



Bond Elut EMR Lipid を用いた マトリックス除去効果の検討



<要旨>

GC/MS による残留農薬分析において脂質マトリックスの除去は正確な定量のために非常に重要です。新製品の Bond Elut EMR Lipid は脂質除去に特長を持つ新しい充填剤で、今回 QuEChERS 法の分散固相抽出で従来から使用されている PSA と C18 の充填剤とその夾雑物の除去能力の比較を行いました。その結果 EMR Lipid はモノ/ジ/トリグリセリド、ステロール類の除去能力が高く、遊離脂肪酸については PSA+C18 の方が除去能力が高いことが明らかとなりました。

Key Words: Bond Elut EMR Lipid、QuEChERS 法、マトリックス、脂質、脂肪酸、グリセリド、ステロール

1. はじめに

GC/MS による残留農薬分析では、試料中に脂質マトリックスが残存していると、測定対象化合物の妨害、リテンションタイムのずれ、ピーク形状の崩れなどの原因となります。脂質の種類によっては注入口やカラムに残存し、頻繁なメンテナンスが必要になります。トリグリセリドの分解物であるモノグリセリド(モノアシルグリセロール)はマトリックス効果の原因¹⁾²⁾³⁾ともなり、正確な定量値を求めるためにはできるだけ除去することが望まれます。

新規充填剤 Bond Elut EMR (Enhanced Matrix Removal) Lipid は脂質除去に特化した充填剤であり、主に QuEChERS 法の分散固相抽出に使用するために開発されました。今回は脂質の多い試料を用いて、QuEChERS 法で従来から使用されている PSA と C18 の固相を組み合わせた分散固相抽出と Bond Elut EMR Lipid による分散固相抽出を行ない、脂質の除去効果を比較しました。

2. 実験方法

(1)マトリックス標準混合溶液

過去の知見に基づき、残留農薬分析において最終検液に残存しうる化合物群の中からいくつかの代表成分をピックアップし、マトリックス標準混合溶液(アセトニトリル)を調製しました。

脂肪酸: パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸、オレイン酸

トコフェロール: α -トコフェロール

ステロール: スチグマステロール、コレステロール

モノグリセリド: 1-モノミリスチン、1-モノパルミチン、1-モノステアリン

フラボノイド化合物: ケルセチン、ヘスペレチン、ダイゼイン

その他: フィトール

濃度は、モノアシルグリセロール類は各 50ppm、それ以外のマトリックス成分は各 200ppm としました。

(2) 実サンプル

脂質が多いと考えられるアボカド、オレンジ、大豆、ブリ、豚レバー、豚ひき肉、卵、牛乳、ゴマ油を検討に用いました。

(3) 前処理

前処理は以下の手順で行ないました。

a. 抽出

ホモジナイズした実試料 10g

(大豆はミルで粉碎した試料 5g に蒸留水 10mL

ゴマ油は 5g に蒸留水 10mL)を

50mL 遠沈管に入れる

↓

アセトニトリル 10mL を加えて振とう 1 分

↓



Agilent Technologies

Bond Elut QuEChERS 抽出キット(EN15662)

(P/N 5982-5650)を加える

↓

振とう 1 分

↓

遠心分離 3000rpm 5 分

b. Bond Elut EMR Lipid による分散固相抽出

Bond Elut EMR 分散キット(P/N 5982-1010)に蒸留水 5mL を入れてコンディショニング

↓

a. で作成したアセトニトリル上清のうち 5mL を入れる

↓

試験管ミキサーで攪拌

↓

遠心分離 3000rpm 5 分

↓

上清を 15mL の遠沈管に移す

↓

Bond Elut EMR Lipid 脱水キット(P/N 5982-0102)を入れる

↓

試験管ミキサーで攪拌

↓

遠心分離 3000rpm 5 分

↓

アセトニトリル層(上層)を回収

c. PSA と C18 による分散固相抽出

a.で作成したアセトニトリル上清のうち 1mL を脂質の多い試料用分散キット 2mL(P/N 5982-5222)

(PSA 50mg、C18 50mg)に入れる

↓

振とう 1 分

↓

遠心分離 3000rpm 5 分

↓

上清を回収

マトリックス標準混合溶液については、b.、c.の分散固相抽出の操作だけを行ないました。

(4) 誘導体化

(3)の b.、c.で作成した上清からそれぞれ 100 μ L を取って窒素乾固した後に、ピリジン(脱水)を 40 μ L、MSTFA+1%TMCS を 60 μ L 添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させました。

(5) 分析条件

表 1 の条件で GC/MS による分析を行ないました。

表 1. GC/MS 分析条件

GC	Agilent 7890B
MS	Agilent 5977
カラム	DB-5ms+Duragurd 30m+10m x 0.25mm i.d., 膜厚 0.25mm
オープン	60 $^{\circ}$ C(1min)→ 10 $^{\circ}$ C/min→325 $^{\circ}$ C
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
トランスファーライン 温度	290 $^{\circ}$ C
イオン源温度	250 $^{\circ}$ C
注入モード	スプリット(10:1)
ガス流量	1.1mL/min
ライナー	ウルトライナー シングルテーパー,低圧力損失, ウール入
測定モード	Scan (m/z 50-600)

3. 結果および考察

(1) マトリックス標準混合品によるマトリックス除去効果の検討

表 2 にマトリックス混合標準品によるマトリックス除去率の結果を示します。



Agilent Technologies

表 2 マトリックス混合標準品によるマトリックス除去率(%)

		C18+PSA	EMR Lipid
脂肪酸	パルミチン酸	100	100
	リノール酸+リノレン酸	99	100
	オレイン酸	98	100
フィトール	フィトール	15	36
トコフェロール	αトコフェロール	32	68
ステロール	スチグマステロール	67	99
	コレステロール	66	99
モノグリセリド	1-モノミリスチン	36	100
	1-モノパルミチン	36	100
	1-モノステアリン	42	100
フラボノイド	ケルセチン	100	20
	ヘスペレチン	100	40
	ダイゼイン	97	30

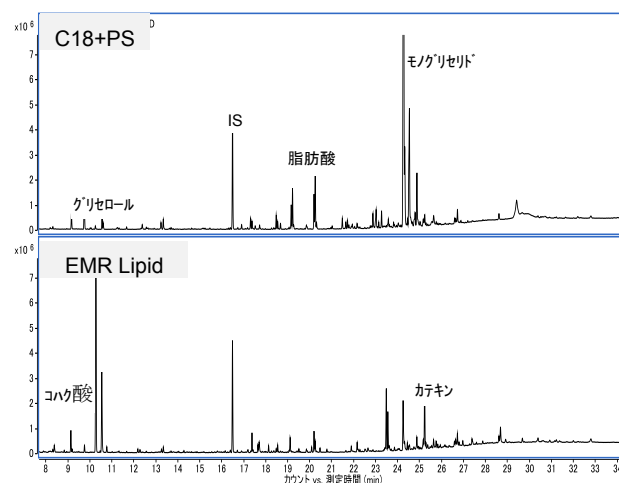
EMR Lipid を用いた場合、脂肪酸、ステロール、モノグリセリドでほぼ 100%に近い良好な除去結果が得られました。一方、フィトールでは30%前後、トコフェロールは 65%程度、ケルセチン等のフラボノイド化合物は 40%と低い除去率でした。従来の QuEChERS 法で脂質の多いサンプルに適用する C18+PSA の場合は、脂肪酸およびフラボノイド化合物でほぼ 100%と良好な除去率になりましたが、フィトール、トコフェロール、モノグリセリドでは低い結果となりました。

(2) 実サンプルによるマトリックス除去効果の比較

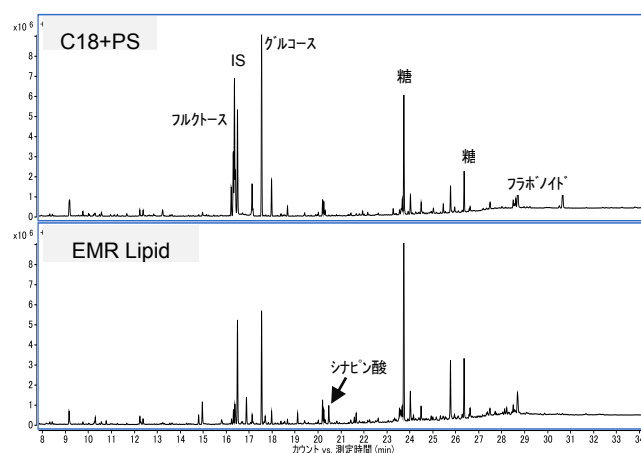
実試料を用いて EMR Lipid を精製に用いた時と C18+PSA を用いた時の比較を行ないました。EMR Lipid と C18+PSA ではマトリックスの種類により除去できる成分に違いが認められました。マトリックス効果の原因となるモノグリセリドは EMR Lipid での除去効果が高く、ステロール類についても EMR Lipid の方が C18+PSA よりも除去効果が高い結果となりました。脂肪酸については C18+PSA の方が除去効果が高く、また、ダイゼイン、ゲニステイン、カテキン類等のフラボノイド類についても C18+PSA の方が除去効果が高い結果となり、いずれもマトリックス標準混合品で検討した時と同様の効果が認められました。

実試料でのマトリックス除去効果の比較クロマトグラムを図 2 に示します。

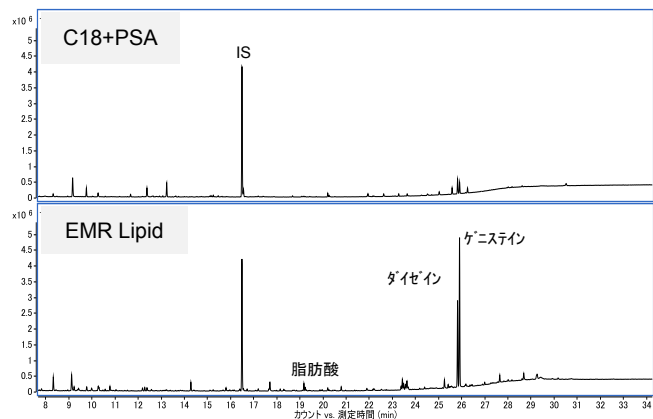
アボカド



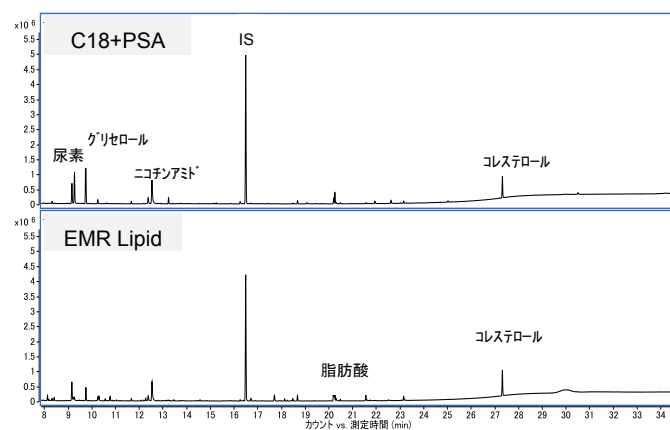
オレンジ



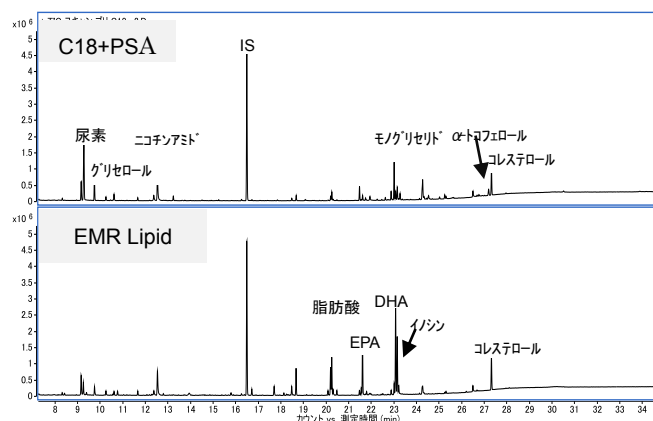
大豆



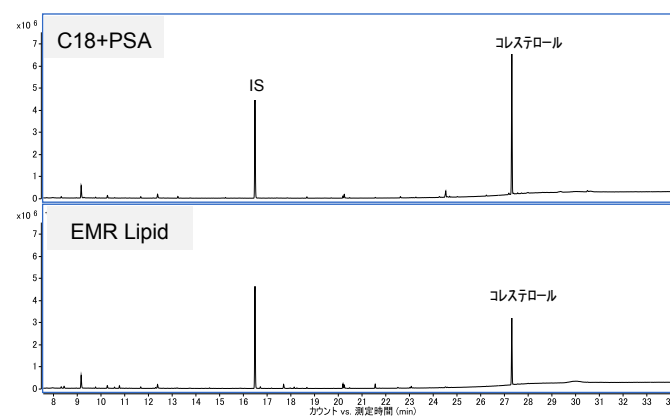
豚ひき肉



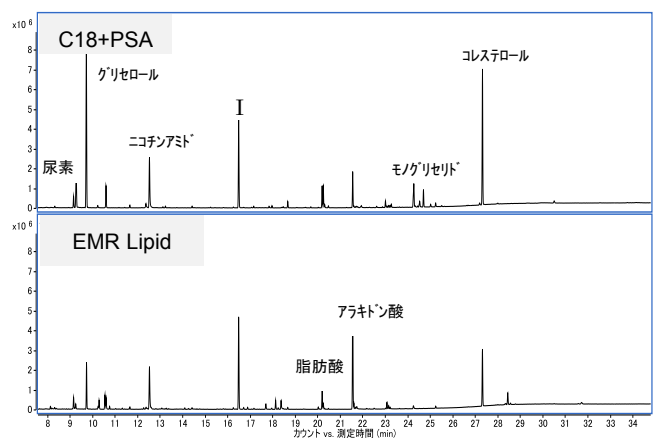
ブリ



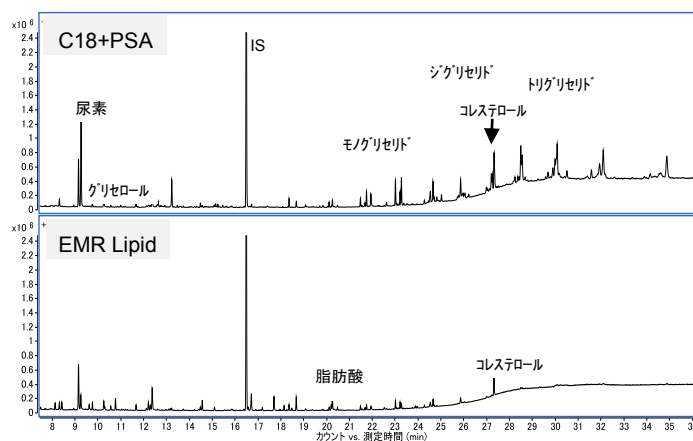
卵



豚レバー



牛乳



Agilent Technologies

ゴマ油

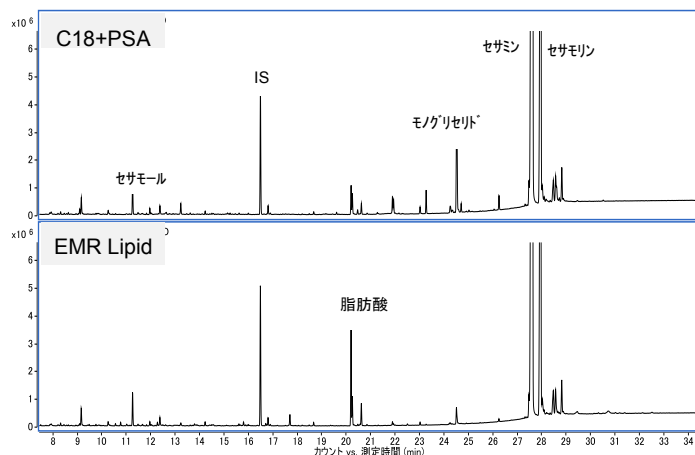


図 2 実試料によるマトリックス除去効果の比較

4. まとめ

新製品 Bond Elut EMR Lipid と従来から QuEChERS 法で脂質の多い試料に使われている PSA+C18 の分散固相抽出でのマトリックス除去効果を比較し、それぞれが効果的に除去できる夾雑物をまとめると、表 3 のような結果となりました。

表 3 各分散固相抽出で効果的に除去できる夾雑物

EMR Lipid	トリグリセリド、ジグリセリド、 モノグリセリド、コレステロール
PSA+C18	遊離脂肪酸、フラボノイド類

EMR Lipid と他の分散固相抽出を組み合わせた場合の効果については今後の検討課題とします。

本研究は第 39 回農薬残留分析研究会(2016.10.13～14)において発表しました。

参考文献

- 1) K. Sugitate *et. al.*, "Search of components causing matrix effects on GC/MS", *J. Pestic. Sci.* **37**(2), 156-163 (2012)
- 2) Sugitate *et. al.*, "Matrix Behavior during Sample Preparation Using Metabolomics Analysis Approach for Pesticide Residue Analysis by GC-MS in Agricultural Products", *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 10226-10234
- 3) 杉立久仁代, 坂真智子,「新型固相カラムによるマトリックス除去効果とマトリックス効果の関係」, 第 37 回農薬残留分析研究会要旨集, 163-172 (2014)

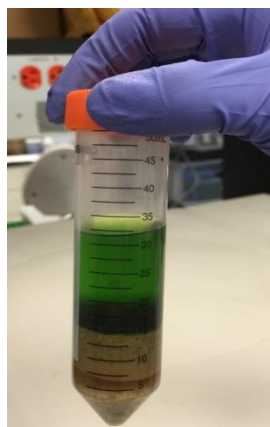
【GC-MS-201701YS-001】

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障害について一切免責とさせていただきます。
また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies



QuEChERS 法又は
その他の方法で
サンプルから目的成分を
アセトニトリルに抽出



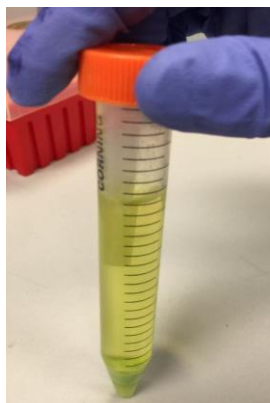
EMR 分散キット
(5982-1010)に
蒸留水 5mL を
入れて活性化



活性化した分散キットに
アセトニトリル抽出液 5mL
を入れる



試験管ミキサーで混合



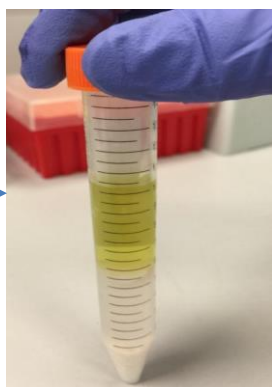
充填剤を遠沈する



上清を脱水キット
(5982-0101)に移す



試験管ミキサーで混合



アセトニトリル層(上層)と
水層(下層)が分離する



アセトニトリル層(上層)を
分析に供する

