

Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ クリーンアップおよび LC/MS/MS を 用いた牛肉中の残留動物用医薬品の 多成分同時分析

著者

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent EMR-Lipid の第 2 世代の製品である Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) カートリッジは固相抽出 (SPE) フォーマットになっており、分析対象物の回収率には影響を与えずに高い選択性で脂質を除去します。SPE カートリッジにより通過型クリーンアップワークフローが容易になるため、メソッド開発に必要な労力は最低限に抑えられます。チューブはハンズフリーの自然落下溶出が円滑にできるよう最適化されており、減圧や加圧をしなくても大容量のサンプルクリーンアップが実施できます。脂質の保持を効率化して疎水性化合物の回収率を増大させるために、20% の水を添加してクリーンアップ用の EMR 充填剤を活性化させる必要があります。この研究では、牛肉内の代表的な 39 種類の動物用医薬品の分析において、Captiva EMR-Lipid を使用する方法について説明します。親水性および疎水性の両方の化合物に対して十分な回収率を達成するために、2 ステップのサンプル抽出を用いました。次に、クリーンアップのために抽出物を混合して Captiva EMR-Lipid カートリッジに注入しました。マトリックス効果、分析対象物の回収率、および再現性でメソッドの評価をしました。Captiva EMR-Lipid カートリッジは、他社のカートリッジ通過型クリーンアップ製品と比較した場合、疎水性物質のマトリックスクリーンアップ効率が高く、回収率も良好でした。

はじめに

動物用医薬品は、動物の病気の予防のため、または成長促進のために動物性食品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。食品安全性への関心が高まっているため、多数の国において動物性食品の生産で使用される動物用医薬品に規制が課されています^{1,2}。筋肉、肝臓、卵などの動物性食品は複雑なマトリックスであるため、機器による分析を実施する前のサンプル抽出、クリーンアップ、および濃縮（必要な場合）において、効率的な前処理メソッドを使用することが重要になります。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、限られた種類の化合物のみに適しており、メソッド開発も必要となります。

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きます。分析範囲が広く、ラボの効率を向上させるためです。過去数年の文献では、100 種類を超える動物用医薬品に関する分析結果が報告されています³⁻⁵。サンプル前処理では、通常、アセトニトリル (ACN) と水の混合液を使用した前抽出が行われ、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を組み合わせたものが実施されます。ただし、現在のクリーンアップ手法では、脂質除去の効率が悪かったり、分析対象物を損失したりすることがあり、限界があります。ACN と水の混合液による直接抽出では、タンパク質除去効率と抽出ステップ時の疎水性物質の抽出効率が低下する場合があります。

Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) dSPE クリーンアップは、2015 年に発表されて以来大きな注目を集めています。EMR-Lipid 充填剤は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせたメカニズムを用いて、特に脂質化合物の枝分かれのない炭化水素鎖と相互作用します。この組み合わせメカニズムにより、ターゲット化合物には悪影響を与えずに高い選択性で脂質を除去します。この技術は、複雑なマトリックスの複数の種類の多成分残留物分析に使用されており、優れたマトリックスクリーンアップと最適な結果を達成しています^{6,7}。第 2 世代の製品である Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジでは、充填剤の活性化に必要な水の比率が低減されており、その後の最終精製ステップも必要ありません。これによりワークフローが簡素化され、クリーンアップ時の疎水性化合物の溶解度が向上します。

この研究では、牛肉内の代表的で分析困難な 39 種類の動物用医薬品の分析において、サンプル前処理時に Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを使用する方法について調査します。代表的な動物用医薬品は 17 の異なるクラスから選択しました。この中には、親水性および疎水性医薬品、酸性、中性、および塩基性医薬品、そして最も分析困難ないくつかのクラス（テトラサイクリン、 β -ラクタムなど）が含まれています。表 1 に、これらの動物用医薬品の分析における、薬物クラス、法規制情報、リテンションタイム、および MS/MS 条件を示します。

分析方法

試薬および薬品

試薬および溶媒はすべて 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) 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) とエチレンジアミン四酢酸、ジナトリウム塩、脱水剤 (NaEDTA) 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)。動物用医薬品標準と内部標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

溶液および標準試料

標準と内部標準 (IS) の原液は DMSO を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。ただし、次の例外があります。

- ダノフロキサシンの原液は DMSO を使用して 1.0 mg/mL で作成しました。
- シプロフロキサシンの原液は DMSO を使用して 0.25 mg/mL で作成しました。

すべての β -ラクタム医薬品と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。原液はすべて茶色ガラスバイアルで前処理しましたが、 β -ラクタム医薬品、セファゾリン、およびテトラサイクリン医薬品の原液については、ポリプロピレンプラスチックチューブで前処理しました。すべての溶液は -20°C で保管しました。39 種類の化合物は、機器での応答に基づいてグループ 1 (G1) およびグループ 2 (G2) という 2 つのグループに分けました。2 つの混合標準作業液 25:5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 5:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G1/G2) は、1:1 ACN/水混合液で前処理しました。フルニキシン-d3 IS の 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作業液は、1:1 ACN/水混合液で前処理しました。

冷却した抽出溶媒は、2 mL のギ酸と 2 mL の DMSO を 100 mL の予冷 ACN に毎日添加して前処理しました。0.1 M の NaEDTA 溶液は、Milli-Q 水 50 mL 中に NaEDTA 1.8612 g を溶解して作成しました。この溶液は室温で保管しました。80:20 の ACN/水混合液は、ACN 80 mL と Milli-Q 水 20 mL を混合して作成しました。

表 1. 分析用に選択した動物用医薬品、薬物クラス、米国の許容値、リテンションタイム、および MRM 条件の一覧

分析対象物	薬物クラス	米国の許容値 (µg/g)	リテンションタイム (分)	極性	プリカー Сай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	Thyreostat	–	1.41	負	127	57.9	17	–	–
アモキシシリン	β-ラクタム	0.01	1.94	正	366.1	349.2	5	114	25
メトロニダゾール-OH	ニトロイミダゾール	^d	2.21	正	188.1	123.1	9	126.1	13
リンコマイシン	リンコサミド	0.1 ^e	3.80	正	407.2	126.1	37	70.1	80
レバミゾール	駆虫薬	0.1 ^f	3.90	正	205.1	178.1	21	91.1	41
ミノサイクリン	テトラサイクリン		4.14	正	458.2	440.9	17	282.9	49
アンピシリン	β-ラクタム	0.01	4.15	正	350.1	106	33	79.1	61
ノルフロキサシン	フルオロキノロン	^d	4.36	正	320.1	276.1	17	302.2	21
オキシテトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	4.42	正	461.2	426.1	17	443.2	9
シプロフロキサシン	フルオロキノロン	^d	4.43	正	332.1	231	45	314.3	21
テトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	5.37	正	445.2	409.9	17	153.9	33
ダノフロキサシン	フルオロキノロン	0.2 ^h ^f	4.53	正	358.2	340.2	21	81.9	53
ラクトバミン	β-アゴニスト	0.03 ^f	4.55	正	302.2	107	33	77	77
セファゾリン	セファロスポリン	–	4.78	正	455	323.1	9	156	13
スルファメチゾール	スルホンアミド	–	4.88	正	271	156.1	13	92	29
スルファメトキシピリダジン	スルホンアミド	–	4.91	正	281.1	92	33	65.1	57
デメクロサイクリン	テトラサイクリン	–	4.94	正	465.1	429.9	21	448.0	13
ジフロキサシン	β-ラクタム	–	4.97	正	400.2	356.3	17	382.0	25
モランテル	駆虫薬	–	5.08	正	221.1	123.1	37	76.9	80
ガミスロマイシン	マクロライド	0.15	5.22	正	777.6	157.9	41	83.1	65
クロルテトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	5.24	正	479.1	444.2	21	462.1	17
ドキシサイクリン	テトラサイクリン	–	5.36	正	445.2	428.1	17	410.2	25
フロルフェニコール	フェニコール	0.2 ^e	5.69	負	356.0	336.0	5	185.1	13
クロラムフェニコール	フェニコール	^d	5.86	負	321	152	17	257.1	9
タイロシン	マクロライド	0.2 ^g	5.94	正	916.5	173.9	45	772.5	33
ブレドニゾン	コルチコステロイド	–	6.02	正	359.2	147.2	33	341.2	9
クロルスロン	フルキンド	0.1 ^f	6.09	負	377.9	341.9	9	–	–
アセトプロマジン	トランクライザー	–	6.09	正	327.2	86	21	58	45
クロルプロマジン	トランクライザー	–	6.69	正	319.1	86	21	58.1	45
ペニシリン V	β-ラクタム	0.05 ^a	6.70	正	351.6	160.1	9	113.9	45
オキサシリン	β-ラクタム	–	6.93	正	402.1	160.0	17	242.9	9
フェンベンダゾール	駆虫薬	–	6.98	正	300.1	268.1	25	159.1	41
クロキサシリン	β-ラクタム	0.01 ^a	7.20	正	436.1	159.9	9	276.8	13
ナフシリン	β-ラクタム	–	7.35	正	415.1	199.0	13	171.0	41
ケトプロフェン	トランクライザー	–	7.44	正	255.1	208.9	13	77	57
オキシフェンブタゾン	NSAID	–	7.47	負	323.1	295	17	133.9	25
フルニキシム-d3 (負)	–	–	7.81	負	298.1	254.2	17	192	37
フルニキシム-d3 (正)	–	–	7.81	正	300.1	282	25	264	41
酢酸メレンゲストロール	その他	0.025 ^b	9.05	正	397.2	279.2	21	337.4	13
ニコロサミド	フルキンド	–	9.07	負	325	170.9	25	289.1	13
ピチオノール	フルキンド	–	9.07	負	352.9	161	21	191.8	25

^a ウンの未調理の可食組織における許容値

^b ウンの肝臓における許容値

^c プタの筋肉における許容値

^d 適用外使用の禁止

^e クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、筋肉内のテトラサイクリンを含むテトラサイクリンの残量物の合計における許容値

^f ウンの筋肉における許容値

^g 未調理のウンの脂肪、筋肉、肝臓、および腎臓における許容値

^h ウンの脂肪における許容値

装置と材料

分離には次の機器で構成される Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付き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付きの Agilent G6490 トリプル四重極質量分析装置に連結しました。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。

サンプル前処理に用いたその他の装置

- 2010 ジェノグラインダー (メアチエン、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)
- Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph、シュヴァーバッハ、ドイツ)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ、6 mL、600 mg (部品番号 5190-1004) および 3 mL、300 mg (部品番号 5190-1003)
- Agilent Vac Elut SPS 24 マニホールド、16 × 100 mm 試験管用コレクションラック付き (部品番号 12234004)

分析条件

図 1 に、A) 牛肉抽出物マトリックスブランク、および B) 5:1 ng/g (G1/G2) 動物用医薬品標準が添加された牛肉抽出物 (定量下限レベル) のクロマトグラムを示します。

サンプル前処理

図 2 に、牛肉サンプルを前処理するための最終サンプル前処理手順を示します。牛肉サンプルに対して最適化した抽出とクリーンアップメソッドを実施するために、次の点を強調しておく必要があります。

- メソッド開発とバリデーションには、地域の食料品店で購入した牛肉を使用しました。サンプルはホモジナイズして -20 °C で保管しました。
- ホモジナイズした牛肉サンプルに標準物質と IS をプレスパイクした後、サンプルを室温で 20 分間置いたままにしました。これにより、スパイクした標準をサンプルマトリックスに浸潤させ、サンプル抽出の前に平衡化させました。
- 牛肉と均一に混合させるためにはサンプル抽出で水を使用する必要がありますが、これで極性医薬品化合物の回収率と安定性が保証されます。20:80 水/ACN 混合液で 1 ステップ抽出する場合には、疎水性化合物の溶媒抽出効率とタンパク質除去効率が大幅に低減します。このため、2 mL 水性抽出後に 8 mL 溶媒抽出を実施するという 2 ステップの抽出プロトコルを使用しました。

HPLC 条件

パラメータ	設定値												
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、150 × 2.1 mm、2.7 μm (部品番号 693775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 UHPLC ガード、5 × 2.1 mm、2.7 μm (部品番号 821725-911)												
流量	0.3 mL/min												
カラム温度	40 °C												
オートサンブラ温度	4 °C												
注入量	3 μL												
移動相	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液												
ニードル洗浄	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % FA												
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>0.3</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>10</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>100</td> <td>0.3</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	0	10	0.3	0.5	10	0.3	8.0	100	0.3
時間 (分)	%B	流量 (mL/min)											
0	10	0.3											
0.5	10	0.3											
8.0	100	0.3											
ストップタイム	12 分												
ポストタイム	3 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											
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										
キャピラリー	3,000 V										
iFunnel パラメータ	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>正</th> <th>負</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>高圧 RF</td> <td>90 V</td> <td>90 V</td> </tr> <tr> <td>低圧 RF</td> <td>70 V</td> <td>60 V</td> </tr> </tbody> </table>		正	負	高圧 RF	90 V	90 V	低圧 RF	70 V	60 V	
	正	負									
高圧 RF	90 V	90 V									
低圧 RF	70 V	60 V									

- キレート化によるテトラサイクリン化合物の損失を防ぐために、水性抽出には 0.1 M EDTA 緩衝液を使用しました。
- テトラサイクリン、β-ラクタム、フルオロキノロンなどの分析困難な医薬品化合物の溶媒抽出効率を向上させるために、2 % ギ酸と 2 % DMSO を抽出溶媒 ACN に加えました。
- 特に最初の水性抽出ステップでの固体残留物による相分離を向上させるために、冷却遠心分離 (4 °C) を使用しました。
- 分析対象物がカートリッジから完全に溶出するように、EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップ後に二次的溶出を実施しました。

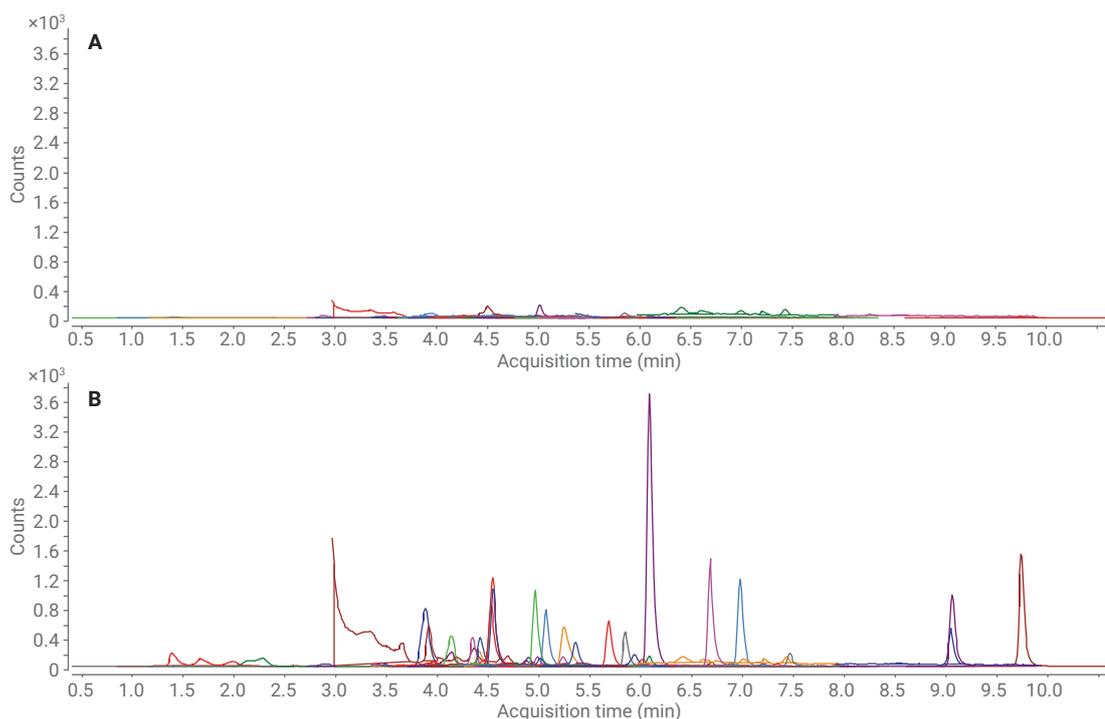


図 1. A) 牛肉抽出物マトリックスブランク、および B) 5:1 ng/g (G1/G2) 動物用医薬品標準が添加された牛肉抽出物の LC/MS/MS クロマトグラム。グループ 1 (G1) 分析対象物は 5 ng/g 添加レベルに対応し、グループ 2 (G2) 化合物は 1 ng/g 添加レベルに対応。溶出順序による分析対象物の同定については表 1、化合物のグループの同定については表 2 を参照

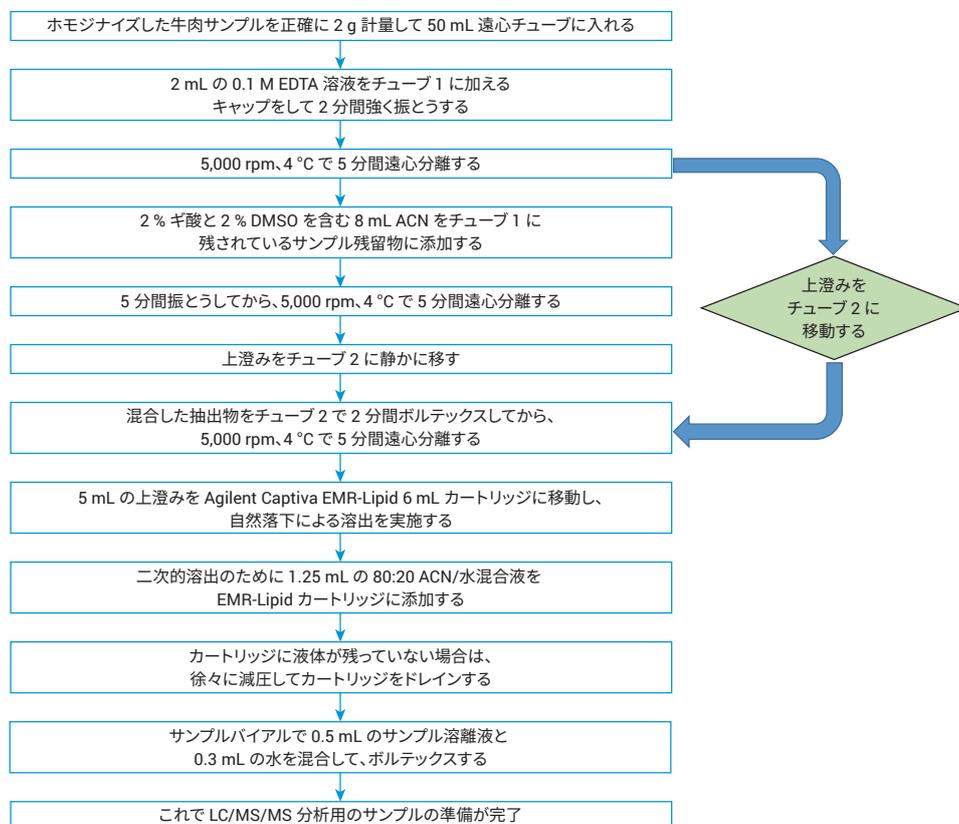


図 2. Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジを使用した牛肉のサンプル抽出とその後のクリーンアップ手順

キャリブレーション標準と品質管理 (QC) サンプル

適切な標準作業液を、低、中、高レベルでホモジナイズした牛肉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、繰り返し再現性を調べました。

- G1 分析対象物については、スパイクレベルを 10、50、および 750 ng/g に設定しました。
- G2 分析対象物については、スパイクレベルを 2、10、および 150 ng/g に設定しました。

高レベル QC サンプルのスパイクには標準 25:5 µg/mL (G1/G2) 作業液を使用し、低および中レベル QC サンプルのスパイクには 5:1 µg/mL (G1/G2) 標準溶液を使用しました。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、フルニキシン-d3 200 ng/g に相当する濃度でスパイクしました。

カートリッジによるクリーンアップ後に、適切な標準と IS 作業液をマトリックスブランク溶離液にスパイクすることにより、マトリックス適合検量標準およびポストスパイク QC サンプルを前処理しました。キャリブレーション標準のスパイク濃度は 5、25、50、250、750、および 1,000 ng/g (G1) または 1、5、10、50、150、および 200 ng/g (G2、牛肉内)、および 200 ng/g (IS) で、ポストスパイク QC サンプルのスパイク濃度は 10、50、および 750 ng/g (G1) または 2、10、および 150 ng/g (G2) でした。

共溶出量の測定

EMR-Lipid カートリッジおよび他社のカートリッジによるクリーンアップでの共溶出残留物を重量測定法で測定しました⁵。共溶出残留物の重量を 1 mL の ACN 最終抽出物に基づいて計量すると同時に、クリーンアップによるマトリックス共溶出除去効率を、カートリッジによるクリーンアップを実施した場合と実施しない場合の共溶出残留物の重量の差の割合を比較することにより計算しました。

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試験により、クロマトグラフのマトリックス効果を評価しました。10 ng/mL 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 90 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、クロマトグラフウィンドウ全体にわたって監視しました。

カートリッジによるクリーンアップを用いた分析対象物の回収率の評価

カートリッジによるクリーンアップ前に標準を牛肉抽出物ブランクにプレススパイクし、カートリッジによるクリーンアップ後に標準を牛肉抽出物ブランク溶離液にポストスパイクすることにより、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響を評価しました。得られた回収率の結果は、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響のみを反映しており、抽出方法におけるその他の影響は除外されています。つまり、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響が直接比較されています。EMR-Lipid カートリッジ 3 mL および 6 mL を対応する他社のカートリッジと比較しました。3 mL カートリッジの場合、サンプルロード量は 2.5 mL、二次的溶出量は 0.625 mL でした。

メソッドバリデーション

キャリブレーションの再現性を確認するために、QC サンプルの前後で実施した 2 つの別の検量線を用いた全定量バッチを実行することにより、開発したメソッドをバリデーションしました。

結果と考察

カートリッジクリーンアップの使いやすさ

複雑なサンプルマトリックスクリーンアップに Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用する重要なメリットは使いやすさです。EMR-Lipid 充填剤は、分析対象物ではなく不要な脂質干渉を対象としており、通過型手法が導入されています。サンプル混合物はカートリッジにロードされ、カートリッジ内に充填された Captiva EMR-Lipid 充填剤を通過します。脂質は充填剤内に取り込まれる一方、ターゲット化合物はカートリッジを通過するため、コンディショニング、洗浄、溶出など従来の SPE ステップが必要なくなります。このように、Captiva EMR-Lipid カートリッジは非常に簡単に使用でき、時間と溶媒を大幅に節約できます。通過型クリーンアップでは、洗浄および溶出ステップでの従来の SPE メソッド開発が不要になります。Captiva EMR-Lipid で可能なメソッド変更は、完全な溶出を達成するために二次的溶出ステップを使用することです。二次的溶出では、サンプルロード量の約 20 ~ 25 % において 20:80 水 /ACN 混合液を使用することが推奨されます (例えば、5 mL ロード後に 1 ~ 1.25 mL の二次的溶出を実施)。最後に、自然落下で溶出できる設計になっているため、サンプルを EMR-Lipid カートリッジにロードした後に、ハンズフリーの操作が実行可能になります。減圧または加圧を操作して、溶出流量を制御する必要はありません。これらの機能により、複雑な食品サンプルを前処理するために、Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを使用する際のラボの生産性が向上しました。

共溶出の量

表 2 に、サンプル共溶出の重量試験結果を示します。共溶出残留物重量に関する試験は、機器に注入される最終サンプルにおいて、タンパク質、脂質、塩、その他のマトリクス成分を含む、マトリクス共溶出残留物を、サンプル抽出とクリーンアップメソッドにより制御する効率を評価するための重要な 1 つのメソッドです。マトリクス共溶出残留物重量は、機器で検出可能かどうかには関係なく、共溶出物全体の量を示しています。共溶出残留物は、機器で検出可能かどうかには関係なく、マトリクス効果を引き起こして、メソッドの信頼性とデータ品質に影響を与え、カラムや MS イオン源など機器の流路に蓄積して、検出システムの長期的性能を低下させる場合があります。

マトリクス共溶出残留物が少ないほど、メソッドの信頼性と機器の性能は向上します。この結果から、Captive EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップでは、他社のカートリッジによるクリーンアップと比較して、共溶出残留物重量が少ない高効率のマトリクスクリーンアップが達成できることが明らかになりました。

マトリクス効果の評価

Captive EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した場合と実施しない場合の牛肉抽出物のマトリクス効果の評価するために、動物用医薬品標準のポストカラムインフュージョン (PCI) を使用しました。すべての分析対象物を、取り込みウィンドウ全体にわたって監視しました。PCI プロファイルは、ポジティブモードとネガティブモードの両方で監視された分析対象物のマトリクス効果を反映しています。図 3 は、PCI プロファイルを示しています。

表 2. カートリッジによるクリーンアップを用いた牛肉マトリクス共溶出残留物量とマトリクス除去

クリーンアップ手法	ACN 最終抽出 1 mL あたりの共溶出物 (mg)	クリーンアップによるマトリクス共溶出物の除去効率 (%)
クリーンアップなし	7.68	–
Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジ	4.38	43
Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジ	4.03	48
他社の 3 mL カートリッジ	5.91	23
他社の 6 mL カートリッジ	6.30	18

$$\text{マトリクス共溶出の除去効率 (\%)} = \frac{(\text{クリーンアップなしでの共溶出の量} - \text{クリーンアップを実施した際の共溶出の量})}{\text{クリーンアップなしでの共溶出の量}} \times 100$$

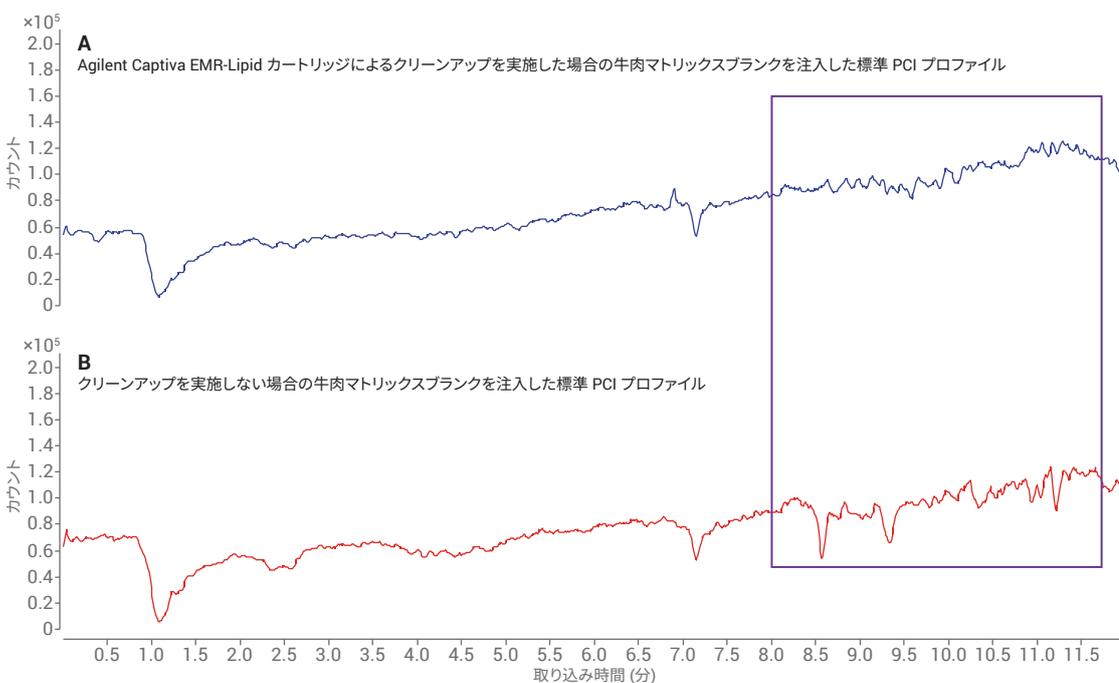


図 3. Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した場合 (A) と、いずれのクリーンアップも実施しない場合 (B) に、牛肉マトリクスブランクを注入した標準 PCI によるマトリクス効果の結果

図 3B は、クリーンアップを実施していない牛肉抽出物を注入した際に観察されたマトリックスイオン抑制（全体的に低いベースライン）の PCI プロファイルを示しています。マトリックスイオン抑制は、共溶出ウィンドウ内の分析対象物のメソッド感度、信頼性、およびデータ品質に大きな影響を与える場合があります。反対に、図 3A は、EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した牛肉抽出物を注入した際に、PCI プロファイル（青）の谷間が少なくなり、滑らかで一貫性があることを示しています。図 3 で強調表示されている RT ウィンドウは、マトリックスイオン抑制が低減したことを比較して示しています。

カートリッジによるクリーンアップ時の回収率

脂質除去の従来のメカニズムは、脂質と充填剤の間の疎水性相互作用に基づいています。このメカニズムは、特に脂質を取り込んで除去するための主要な充填剤機能として強力な疎水性相互作用を使用する際に効率的です。ただし、この相互作用メカニズムは選択的ではなく、サンプルにおいて不要な脂質と必要な疎水性物質が識別されません。このため、充填剤は脂質の取り込みでは機能しますが、疎水性物質とも強力に相互作用するため、カートリッジによるクリーンアップ時に分析対象物が大幅に損失してしまいます。さらに、疎水性相互作用では、すべてのクラスの脂質が効率的に除去できるとは限りません（例えば、リン脂質）。

Captiva EMR-Lipid 充填剤は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせた新しいケミストリを使用して、脂質除去の選択性を大幅に向上させています。直線的で枝分かれのない炭化水素鎖（できれば 6 つを超える炭素を持つ）を含む脂質に似た分子のみが、EMR-Lipid 充填剤の細孔に行き着きます。脂質は EMR-Lipid 充填剤に流入すると、強力な疎水性相互作用によって内部に取り込まれます。脂質に類似しておらず、EMR-Lipid 充填剤に流入するにはかさばりすぎているその他の疎水性分子は、その後の分析でも溶液内に残ります。このように、EMR-Lipid 充填剤は脂質を他の疎水性分子から効率的に識別できるため、選択性が大幅に向上し、クリーンアップ時の疎水性化合物の損失が大幅に低減します。

このメカニズムは、カートリッジクリーンアップを用いた回収率に関する試験によって、適切に実証されています。この研究では、カートリッジによるクリーンアップ前に、標準を牛肉ブランク抽出物にプレスパイクし、カートリッジによるクリーンアップ後に、標準をブランク溶離液にポストスパイクしました。回収率のデータから、カートリッジによるクリーンアップは分析対象物にのみ影響を与えることがわかります。比較試験では、次の 4 種類のカートリッジを用意しました。Captiva EMR-Lipid 3 mL (300 mg) および 6 mL (600 mg) カートリッジ、および他社の 3 mL (60 mg) および 6 mL (500 mg) カートリッジ。図 4 は、この試験の結果を示しています。比較して示されている分析対象物は疎水性の高い化合物で、C18 カラムでの溶出が遅くなっています。EMR-Lipid 3 mL および 6 mL カートリッジは、疎水性が中から高の化合物において、カートリッジクリーンアップでの回収率が一貫して優れた結果となりました。一方、

他社のカートリッジによるクリーンアップの場合、大部分の脂質除去で疎水性相互作用が使用されており、疎水性の高い（溶出の遅い）分析対象物の回収率は低くなりました。6 mL カートリッジ (500 mg) に含まれている同等の充填剤量を使用した場合、疎水性が中から高の化合物が大量に保持されました。例えば、疎水性が最も高い最後の 2 つの化合物であるニコロサミドとピチオノール ($\log P > 5$) では、他社の 6 mL カートリッジによるクリーンアップでの回収率は 1 桁であり、カートリッジでの分析対象物の損失が大きいのを示しています。他社の 3 mL カートリッジでは、疎水性物質の損失を相殺するために、使用される充填剤が非常に少なくなっています。つまり、60 mg の充填剤が入れられた他社のカートリッジクリーンアップチューブは、カートリッジマトリックスクリーンアップの効率が犠牲にされており、量が多くなると疎水性化合物の回収率が許容できないほどのレベルに低下しています (< 40%)。この試験では、EMR-Lipid 充填剤を使用すると脂質に対して選択性の高い相互作用メカニズムが作用し、特に疎水性物質であるターゲット化合物の回収率が許容できる値になることが明確に示されています。

メソッドバリデーション

完全な定量バッチを実行することで、最適化した抽出およびクリーンアップメソッドのバリデーションを行いました。手法は分析方法のセクションで説明しています。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両方に対してフルニキシン-d3）を使用しました。ただし、新たなサンプル前処理メソッドを評価する際の最大の課題は絶対回収率であるため、3 つのレベルでプレスパイクおよびポストスパイクした QC をバリデーションの実行に含めました。表 3 は詳細な定量結果を示しており、各レベルで平均回収率と精度を使用して要約した図（図 5）を作成しました。3 つのレベルにおいて大部分の分析対象物 (94%) で許容できる回収率 (60 ~ 120%) が達成されていますが、例外として 2 つの外れ値がアセトプロマジンとクロロプロマジンで発生しました。確認試験により、プロトコルの抽出ステップ時にこれらの化合物で分析対象物が損失した可能性があることがわかっています。ただし、各レベルにおけるこれら 2 つの化合物の 6 回の繰り返し分析の RSD 値は例外的であり、分析対象物の 91% において < 10% RSD、および残りの 9% において 10 ~ 20% RSD を示しました。

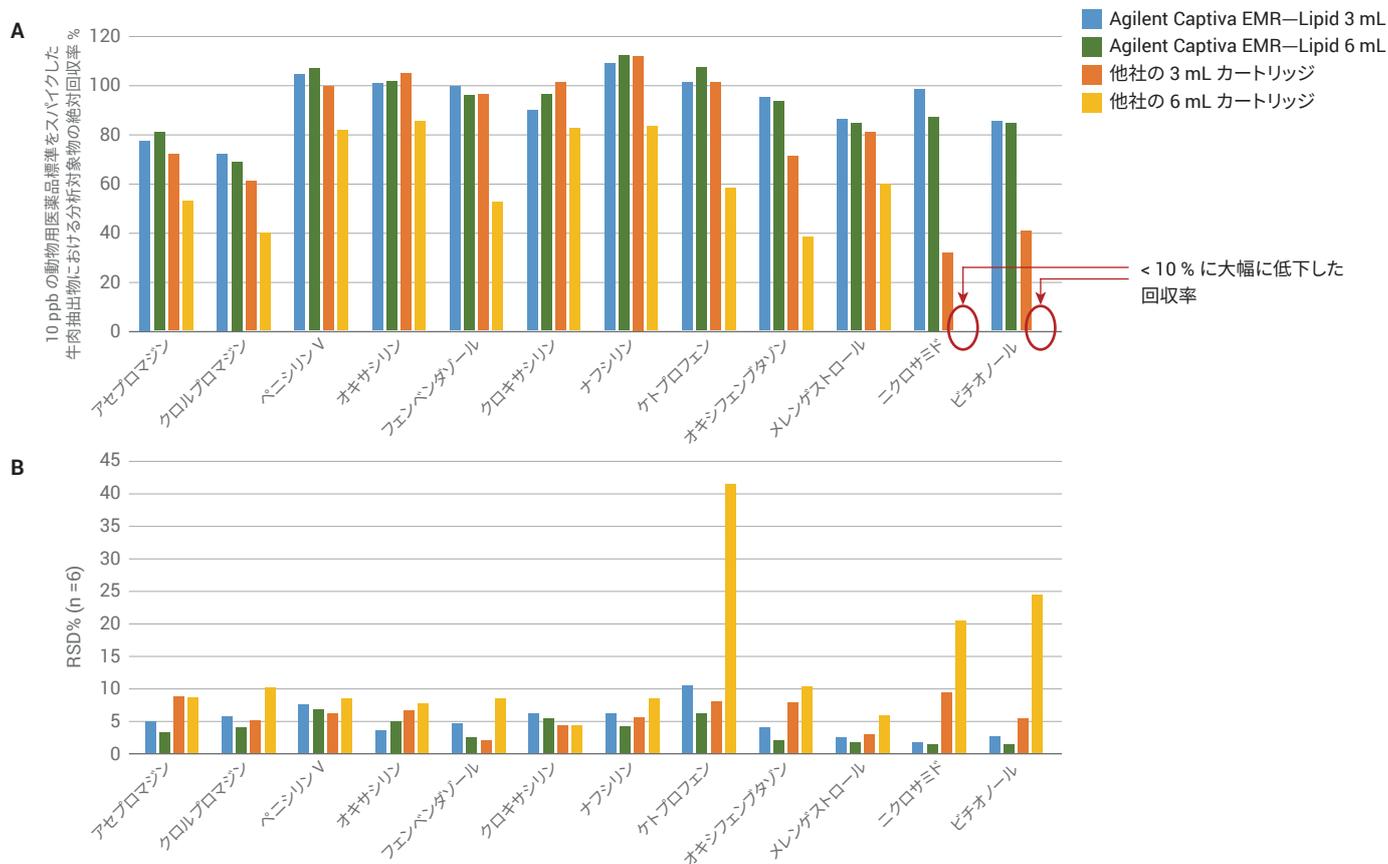


図 4. カートリッジによるクリーンアップを用いた牛肉抽出物の疎水性物質の回収率 (A) および再現性 (B) の比較。標準はカートリッジによるクリーンアップ前に 10 ng/mL で牛肉抽出物にスパイク。左から右の順序で分析対象物の疎水性が増大

表 3. 牛肉内の動物用医薬品分析に関するメソッド定量の結果

グループ 番号 ^a	分析対象物	検量線		メソッド絶対回収率と精度									
		R ²	キャリブレーション範囲 (ng/g)	2 ng/g QC (n = 6)		10 ng/g QC (n = 6)		50 ng/g QC (n = 6)		150 ng/g QC (n = 6)		750 ng/g QC (n = 6)	
				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	0.9862	5~1,000	-	-	94	6.7	116	2.2	-	-	103	4.1
1	アモキシシリン	0.9964	5~1,000	-	-	88	8.6	77	3.9	-	-	69	2.7
1	メトロニダゾール-OH	0.9963	5~1,000	-	-	112	3.8	108	1.8	-	-	103	2.1
1	アンピシリン	0.9926	5~1,000	-	-	88	9.6	84	3.8	-	-	82	4.2
1	ミノサイクリン	0.9943	5~1,000	-	-	72	13.3	69	11.2	-	-	62	2.9
1	オキシテトラサイクリン	0.9941	5~1,000	-	-	84	6.2	87	11.0	-	-	72	5.1
1	テトラサイクリン	0.9919	5~1,000	-	-	87	9.0	86	5.2	-	-	90	4.1
1	セファゾリン	0.9933	5~1,000	-	-	109	5.8	94	2.8	-	-	87	5.4
1	デメクロサイクリン	0.9966	5~1,000	-	-	80	17.6	86	3.4	-	-	86	3.8
1	ジフロキサシン	0.9824	5~1,000	-	-	122	7.3	102	5.9	-	-	102	5.0
1	ガミスロマイシン	0.9901	5~1,000	-	-	100	8.9	92	5.3	-	-	89	6.1
1	クロルテトラサイクリン	0.9976	5~1,000	-	-	80	7.8	86	8.5	-	-	81	4.1
1	ドキシサイクリン	0.9936	5~1,000	-	-	77	11.2	70	5.4	-	-	73	4.7
1	フロルフエニコール	0.9920	5~1,000	-	-	116	4.4	110	3.8	-	-	99	7.1
1	クロラムフェニコール	0.9928	5~1,000	-	-	113	7.6	104	1.9	-	-	103	3.4
1	ブレドニゾン	0.9932	5~1,000	-	-	110	6.7	110	5.5	-	-	106	5.4
1	クロルスロン	0.9927	5~1,000	-	-	114	12.1	97	4.8	-	-	98	5.7
1	ベニシリン V	0.9952	5~1,000	-	-	97	4.3	100	6.3	-	-	100	7.1
1	オキサシリン	0.9942	5~1,000	-	-	96	12.0	99	8.2	-	-	99	5.1
1	クロキサシリン	0.9932	5~1,000	-	-	103	8.1	101	6.0	-	-	97	5.7
1	ナフシリン	0.9926	5~1,000	-	-	107	8.9	110	6.5	-	-	95	5.6
1	オキシフェンブタゾン	0.9910	5~1,000	-	-	106	8.1	98	3.0	-	-	86	2.8
1	酢酸メレンゲストロール	0.9942	5~1,000	-	-	117	7.0	114	3.0	-	-	102	5.1
1	ピチオノール	0.9807	5~1,000	-	-	63	8.2	81	5.7	-	-	92	1.4
2	リンコマイシン	0.9961	1-200	94	8.5	99	3.0	-	-	88	6.4	-	-
2	レバミゾール	0.9942	1-200	111	2.1	109	3.0	-	-	99	1.3	-	-
2	ノルフロキサシン	0.9974	1-200	111	5.5	91	4.9	-	-	100	8.0	-	-
2	シプロフロキサシン	0.9965	1-200	114	11.8	103	6.9	-	-	103	4.0	-	-
2	ダノフロキサシン	0.9969	1-200	101	8.3	94	5.8	-	-	99	5.6	-	-
2	ラクトバミン	0.9858	1-200	120	6.5	110	5.5	-	-	109	3.2	-	-
2	スルファメチゾール	0.9950	1-200	102	11.0	105	2.5	-	-	97	5.0	-	-
2	スルファメトキシピリダジン	0.9949	1-200	118	9.7	106	6.3	-	-	86	4.6	-	-
2	モランテル	0.9965	1-200	107	7.8	112	6.1	-	-	109	6.5	-	-
2	タイロシン	0.9946	1-200	125	5.3	105	4.8	-	-	98	7.5	-	-
2	アセトプロマジン	0.9942	1-200	66	7.9	52	3.2	-	-	56	3.7	-	-
2	クロルプロマジン	0.9944	1-200	50	9.2	36	3.2	-	-	43	4.1	-	-
2	フェンペンダゾール	0.9910	1-200	76	5.6	99	1.6	-	-	90	4.9	-	-
2	ケトプロフェン	0.9911	1-200	112	9.4	102	7.0	-	-	103	1.9	-	-
2	ニコロサミド	0.9964	1-200	120	10.2	85	8.5	-	-	89	2.1	-	-

^a グループ 1 の分析対象物の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、および 750 ng/g。グループ 2 の分析対象物の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、および 150 ng/g

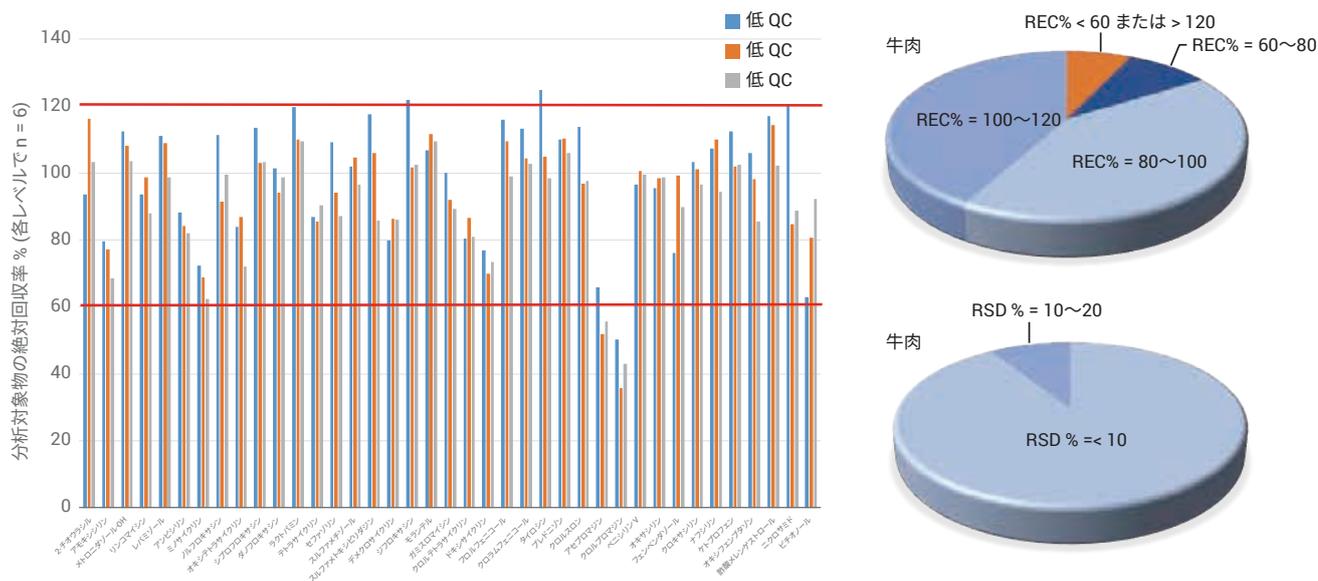


図 5. 牛肉内の動物用医薬品分析のメソッドバリデーションにおける分析対象物の絶対回収率と統計解析。詳細については表 3 を参照

結論

固液抽出と、それに続いて Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによる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、牛肉中の複数の動物用医薬品残留物の分析用に開発して検証しました。抽出方法を変更して水性抽出ステップを適用した後に、有機溶媒抽出ステップを適用して分析対象物の回収率を最適化しました。クリーンアップのためにこれらの抽出物を混合して Captiva EMR-Lipid カートリッジに注入しました。マトリックス共溶出とマトリックス効果は、他社製の同様のカートリッジと注意深く比較して評価しました。分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響についての試験では、EMR-Lipid 充填剤を使用すると脂質除去の選択性が高くなり、ターゲット化合物の不必要な損失は発生しませんでした。結果から、最適化した固液抽出に続いて Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施するメソッドは、この種類のアプリケーションにおいて優れたマトリックスクリーンアップ、回収率、および精度を達成していることがわかります。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000, www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.html.
2. 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. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.J. Chromatogr.A **2008**, 1202, 118-123.
4. Geis-Asteggiante, L.; et al.Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.J. Chromatogr. A **2012**, 1258, 43-54.
5. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.Anal. Bioanal.Chem.**2015**, 407, 4423-4435.
6. Han, L.; et al.Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. J. Chromatogr.A **2016**, 1449, 17-29.
7. López-Blanco, R.; et al.Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry.J. Chromatogr.A **2016**, 1456, 89-104.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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 7, 2017
5991-8598JAJP