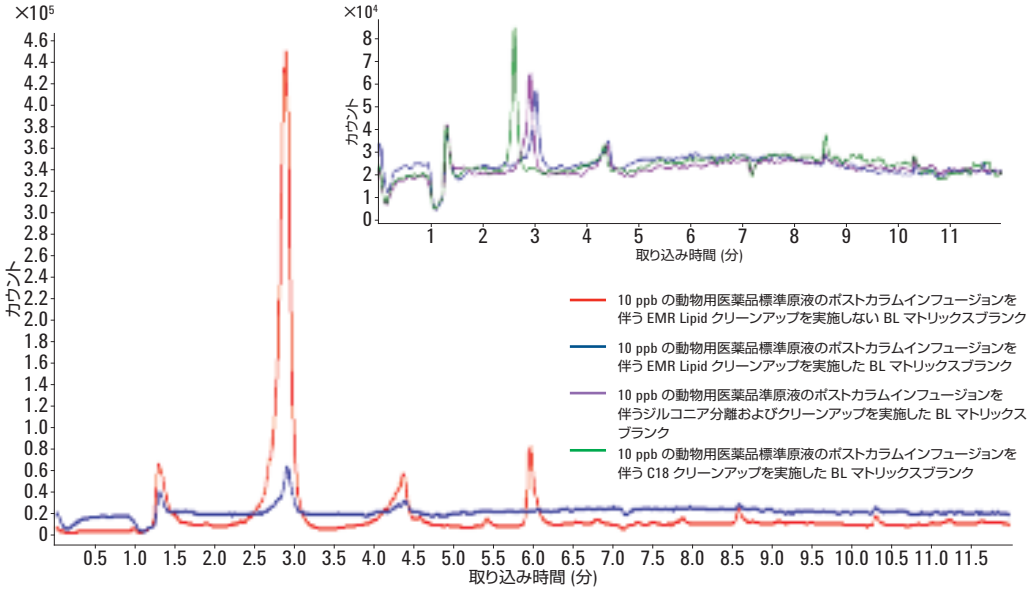



図 3. ポストカラムインフュージョンのプロファイルは、ウシ肝臓 (BL) マトリックスブランクサンプルを注入し、10 ppb の動物用医薬品標準溶液の同時ポストカラムインフュージョンを実施することによって生成しました。すべての分析対象成分を、クロマトグラフ分析のために監視しました。プロファイルは、監視されるすべての分析対象成分のトランジションを結合した全イオンクロマトグラムです。

図 3 のサンプルクロマトグラムのインサートは、異なるクリーンアップを使用してマトリックスブランクサンプルの注入を行った PCI プロファイルを示します。EMR Lipid のプロファイル (青) とジルコニア充填剤のプロファイル (紫) は似ています。C18 クリーンアップのプロファイル (緑) も、他の 2 つと似ていますが、マトリックス向上とマトリックス抑制の領域が大きくなっています。この比較は、重量測定の共抽出評価の比較 (EMR Lipid クリーンアップの方がジルコニア充填剤よりもややクリーンアップ効率が良いが、これらはどちらも C18 よりもクリーンアップ効率が良い) に相当します。

マトリックス効果を評価するために、ポストスパイクされたマトリックスサンプルと標準原液の間での分析対象成分の反応の比較も使用しました。ほとんどの分析対象成分について、分析対象成分の反応に目立った差はありませんでした。ただし、より疎水性のある、後から溶出した化合物については、C18 とジルコニア充填剤によってクリーンアップしたサンプルの方が、多くのマトリックス抑制が見られました。ほとんどの脂質夾雑物は遅く溶出されます。そのため、疎水性物質でのマトリックスイオン抑制が減少したことで、dSPE C18 およびジルコニア充填剤と比較して、共抽出された脂質を EMR Lipid が効率的に除去することが裏付けられています。図 4 では、EMR Lipid によるクリーンアップで、どのようにマトリックスイオン抑制効果が削減されたかについて、2 つの例を示しています。

## メソッドの最適化

タンパク質沈殿ステップで使用した溶媒も調査しました。サンプルと有機物の比率が 1:3〜1:5 である場合に、アセトニトリルがタンパク質を効率よく沈殿させること、および酸性アセトニトリルの方がタンパク質が沈殿しやすいことは知られています。BL は複雑なマトリックスであり、タンパク質の除去は、マトリックス除去のためだけでなく、効率的な EMR Lipid クリーンアップを促進するためにも非常に重要です。この調査では、1 % および 5 % の FA のアセトニトリル溶液を、タンパク質沈殿ステップとそれに続く EMR Lipid クリーンアップ、および LC/MS/MS による分析で評価しました。5 % の FA のアセトニトリル溶液を使用すると、検量線に示すように精度が向上しました (図 5)。分析対象物の回収率も比較しました。ここでも 5 % の FA のアセトニトリル溶液の方が精度が高くなっています。

水または緩衝液を追加して EMR Lipid 材料を活性化することは重要です。これにより、望ましくないサンプルマトリックス (特に脂質) との相互作用が改善され、効率的なマトリックス除去につながります。EMR Lipid によるクリーンアップ中に酢酸アンモニウム緩衝液 (5 mM) を使用した場合の効果を調査し、水を使用した場合と結果を比較しました。一般に、酢酸アンモニウム緩衝液を使用すると、テトラサイクリンを除く多くの分析対象物で、回収率が 5〜10 % 向上します。

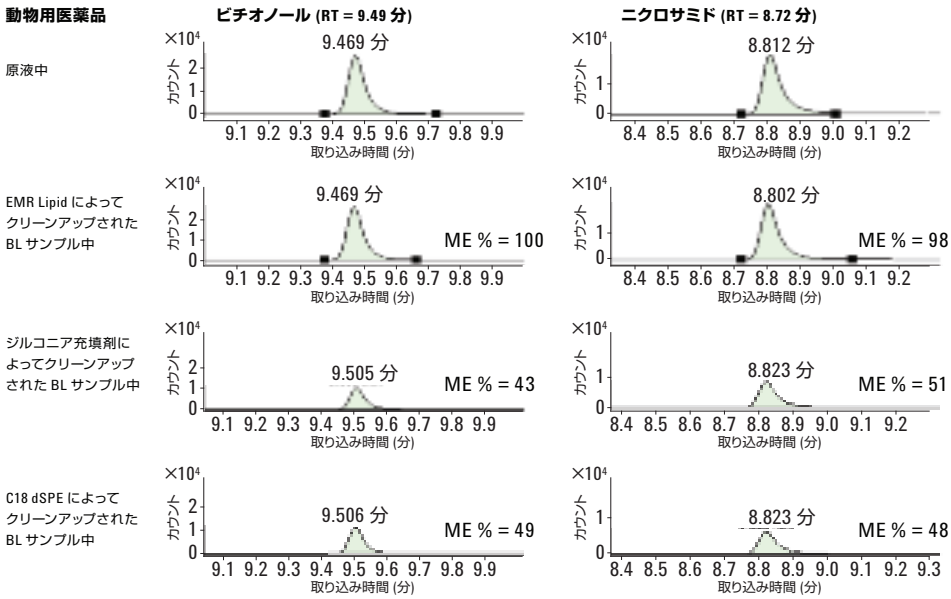



図 4. 疎水性物質でのマトリックスイオン抑制効果の比較マトリックス効果 (ME) は、
ポストスパイク肝臓抽出物と、対応する標準原液におけるピーク面積の比率から計算しました。

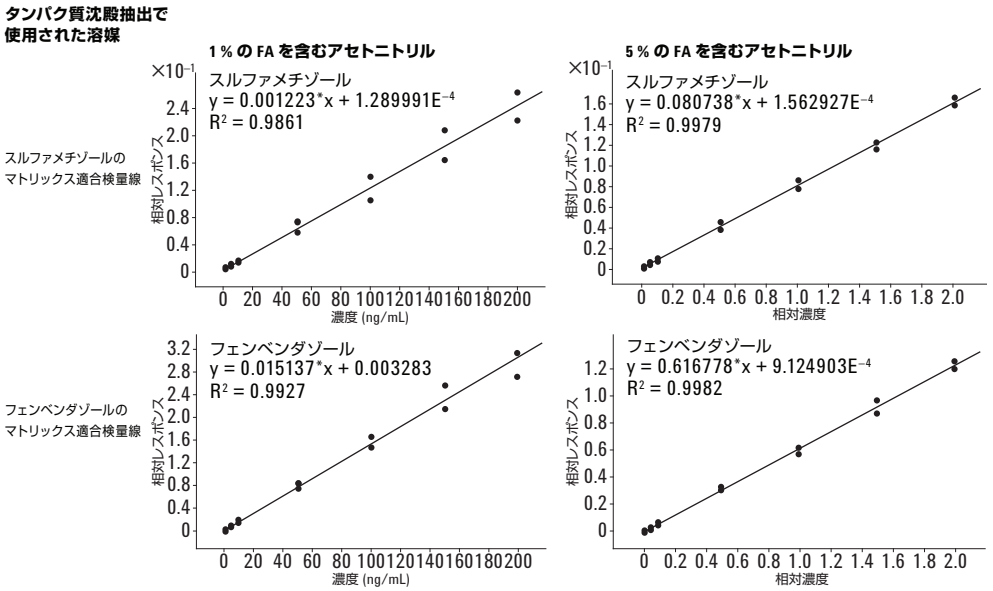



図 5. タンパク質沈殿に 1 % の FA のアセトニトリル溶液を使用した場合と 5 % の FA のアセトニトリル溶液を使用した場合の検量線の直線性比較

これらの化合物の場合、緩衝液を使用すると、緩衝作用のない水を使用した場合と比較して、回収率が約 5 % 低くなります。緩衝液を使用した場合と水を使用した場合に回収率に明らかな差がある分析対象成分を選択して、比較のために図 6 に示しています。緩衝液を使用すると分析対象物の回収率が向上することが多く、緩衝液を使用したために失われるテトラサイクリンはごくわずかであるため、実験の残りの部分では 5 mM の酢酸アンモニウム緩衝液を使用しました。

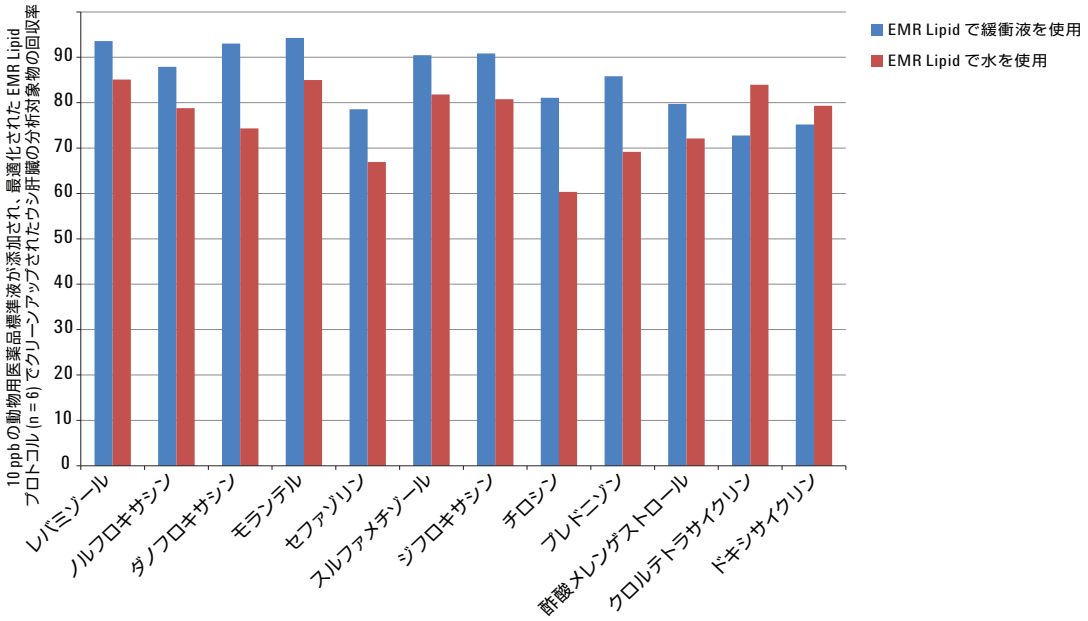



図 6. Enhanced Matrix Removal dSPE によるクリーンアップのステップで 5 mM の酢酸アンモニウム緩衝液を使用した場合と水を使用した場合の分析対象物の回収率の比較

EMR Lipid によるクリーンアップ後は、上澄みはおよそ 1:1 のアセトニトリルと水性の混合物です。次に、5 mL の量の上澄みを、EMR Lipid 脱水キットに移します。脱水キットには、塩分配によって有機相と水性相を分離するために 2 g の塩混合物 (4:1 の $MgSO_4$ と NaCl) が入っています。このステップは、分離を実施するだけでなく、さらにマトリックスをクリーンアップすることを容易にし、また、溶解した余分な充填剤および塩を除去します。そのため、GC 分析と LC 分析の両方で、このステップを実行することを強くおすすめします。メソッド開発中に、テトラサイクリンを除くすべての分析対象成分で、良好な分析対象物の回収率と精度を達成しました。さらに調査して、テトラサイクリンの低い回収率 (45～68 %) は、塩分配ステップと関係していたことが分かりました。テトラサイクリンの逸失を減らすために、EMR Lipid の脱水用塩を使用しない代替プロトコル (図 7) を調査しました。手順は類似していますが、400 µL の抽出物 (EMR Lipid dSPE から) と 600 µL の水を小型バイアルで混合し、脱水ステップを使用せずに 1 分間ボルテックスミキサーで撹拌した点は異なります。サンプルを、微小遠心管で 3 分間 13,000 rpm で遠心分離し、次に LC/MS/MS 分析のために上澄みを 2 mL のサンプルバイアルに移しました。混合と希釈のステップの前に、マトリックスブランクでの標準液と IS のポストスパイクが実施されました。分離用の塩が使用されなかったため、このプロトコルは分離を行わないものと見なすことができます。

図 8 に示す結果から、この代替プロトコルを使用するとテトラサイクリンの回収率を大幅に改善できることが分かります。ただし、テトラサイクリンに脱水プロトコルを使用した結果 (図 2 に示す) も許容できます。精度が定量の精度であるためです。適切な安定した標識内部標準を使用して、低い回収率を是正することができます。この実験では、EMR Lipid によるクリーンアップ後に、脱水なしの代替プロトコル用に抽出されたサンプルを分割しました。そして、テトラサイクリン (オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、およびドキシサイクリン) について、代替プロトコルによる 3 つの結果を報告しました。

## メソッドの比較

次に、最適化された EMR Lipid メソッドを、従来からの QuEChERS メソッド (C18 dSPE によるクリーンアップおよびジルコニア充填剤によるクリーンアップ) と比較しました。QuEChERS は、分析対象または残留物抽出に頻繁に使用され、dSPE クリーンアップステップを使用します。図 9 に、統計的に回収率を比較した結果を示しています。図 10 には、問題のある分析対象成分を選択して比較した結果を示しています。最適化された EMR Lipid プロトコルは、特に、フルオロキノロン系とテトラサイクリン系での回収率の低いジルコニア充填剤と比較して、問題のある分析対象成分の回収率と精度を大幅に改善します。オキシテトラサイクリンおよびニクロサミドのみが、それぞれ 67 % および 68 % という絶対回収率を示します。ただし、6 回繰り返した場合

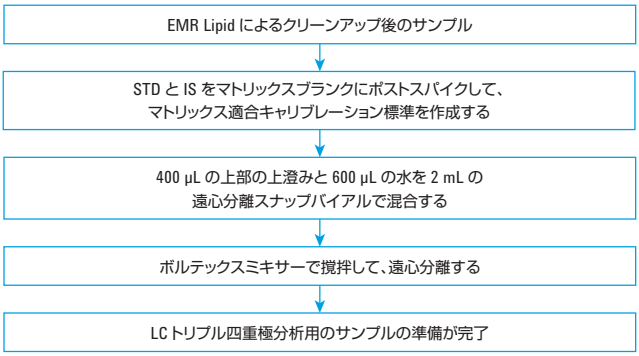



図 7. テトラサイクリンの回収率を改善するための、Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップ後のオプション手順

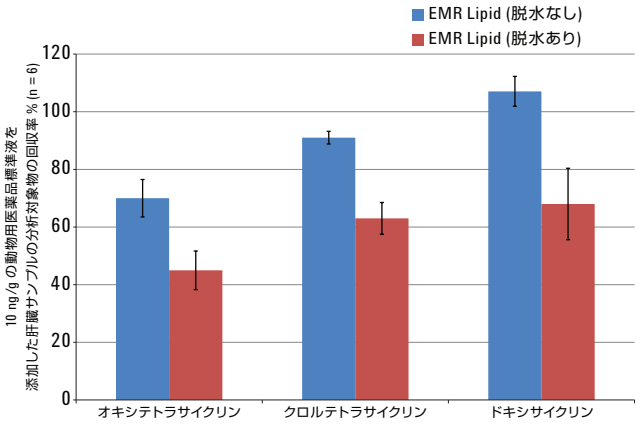



図 8. Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップの後に、脱水ステップを使用して調製した場合と脱水ステップを使用せずに調製した場合の、肝臓サンプルのテトラサイクリンの回収率と精度の比較

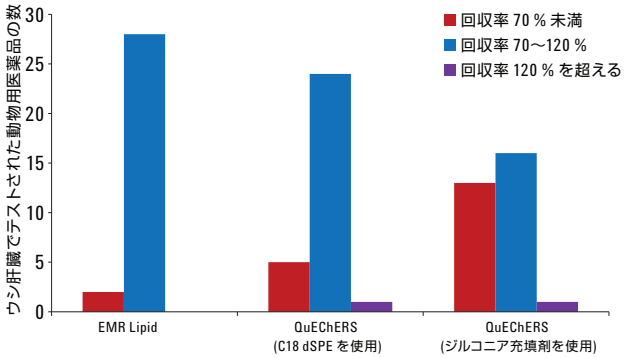



図 9. Agilent Bond Elut EMR Lipid プロトコルと従来からの QuEChERS プロトコルを比較するための統計的な回収率の比較

のこれらの 2 つの化合物の精度は、それぞれ RSD が 12.8 % および 2.0 % であり、許容できるものでした。SANCO ガイドラインに基づいて許容できると見なされます [9]。これらの結果は、C18 およびジルコニア充填剤を使用する dSPE を採用した他の 2 つのプロトコルでの結果よりも優れています。

## メソッドバリデーション

最適化された EMR Lipid メソッドは、サンプル前処理のセクションで説明されているメソッドを使用して、定量バッチ全体を実行することによって検証しました。真度と精度の定量のために、内部標準 (ポジティブモードとネガティブモードのフルニキシン-$d_3$) を使用しました。フルニキシン-$d_3$ の絶対回収率は 90〜100 % でした。そのため、真度は絶対回収率と密接に対応しています。表 4 に定量の結果を示します。真度の要約 (図 11) は、異なる 4 つのレベル (G1 では 10、50、250、および 750 ppb、G2 では 2、10、50、および 150 ppb、キャリブレーション標準のセクションを参照) でレベルごとに 6 回の分析を繰り返して、24 個の QC の真度および精度を測定することによって生成しました。93 % の分析対象成分で、良好な RSD が得られ、許容できる真度 (70〜120 %) を達成しました。例外として 2 つの許容範囲外の値があり、回収率がわずかに 70 % を下回っていました。各レベルでの 6 回の繰り返しの RSD 値は非常に良好で、ほとんどの化合物で 10 % を下回りました。BL ブランクでラクトパミンおよびケトプロフェンが低いレベルで検出され、キャリブレーション範囲が修正されたことに注意してください。

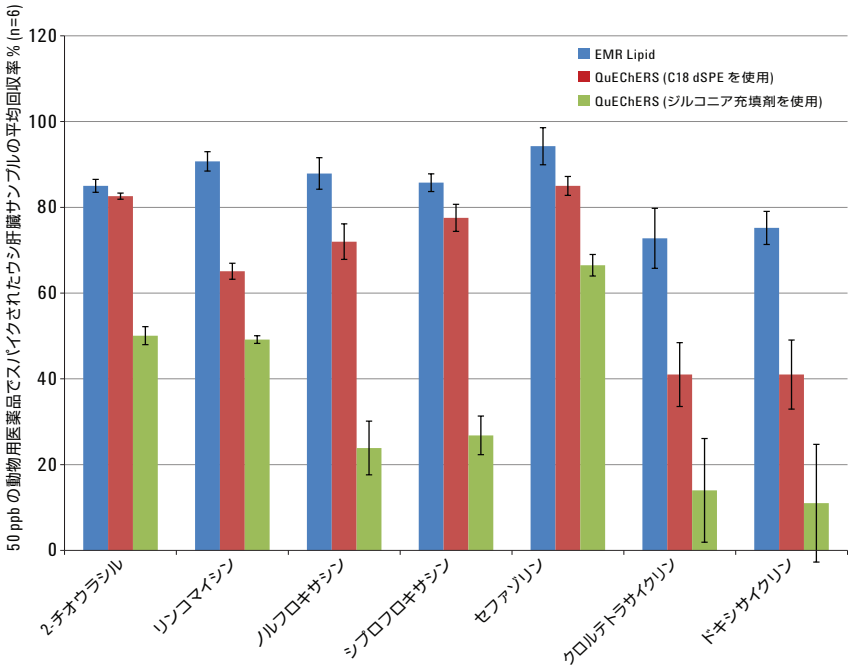



図 10. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid プロトコルを従来のプロトコルと比較した、選択された分析対象物の回収率の結果

クロルテトラサイクリンとドキシサイクリンの結果は、図 6 に示す代替プロトコルから生成されました。残りの化合物では、図 1 のプロトコルを使用。

表 4. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid を使用したターゲット化合物の定量結果。各分析対象成分は、4 つの濃度レベルで、レベルごとに 6 回繰り返して評価

| | | 検量線 | | | メソッドの回収率および精度 (ng/g QCs) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 2 | | 10 | | 50 | | 150 | | 250 | | 750 | |
| グループ番号 | 分析対象成分 | 回帰適合/重量 | $R^2$ | キャリブレーション範囲 (ng/g) | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD |
| 1 | 2-チオウラシル | 直線、1/x | 0.9976 | 5-1,000 | -- | -- | 106.6 | 4.9 | 93.6 | 5.4 | -- | -- | 87.0 | 3.0 | 85.4 | 8.3 |
| 1 | アモキシシリン | 直線、1/x | 0.9978 | 5-1,000 | -- | -- | 65.9 | 12.1 | 74.3 | 8.8 | -- | -- | 79.5 | 4.1 | 79.7 | 4.8 |
| 1 | ミソニダゾール-OH | 直線、1/x | 0.9981 | 5-1,000 | -- | -- | 92.6 | 15.1 | 89.4 | 6.6 | -- | -- | 89.4 | 3.5 | 89.7 | 3.3 |
| 1 | オキシテトラサイクリン | 直線、1/x | 0.9963 | 5-1,000 | -- | -- | 73.9 | 19.1 | 71.2 | 14.0 | -- | -- | 67.0 | 12.8 | 63.4 | 9.0 |
| 1 | セファゾリン | 直線、1/x | 0.9966 | 5-1,000 | -- | -- | 72.1 | 9.4 | 81.2 | 2.7 | -- | -- | 86.7 | 3.8 | 82.9 | 3.0 |
| 1 | ジフロキサシン | 直線、1/x | 0.9978 | 5-1,000 | -- | -- | 79.0 | 8.3 | 86.5 | 5.9 | -- | -- | 104.4 | 5.1 | 97.7 | 6.3 |
| 1 | クロルテトラサイクリン | 直線、1/x | 0.9928 | 5-1,000 | -- | -- | 100.6 | 14.1 | 96.9 | 9.5 | -- | -- | 93.8 | 14.0 | 85.0 | 11.6 |
| 1 | ドキシサイクリン | 直線、1/x | 0.9972 | 5-1,000 | -- | -- | 118.9 | 12.0 | 102.7 | 10.0 | -- | -- | 110.0 | 7.7 | 104.5 | 8.6 |
| 1 | フロルフェニコール | 直線、1/x | 0.9942 | 5-1,000 | -- | -- | 103.4 | 6.2 | 107.9 | 6.0 | -- | -- | 115.2 | 13.5 | 107.0 | 4.0 |
| 1 | クロラムフェニコール | 直線、1/x | 0.9962 | 5-1,000 | -- | -- | 103.6 | 6.6 | 107.1 | 7.9 | -- | -- | 113.7 | 9.8 | 100.9 | 5.2 |
| 1 | クロルスロン | 直線、1/x | 0.9954 | 5-1,000 | -- | -- | 77.9 | 10.3 | 104.4 | 6.0 | -- | -- | 102.2 | 7.1 | 94.3 | 3.3 |
| 1 | プレドニゾン | 直線、1/x | 0.9984 | 5-1,000 | -- | -- | 105.9 | 9.1 | 92.1 | 11.1 | -- | -- | 103.9 | 10.5 | 94.5 | 2.3 |
| 1 | オキシフェンブタゾン | 直線、1/x | 0.9903 | 5-1,000 | -- | -- | 93.6 | 3.4 | 91.9 | 5.2 | -- | -- | 93.7 | 5.6 | 97.0 | 4.6 |
| 1 | 酢酸メレンゲストロール | 直線、1/x | 0.9994 | 5-1,000 | -- | -- | 70.6 | 1.4 | 77.3 | 3.0 | -- | -- | 82.8 | 2.1 | 77.1 | 2.6 |
| 1 | ビチオノール | 二次曲線、1/x | 0.9981 | 5-1,000 | -- | -- | 69.4 | 6.2 | 90.4 | 2.9 | -- | -- | 91.3 | 4.3 | 83.1 | 3.7 |
| 2 | レバミゾール | 直線、1/x | 0.9967 | 1-200 | 84.5 | 11.3 | 95.5 | 5.1 | 103.8 | 5.2 | 89.4 | 9.7 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | リンコマイシン | 直線、1/x | 0.9950 | 1-200 | 89.5 | 16.4 | 79.6 | 10.6 | 74.1 | 4.5 | 74.8 | 11.2 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | ノルフロキサシン | 直線、1/x | 0.9960 | 1-200 | 89.5 | 9.7 | 89.2 | 4.7 | 95.8 | 7.4 | 93.5 | 7.2 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | シプロフロキサシン | 直線、1/x | 0.9980 | 1-200 | 81.0 | 5.6 | 83.6 | 6.9 | 96.9 | 4.1 | 99.5 | 5.9 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | ダノフロキサシン | 直線、1/x | 0.9985 | 1-200 | 78.2 | 7.8 | 86.2 | 5.8 | 99.5 | 7.8 | 96.9 | 4.8 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | ラクトパミン | 直線、1/x | 0.9961 | 10-200[b] | -- | -- | 98.1 | 15.5 | 105.0 | 10.4 | 102.5 | 6.8 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | モランテル | 直線、1/x | 0.9960 | 1-200 | 89.5 | 4.9 | 95.1 | 4.5 | 101.0 | 8.6 | 94.1 | 7.4 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | スルファメチゾール | 直線、1/x | 0.9928 | 1-200 | 85.7 | 14.6 | 89.2 | 8.1 | 93.9 | 4.9 | 88.0 | 10.4 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | スルファメトキシピリダジン | 直線、1/x | 0.9973 | 1-200 | 84.7 | 8.1 | 84.4 | 2.9 | 89.9 | 5.7 | 84.9 | 6.2 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | チロシン | 直線、1/x | 0.9967 | 1-200 | 80.6 | 11.2 | 75.6 | 2.7 | 71.0 | 4.5 | 65.3 | 2.3 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | アセトプロマジン | 直線、1/x | 0.9973 | 1-200 | 74.1 | 6.3 | 73.5 | 3.0 | 77.2 | 4.9 | 75.2 | 5.3 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | クロルプロマジン | 直線、1/x | 0.9967 | 1-200 | 66.1 | 6.1 | 67.8 | 3.8 | 73.4 | 4.3 | 72.7 | 6.5 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | フェンベンダゾール | 直線、1/x | 0.9988 | 1-200 | 74.6 | 7.7 | 82.3 | 4.6 | 97.9 | 9.9 | 84.9 | 3.5 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | ケトプロフェン | 直線、1/x | 0.9978 | 5-200[c] | -- | -- | 88.3 | 7.2 | 98.1 | 6.9 | 94.5 | 3.8 | -- | -- | -- | -- |
| 2 | ニクロサミド | 直線、1/x | 0.9996 | 1-200 | 60.0 | 15.3 | 66.6 | 4.7 | 71.7 | 2.0 | 67.6 | 3.1 | -- | -- | -- | -- |

[a] グループ 1 の分析対象成分では、キャリブレーション範囲は 5〜1,000 ng/g、QC スパイクレベルは 10、50、250、および 750 ng/g です。グループ 2 の分析対象成分では、キャリブレーション範囲は 1〜200 ng/g、QC スパイクレベルは 2、10、50、および 150 ng/g です。

[b] BL コントロールブランクでラクトパミンが検出されたために修正されたキャリブレーション範囲。

[c] BL コントロールブランクでケトプロフェンが検出されたために修正されたキャリブレーション範囲。

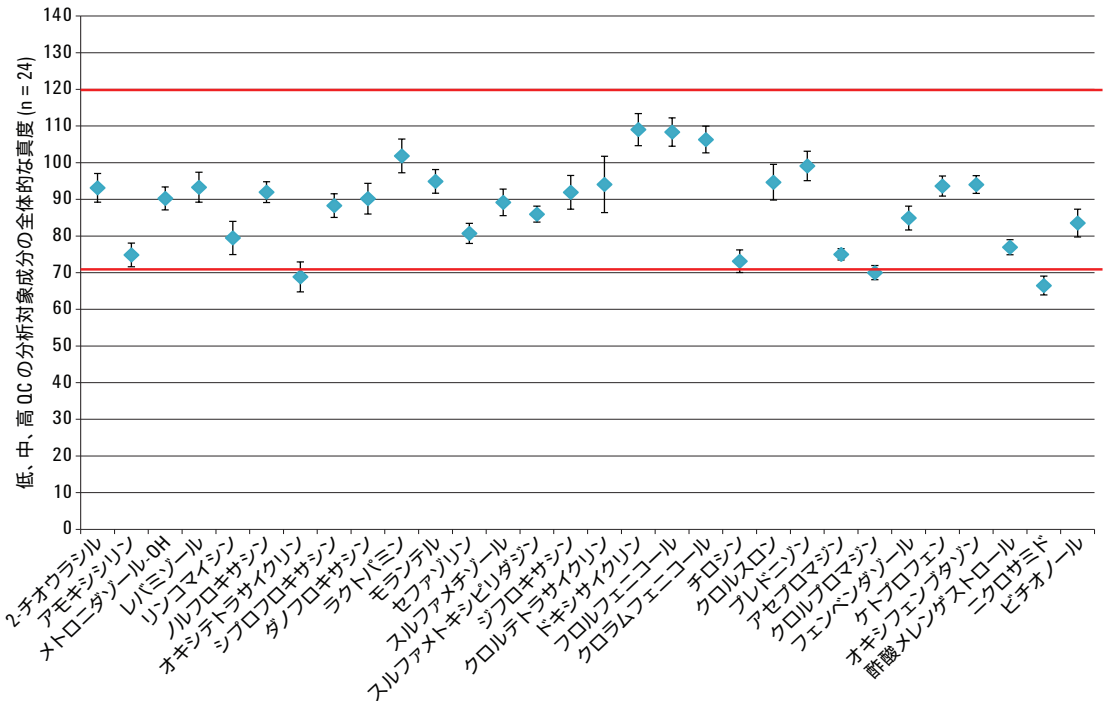



図 11. 最適化された Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid プロトコルを使用して BL 中で分析された 30 種の代表的な動物用医薬品の定量。真度および精度のデータは、4 つの異なるスパイクレベルで合計 24 回分析を繰り返して計算 (各レベルで n = 6)。エラーバー = 95 % CI。3 種のテトラサイクリン化合物の結果は、図 6 に示す代替プロトコルから生成。残りの化合物では、図 1 のプロトコルを使用。

## 結論

タンパク質沈殿抽出と、それに続いて Agilent Bond Elut EMR Lipid および EMR Lipid 脱水クリーンアップを使用する、迅速で信頼性が高く堅牢なメソッドを、BL 内の複数の動物用医薬品の残留の分析用に最適化して検証しました。マトリックス効果を慎重に評価し、従来の C18 dSPE およびジルコニア充填剤によるクリーンアップと比較しました。最適化された EMR Lipid メソッドにより、優れたマトリックスクリーンアップが実施され、このタイプの用途で非常に高い回収率と精度を実現したことが、結果に示されています。

注入の前に水で直接希釈することにより、LC/MS/MS でサンプルを検査できるようにして、早い段階で溶出する化合物のピークの完全性を維持したことに注目してください。この実験で使用した LC/MS/MS システムでは、検出限界要件を満たしたままで、直接サンプル希釈を使用するために十分な感度が提供されました。乾燥して再溶解するという一般的な手法と比較して、このワークフローでは、大幅に時間と労力を節約し、また発生しうる偏差と分析対象成分の逸失を回避しました。機器の感度が、直接サンプル希釈で求められるニーズを満たしていない場合でも、最後にサンプルを濃縮するステップを検討する必要があります。これは通常、サンプルの蒸発と再溶解によって実現します。この応用事例は、EMR Lipid を使用した選択的マトリックス除去を使用すると、BL などの複雑なサンプルの場合に非常に有利になることを示しています。サンプルがよりクリーンになり、動物用医薬品の多成分残留物について回収率と精度が向上するためです。

他の複雑で高脂質のマトリックスおよびターゲット化合物に関しても、EMR の利点を生かした活用が期待できます。

## 参考文献


1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000;* U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC. www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, *L122,* 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, May 2012;* Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, *25*, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. *J. Anal. Chem.* **2005**, *5*, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1202*, 118-123.
7. Geis-Asteggiante, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1258,* 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013;* European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.


## 詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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.,


2015 Printed in Japan
August 4, 2015
5991-6096JAJP


Agilent Technologies