EMR Lipid 充填剤と他の前処理法による マトリックス除去効果の違い　GC/MS 編

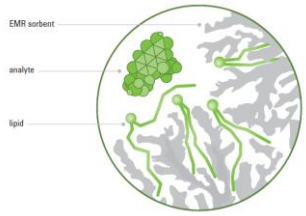


図 1 EMR Lipid　充填剤の構造

<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 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 の充填剤および他社の相当製品とその夾雑物の除去能力の比較を行ないました。その結果 EMR Lipid は長鎖脂肪酸、コレステロールの除去能力が高く、遊離脂肪酸、低分子有機酸については PSA の方が除去能力が高いことが明らかとなりました。

Key Words: EMR Lipid、QuEChERS 法、マトリックス、有機酸、脂肪酸、コレステロール

＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊＊

1.　はじめに

GC/MS による食品や生体試料中の薬剤、添加物、残留農薬等の分析では、元の試料中由来の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。マトリックスの種類によっては注入口やカラムになど残存し、頻繁なメンテナンスが必要になります。そのため、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 EMR (Enhanced Matrix Removal) Lipid は脂質除去に特化した充填剤であり、図 1 に示すような構造で、分子ふるい効果と疎水性相互作用により、長鎖をもつ脂質類を特異的に吸着する特長を持ちます。従来、脂質除去を目的とした充填剤が脂質除去と同時に疎水性の分析対象の薬剤等の回収率を下げてしまうことが多かったのですが、この問題点の解決に役立ちます。製品としては QuEChERS 法の分散固相抽出に使用する Bond Elut QuEChERS EMR Lipid とカートリッジに充填した形状で試料液を通過させて使用する Captiva EMR-Lipid の 2 形状があります。

今回は脂質の多い食品試料を用いて、これら 2 種類の EMR Lipid 製品と従来から使用されている脂質除去用の前処理製品、方法によるマトリックスの残存状況を比較し、その効果を検証しました。

2.　実験方法

(1) 食品試料

脂質が多いと考えられるアボカド、豚ひき肉、牛乳、コショウ、冷凍餃子を検討に用いました。

(2) 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

(コショウはミルで粉砕した試料 2g 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

↓

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.　精製

b-1. 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

b-2. Captiva EMR による前処理

a.で作成したアセトニトリル上清　3mL に蒸留水　0.6mL を加える

↓

Captiva　EMR　Lipid　600mg/6mL　カートリッジ(P/N5190-1004)　を通過させて回収

b-3. QuEChERS EN15662 法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 6mL を脂質の多い試料用分散キット(P/N 5982-5156)

(PSA 150mg、C18 150mg)に入れる

↓

振とう 0.5 分

↓

遠心分離　3000rpm 5 分

↓

上清を回収

b-4. QuEChERS AOAC 2007.01 法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 6mL を脂質の多い試料用分散キット(P/N 5982-5158)

(PSA 400mg、C18 400mg)に入れる

↓

振とう 0.5 分

↓

遠心分離　3000rpm 5 分

↓

上清を回収

b-5. Captiva ND Lipids　による処理

a.で作成したアセトニトリル上清のうち 1mL を Captiva ND Lipids カートリッジ(P/N A5300635)を通過させて回収

b-6. QuEChERS EN15662 法による分散固相抽出と Captiva ND Lipids との組み合わせ

d.で分散固相を行なった上清のうち　1mL　を　Captiva ND Lipids　カートリッジを通過させて回収

b-7. QuEChERS AOAC 2007.01　法による分散固相抽出と Captiva ND Lipids との組み合わせ

e.　で分散固相を行なった上清のうち　1mL　を　Captiva ND Lipids　カートリッジを通過させて回収

b-8.他社品 A による分散固相抽出

他社品　A(分散固相用)に　a.で作成したアセトニトリル上清 6mL を入れる

↓

振とう 0.5 分

↓

遠心分離　3000rpm 5 分

↓

上清を回収

b-9.他社品 B による処理

他社品 B(カートリッジタイプ 30g/1mL)に a.で作成したアセトニトリル上清 1mL を通過させて回収

c. 誘導体化

b-1.～b-9.で作成した試料からそれぞれ 100 µL を取って窒素乾固した後に,ピリジン(脱水)を 40 µL、MSTFA+1%TMCS を 140 µL、内部標準としてミリスチン酸を添加し、37 ℃で 30 分反応させ TMS 化を行ないました。

(3) 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

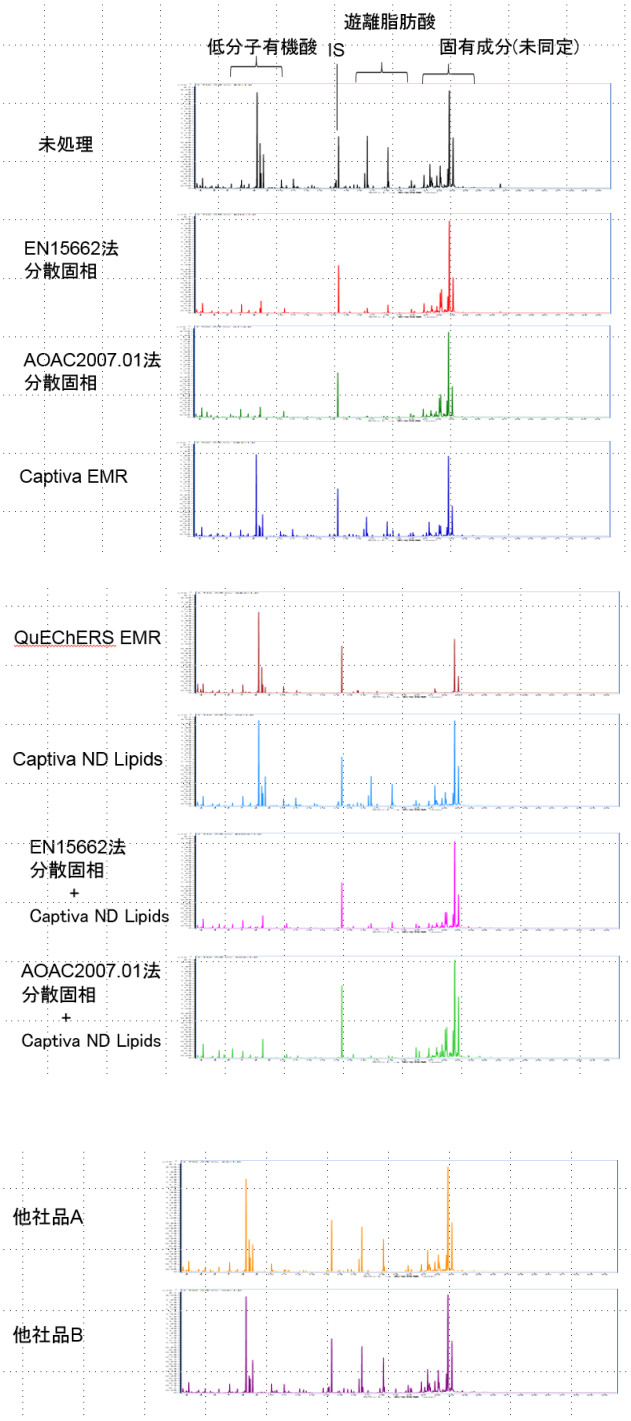
GC	Agilent 7890B
MS	Agilent 5977
カラム	VF-5ms 30m x 0.25mm i.d., 膜厚 0.25um(P/N CP8944)
オーブン	60℃(1min)→ 10℃/min→310℃
注入口温度	200℃
トランスファーライン温度	290℃
イオン源温度	250℃
注入モード	スプリット(10:1)
ガス流量	1.1mL/min
ライナ	ウルトライナートライナ シングルテーパ,低圧力損失, ウール入
測定モード	Scan (m/z 50-550)

検出したピークは NIST のライブラリにより同定を試みました。

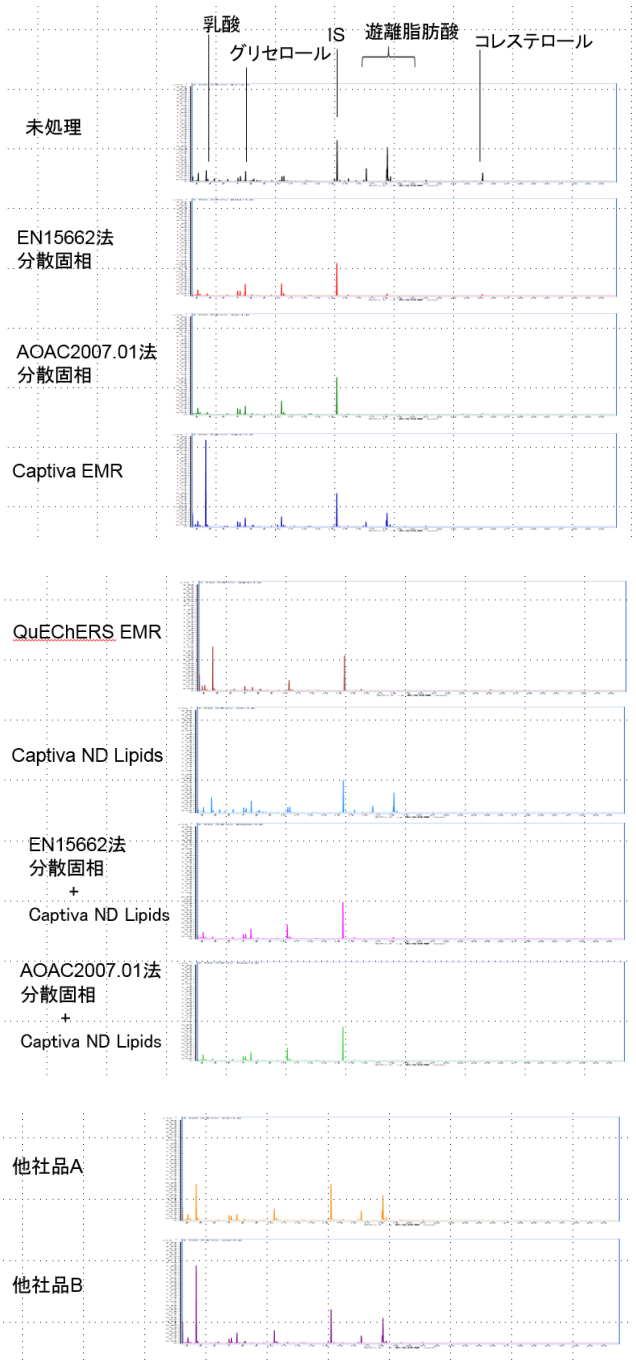
3. 結果および考察

実試料でのマトリックス除去効果の比較を行なったクロマトグラム(TICC)を図 2 に示します。

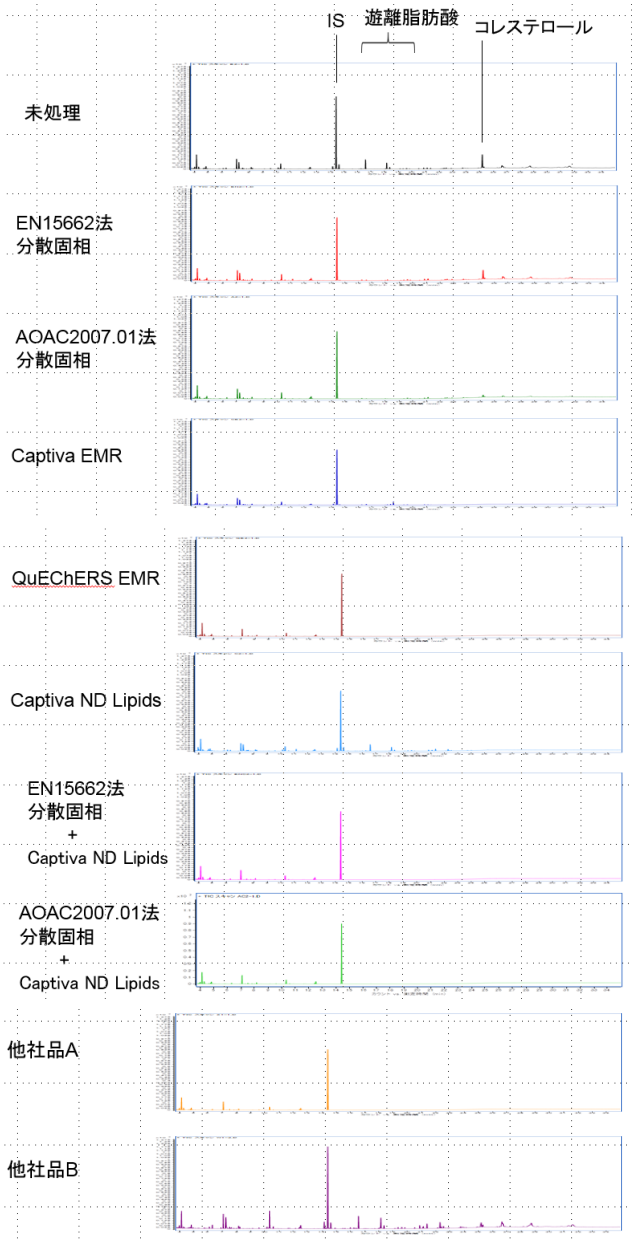
アボカド



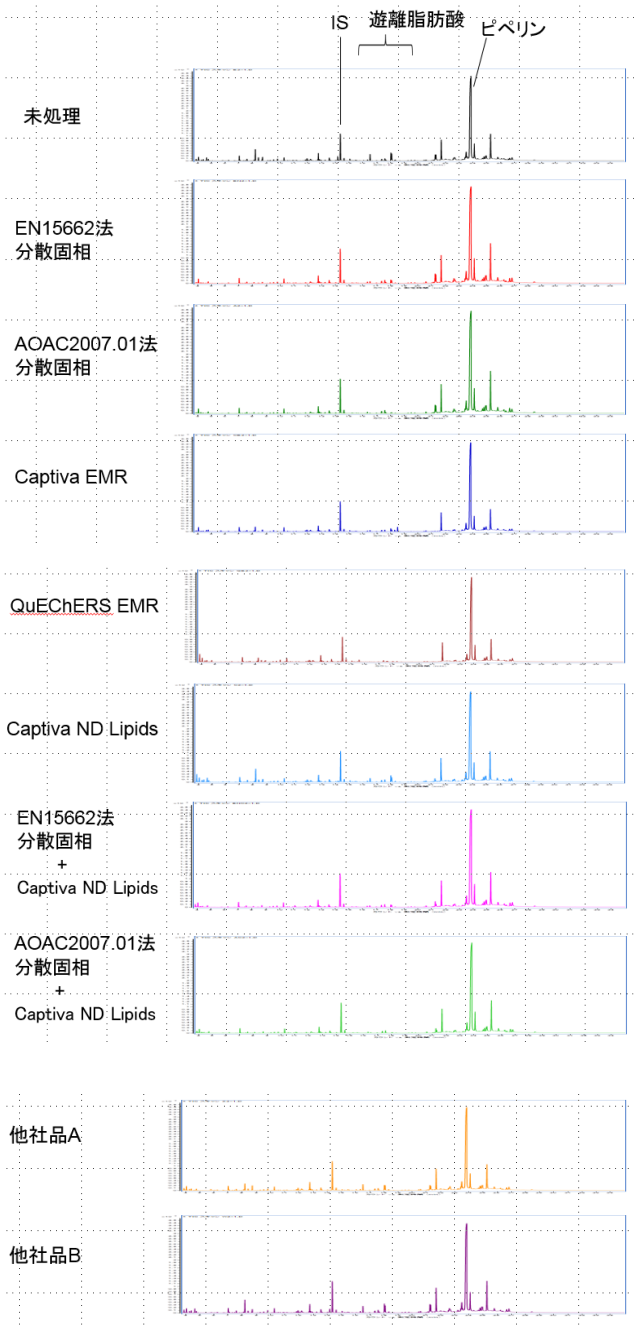
豚ひき肉


乳酸
グリセロール
IS
遊離脂肪酸
コレステロール
未処理
EN15662法
分散固相
AOAC2007.01法
分散固相
Captiva EMR
QuEChERS EMR
Captiva ND Lipids
EN15662法
分散固相
+
Captiva ND Lipids
AOAC2007.01法
分散固相
+
Captiva ND Lipids
他社品A
他社品B

牛乳


IS
遊離脂肪酸
コレステロール
未処理
EN15662法
分散固相
AOAC2007.01法
分散固相
Captiva EMR
QuEChERS EMR
Captiva ND Lipids
EN15662法
分散固相
+
Captiva ND Lipids
AOAC2007.01法
分散固相
+
Captiva ND Lipids
他社品A
他社品B

コショウ



餃子

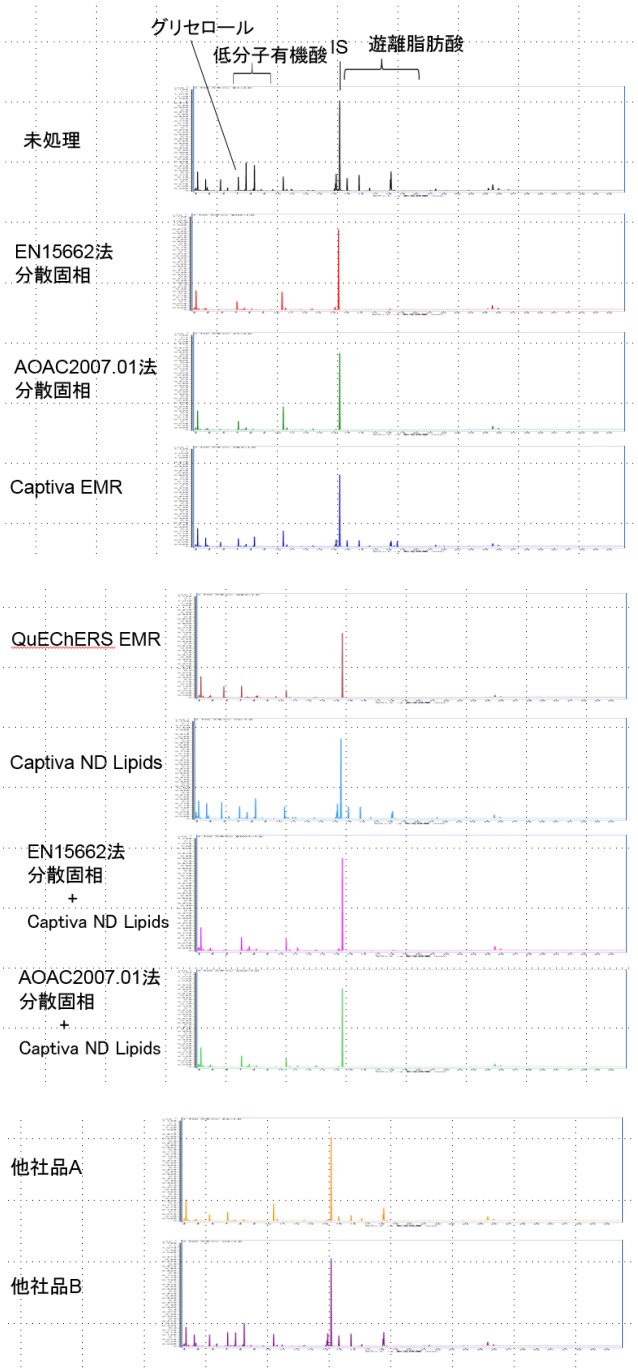


図 2 実試料によるマトリックス除去効果の比較

アボカド、餃子の抽出液には低分子の有機酸と長鎖の遊離脂肪酸の両方が含まれていて、QuEChERS 法の分散固相にはイオン交換の PSA 充填剤が含まれているので両方を除去できましたが、EMR Lipid は長鎖の物質を保持する特性があるため、長鎖の遊離脂肪酸は除去できましたが、低分子有機酸は残存しました。

同様に豚肉に含まれる乳酸も QuEChERS 法の分散固相では除去できましたが、EMR Lipid では残存しました。

豚肉と牛乳の抽出物に含まれるコレステロールは QuEChERS 法の分散固相に含まれる C18 充填剤、EMR Lipid、Captiva ND Lipids いずれでも除去することができましたが、牛乳抽出物中のコレステロールは量が多く、QuECHERS EN15662 法の分散固相では C18 充填剤の量が少ないため、完全には除去できませんでした。

コショウのピペリンは今回のいずれの方法でも除去することができず、コショウの前処理の困難さを示唆しています。

アボカド抽出物に含まれる保持時間 23 分付近のピークは同定ができませんでしたが、アボカド固有の成分と思われ、この成分も今回のいずれの方法でも除去できませんでした。

低分子有機酸、長鎖脂肪酸、コレステロールなど複数の食品に共通するマトリックス成分は今回行なった方法のいずれかで除去可能でしたが、それぞれの食品に固有の成分についてはその除去方法についてさらに検討が必要と思われます。

残存夾雑物について LC/MS で検討した結果も別途報告の予定です。

本研究は日本食品衛生学会第 113 回 学術講演会(2017.11.9～10)において発表しました。

【GC-MS-201801YS-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