

# Agilent Captiva EMR-Lipid と LC/MS/MS による 豚肉およびブタ肝臓中のホルムアミジン系農薬 および代謝物の分析

## 著者

Xia Yang  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

ホルムアミジン系農薬は農作物や家畜の害虫防除に広く使用されており、動物由来食品の安全性における潜在的なリスクとなっています。このアプリケーションノートでは、豚肉やブタ肝臓中のアミトラズ、クロロジメホルム、およびこれらの代謝物の残留物分析において、QuEChERS 抽出の後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを使用する、信頼性が高い堅牢なメソッドを解説します。このメソッドは、4 つの分析対象物についてすべてのレベルで優れた真度 (> 60.0 %) と精度 (RSD < 12 %) を実現しているため、高脂質サンプルの高速かつ効率的な分析を提供します。

## はじめに

ホルムアミジン系はダニ駆除剤の 1 つで、特徴的な化学構造的活性と生物学的活性を持ちます<sup>1</sup>。ダニやウシダニのほか、従来のダニ駆除剤や殺虫剤に耐性を持つようになったある種の昆虫の防除に使用されています<sup>2</sup>。クロロジメホルム (CDM) およびアミトラズ (AMZ) はホルムアミジン系のダニ駆除剤であり、家畜にスプレーすることで昆虫や害虫を忌避する薬剤として普及しています。そのため、これらの化合物が動物に吸収されています。CDM は禁止されましたが、AMZ は現在も世界中で使用されています。EN 委員会規則 2017/623 は、さまざまな種類の家畜への使用について、AMZ とその代謝物の最大残留基準値 (MRL) を規定しています<sup>3</sup>。

Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) は、多くのアプリケーションにおいて、ターゲット化合物に限定的に影響することにより、効率的な脂質除去を実現します<sup>4,5</sup>。EMR-Lipid クリーンアップによる選択的で効率的な除去は、サイズ排除と疎水性相互作用という独自の組み合わせによるものです。脂質様分子の長い非分岐の脂肪族鎖のみが、EMR-Lipid 充填剤によってトラップされます。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簡単にできます。さらに、目的の脂質除去を達成するために水量を低減する必要があるため、親水性化合物の回収率も向上します。

このアプリケーションノートでは、豚肉とブタ肝臓中の AMZ、CDM、およびこれらの代謝物の分析における Captiva EMR-Lipid カートリッジのクリーンアップの使用について検討しています。表 1 に、分析対象の農薬の化学的情報を示します。

## 実験方法

### 試薬と化学物質

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) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。ギ酸 (FA) と水酸化アンモニウム (NH<sub>4</sub>OH) は J&K Scientific Ltd. (北京、中国) から入手しました。農薬および代謝物の標準は Alta (天津、中国) 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 ACN 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) を ACN を用いて調整しました。抽出溶媒 ACN を低温抽出用に -20 °C で保管しました。

### 実験装置と材料

Agilent 1290 Infinity LC と、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソースを搭載した Agilent 6495B トリプル四重極 LC/MS システムとを組み合わせて使用し、分離を実行しました。データの取り込みと解析には、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、6 mL、600 mg (p/n 5190-1004)
- 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 1 は、開発したサンプル前処理メソッドを使用し、4 種類の標準分析対象物と豚肉およびブタ肝臓のマトリックスブランクを比較したクロマトグラムです。豚肉およびブタ肝臓マトリッ

クス中の 3 種類の分析対象物が 0.1 ng/g 以下の濃度で適切に定量化できることが示されています。ただし、2,4-DMA だけは 1 ng/g で定量されています。複雑なマトリックスに由来する相互干渉は、2,4-DMA (MW 121 Da) のような低分子のレスポンスに影響を与える可能性があります。このため、MRM 定量イオ

ンペアをより慎重に選択しました。マトリックスとの相互干渉が最小となる、3 番目に高いペア (*m/z* 121.1 & 105) を定量のために選択しました。

表 1. ターゲット分析対象物、化学構造、分子量、log P、pKa、EN 規制 2017/623 における MRL (アミトラスおよびその代謝物は合計で表示)

分析対象物	化学構造	MW (Da)	logP	pKa	MRL (ng/g)
アミトラス (AMZ)		293.41	5.5	4.2	400 (豚肉) 200 (ブタ肝臓)
2,4-キシリジン (2,4-DMA)		121.18	1.68	4.89	
クロロジメホルム (CDM)		196.68	2.89	6.8	N/A
4-クロロ- <i>o</i> -トルイジン (DCDM)		141.6	2.27	3.85	

### HPLC 条件

パラメータ	設定値																					
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (p/n 959757-902)																					
カラム温度	35 °C																					
オートサンブラ温度	10 °C																					
注入量	10 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>5</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>0.1</td><td>5</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>3</td><td>45</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>5</td><td>95</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>7</td><td>95</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>7.1</td><td>5</td><td>0.3</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	0	5	0.3	0.1	5	0.3	3	45	0.3	5	95	0.3	7	95	0.3	7.1	5	0.3
時間 (分)	%B	流量 (mL/min)																				
0	5	0.3																				
0.1	5	0.3																				
3	45	0.3																				
5	95	0.3																				
7	95	0.3																				
7.1	5	0.3																				
ストップタイム	10 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
ガス温度	210 °C
ガス流量	13 L/min
ネブライザ	35 psi
ソースガスヒーター	400 °C
ソースガス流量	12 L/min
キャピラリー	3,500 V
デルタ EMV (+)	400 V

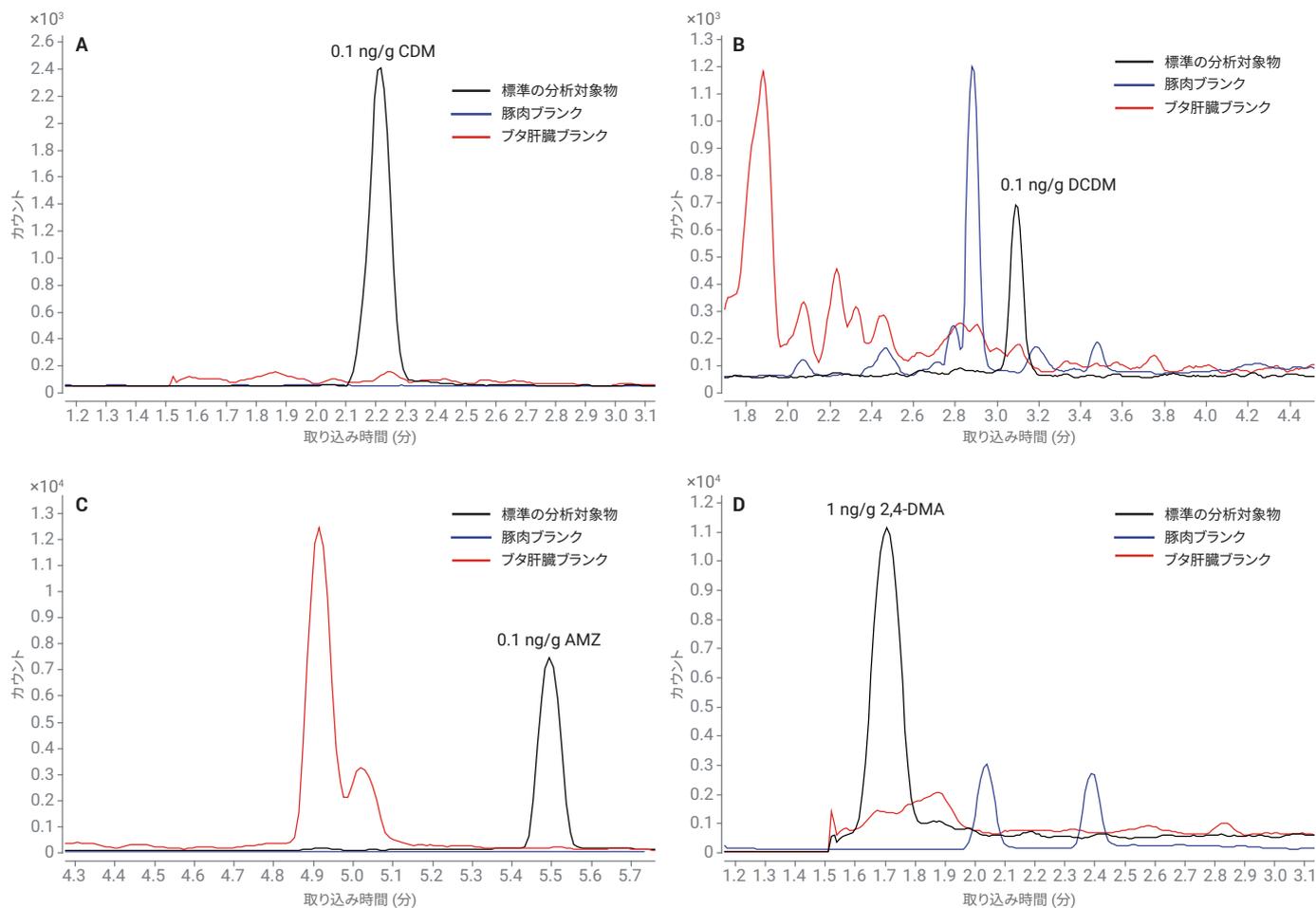


図 1. 定量 MRM イオンペアモニタリング下での 4 種類の希釈していない標準分析対象物 (黒色トレース)、豚肉ブランク (青色トレース)/ブタ肝臓ブランク (赤色トレース) の LC/MS/MS MRM クロマトグラム (A: CDM, B: DCDM, C: AMZ, D: DMA)

## MRM のパラメータ

化合物	リテンション タイム (分)	プリカーサイオン (m/z)	定量イオン (m/z) (CE, V)	確認イオン (m/z) (CE, V)	セル加速電圧 (V)
AMZ	5.5	294.2	163.1 (9)	122.0 (32)	3
2,4-DMA	1.7	122.1	105 (17)	107 (21) 77 (33) 103 (25)	3
CDM	2.2	197.1	46.1 (21)	116.9 (29)	3
DCDM	3.1	142.0	107 (21)	125 (21)	3

## サンプル前処理

図 2 は、サンプル前処理の手順を示しています。豚肉は一般的に固体で、均質化を容易にするために 1 mL の水が必要ですが、ブタ肝臓は水を余分に加えなくても簡単に均質化できます。しかし、ブタ肝臓はより複雑で、注入前に水で 1:2 に希釈した後に AMZ の沈殿がみられます。このため、2  $\mu$ L のブタ肝臓サンプルは EMR-Lipid クリーンアップ後に希釈せずに注入しました。

## キャリブレーション標準と品質管理 (QC) サンプル

EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップ後に、適切な標準溶液をマトリクスブランクにスパイクすることにより、マトリクス適合検量標準およびポストスパイク QC サンプルを準備しました。標準溶液用のスパイク濃度は、豚肉およびブタ肝臓中で 0.1、0.5、1、5、10、50、100、200 ng/g でした。

適切な標準液を低 (0.1 と 1 ng/g)、中 (5 ng/g)、高 (50 ng/g) のレベルで、均質化した豚肉またはブタ肝臓サンプルにスパイクすることにより、プレスパイクした QC サンプルを 6 点ずつ作成しました。

## 結果と考察

### 抽出の最適化

動物由来のサンプルマトリクスの場合、タンパク質の除去には一般的に溶媒抽出が使用されます。図 3 に示すように、4 種類の分析対象物のレスポンスに対する溶媒抽出の影響を、酸性、中性、塩基性の ACN を使用して調査しました。AMZ は、酸性抽出では劣化の問題を示しましたが、pH 調整をしない ACN 抽出では最適なレスポンスを示しました。

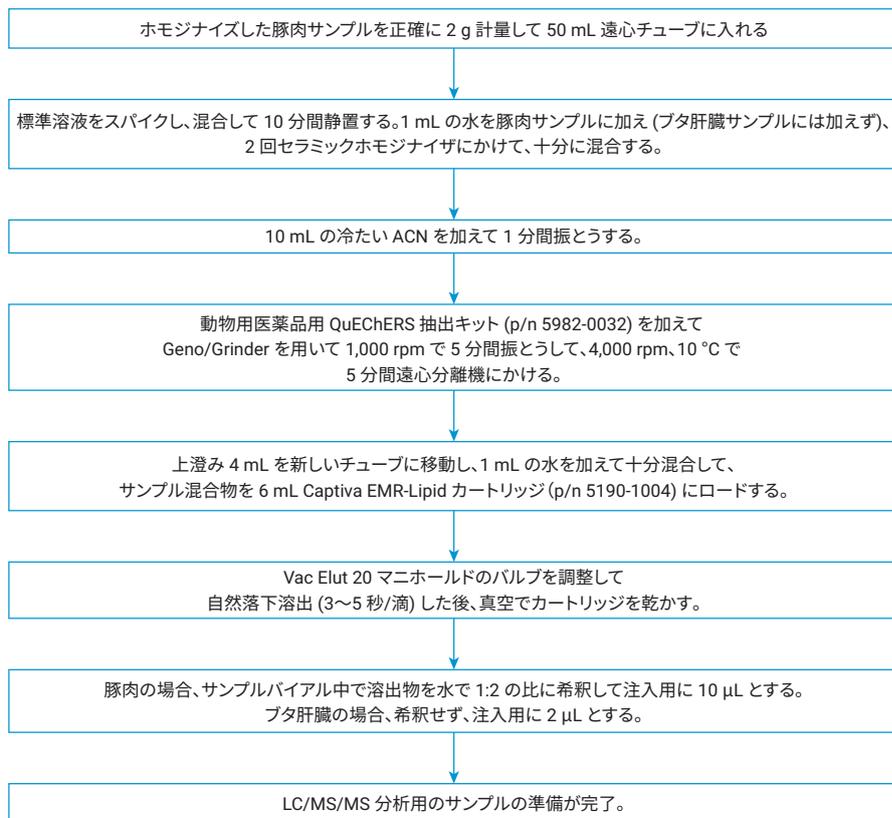


図 2. Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジを使用した豚肉のサンプル抽出とその後クリーンアップ手順

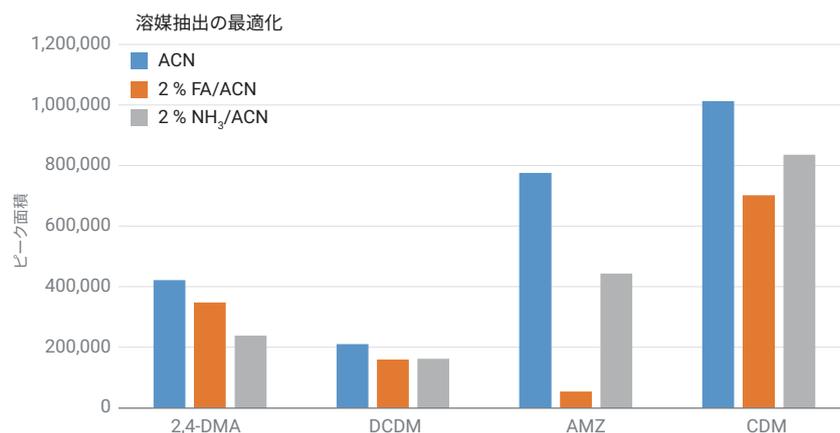


図 3. 4 種類の分析対象物のレスポンスに与える抽出溶媒の影響

サンプル抽出について QuEChERS と溶媒抽出を比較しました。推奨として、脂質を十分に除去するためには、サンプルを Captiva EMR-Lipid カートリッジへロードする際に動物由来サンプル抽出物と混合する 20% の水が必要です。このためには、20:80 水/ACN 溶媒抽出を使用します。しかし、この場合、内部標準補正を使用せずに正確な計算を得る上で、いくつかの問題が生じます。また、疎水性化合物の抽出効率に影響が及びます。図 4 は、アジレントの動物用医薬品用 QuEChERS 抽出キットと ACN を用いた溶媒抽出による、2 つの抽出手順を比較した結果を示しています。この結果では、QuEChERS 抽出によって DCDM、CDM、AMZ の抽出が向上したため、これを本アプリケーションに選択しました。

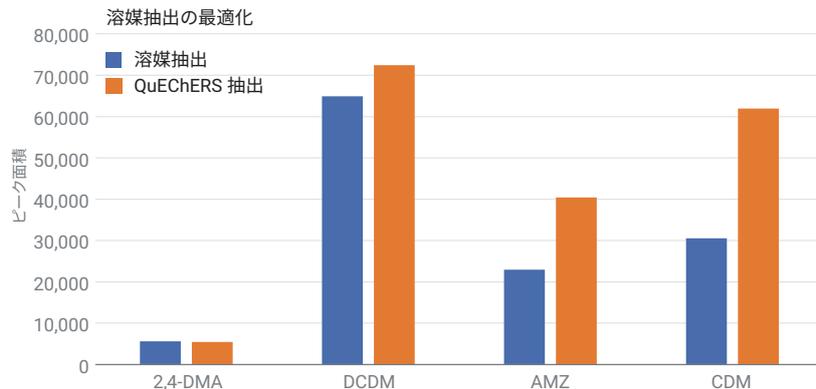


図 4. 4 種類の分析対象物のレスポンスに与える抽出方法の影響

### 直線性

データは MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。検量線から、 $R^2$  値 > 0.990 がすべての農薬と代謝物について得られました。表 2 に得られたデータを示します。

### 回収率と精度の結果

3 または 4 種類の QC レベルでスパイクしたサンプルを分析して、最適化された抽出およびクリーンアップメソッドを評価しました。回収率は、プレスパイクとポストスパイクの QC のピーク面積を比較して計算しました。表 2 に定量結果の詳細を示します。豚肉とブタ肝臓の両方に含まれるすべての分析対象物について、すべての濃度で良好な回収率が得られました。4 種類の分析対象物の 6 回繰り返しの RSD 値は 11.1% 未満で、代表的な RSD は 5.2% でした。

表 2. 豚肉とブタ肝臓中の 4 種類の分析対象物についてのメソッドの定量結果

分析対象物	マトリックス	$R^2$	直線範囲 (ng/g)	0.1 ng/g QC (n = 6)		1 ng/g QC (n = 6)		5 ng/g QC (n = 6)		50 ng/g QC (n = 6)	
				回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD
2,4-DMA	豚肉	0.995	1 ~ 200	-	-	87.3	5.6	82.0	10.2	87.1	5.6
	ブタ肝臓	0.999	1 ~ 200	-	-	90.1	7.3	98.4	2.3	91.9	0.7
AMZ	豚肉	0.993	1 ~ 100	-	-	127.4	1.9	118.7	4.7	79.1	5.4
	ブタ肝臓	0.991	1 ~ 200	-	-	60.9	2.7	69.2	6.7	74.8	11.1
DCDM	豚肉	0.999	0.1 ~ 100	76.6	10.4	87.1	6.8	89.8	5.3	95.2	4.6
	ブタ肝臓	0.999	0.1 ~ 100	86.5	7.9	97.2	7.3	97.3	1.3	91.7	1.9
CDM	豚肉	0.998	0.1 ~ 100	73.9	1.5	66.7	3.8	68.3	10.1	66.1	7.3
	ブタ肝臓	0.997	0.1 ~ 200	105.6	8.5	60.4	3.6	64.4	0.8	60.2	1.6

## 結論

豚肉やブタ肝臓中のホルムアミジン系農薬および代謝物を定量化するために、QuEChERS抽出を使用した後に Captiva EMR-Lipid クリーンアップを行う容易かつ信頼性の高いサンプル前処理を確立し、実証しました。このメソッドにより、豚肉とブタ肝臓マトリックスにおいて、60%を超える回収率かつ12%未満のRSDという優れた結果を得られます。禁止された農薬であるCDMおよびその代謝物のDCDMの定量下限(LOQ)は0.1 ng/g未満でした。規制対象の農薬AMZとその代謝物2,4-DMAのLOQは、EU指定のMRLを大幅に下回りました。

## 参考文献

1. Hollingworth, R. M. Chemistry, biological activity, and uses of formamidine pesticides, *Environmental Health Perspectives* **1976**, 14, 57–69.
2. Evans, P. D.; Gee, J. D. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors, *Nature* **1980**, 287, 60–62.
3. Commission Regulation (EU) 2-17/623, *Official Journal of European Union*.
4. 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.
5. Zhao, L.; Lucas, D. Multiclass multiresidue veterinary drug analysis in beef using Agilent Captiva EMR—Lipid cartridge cleanup and LC/MS/MS. *Agilent Technologies*, publication number 5991-8598EN.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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, March 25, 2019  
5994-0357JAJP