

ベリー中のマルチクラス、 多成分残留農薬の測定

GC/MS/MS による Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップの利用

著者

Limian Zhao and Ta-Chen Wei
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリーに含まれる残留農薬を分析するための多成分残留分析メソッドの開発とバリデーションについて説明します。このメソッドでは、Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットによる抽出、続いて Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigmented Fresh (EMR-GPF) カートリッジ パススルークリーンアップ、さらに GC/MS/MS 分析を行います。Captiva EMR-GPF カートリッジには、アジレントの先進的な合成炭素充填剤である Carbon S が使用されています。新しく設計された Captiva EMR-GPF カートリッジは、ベリー、ピーマン、ブドウ、柑橘類など一般的な色素を有する新鮮な野菜や果物のマトリックスに対して、使いやすいパススルークリーンアップを行えるように最適化されています。結果として、溶出ステップを追加せずに単純なパススルークリーンアップを使用して、農薬の 96 % 以上が 60 ~ 120 % の回収率、RSD < 20 % で同定できることを実証しました。LC/UV による色素除去評価により、EMR-GPF クリーンアップによって 99 % を超える色素干渉が除去されることを確認しました。GCB を使用した QuEChERS 分散 SPE キットによる従来のクリーンアップと比較して、Captiva EMR-GPF クリーンアップでは、影響を受けやすい農薬の回収率が大幅に向上し、同等の色素除去効率を得られました。

はじめに

新鮮な果物や野菜には、緑の野菜のクロロフィルやルテイン、赤や青、紫や黒の果実のアントシアニンやアントシアニン、オレンジや黄色の果物と野菜のカロテノイドとキサントフィルなど、天然色素が非常に豊富に含まれています。これらの色素は、有機溶媒を使用して簡単に抽出できます。色素共溶出物をさらに除去せずに、高度に色素沈着したサンプル抽出物を LC/MS/MS や GC/MS/MS などの検出機器に直接注入すると、LC/MS/MS ではマトリックスによるイオン抑制、GC/MS/MS ではマトリックス干渉、検出流路と MS ソースでのマトリックス沈着の蓄積などの複数のマトリックス効果の影響を受ける可能性があります。したがって機器分析の前に、クリーンアップを強化して色素共溶出物を除去することが重要です。

グラファイトカーボンブラック (GCB) は、効率的な色素除去のためにサンプル前処理に広く使用されています。^{1,2} 特に食品分析で一般的に使用される QuEChERS 前処理メソッドでは、GCB が分散固相抽出 (dSPE) キットで使用されており、色素除去用に推奨されてきました。GCB は効率的に色素を除去できますが、分析対象物、特にヘキサクロロベンゼン、チアベンダゾールなどの平面構造を持つ化合物が失われる原因にもなります。そのため、多くの QuEChERS dSPE キットの配合は、許容可能な目標回収率を達成するために、GCB 充填剤の量が制限されるように慎重に調整されています。ただし、影響を受けやすい成分の回収率を向上させると、マトリックス色素の除去効率が大幅に低下します。

アジレントの Carbon S 充填剤は、炭素含有量と細孔構造が最適化された先進的なハイブリッド炭素材料です。GCB 充填剤と比較して、Carbon S 充填剤は、植物由来のサンプルマトリックスから同等以上の色素除去を実現し、影響を受けやすい分析対象物の回収率を大幅に向上させます。すなわち Carbon S 充填剤は、従来の GCB 充填剤よりも、分析対象物の回収率とマトリックス色素除去効率のバランスが優れています。Carbon S 充填剤は、GCB の代替としてさまざまな dSPE キットで使用され、同等または改善された性能を示しています。また、Captiva EMR 製品の拡張にも使用されており、効率的かつ選択性の高いマトリックス除去のために使いやすいパススルークリーンアップが採用され、影響を受けやすい農薬の回収率が大幅に改善されています。

本検討では、ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリーの 3 つの代表的なベリーマトリックス中の 108 種類の一般的な GC/MS 分析の対象となる農薬に、Captiva EMR-GPF カートリッジ パススルークリーンアップを使用したサンプル前処理法を評価しました。

実験方法

材料および試薬

農薬標準および内部標準 (IS) は、アジレント・テクノロジー (部品番号 5190-0551) または AccuStandard (米国、コネチカット州ニューヘイブン) から標準混合原液として入手するか、Sigma-Aldrich (ミズーリ州セントルイス) から個別の標準原液または粉末として入手しました。HPLC グレードのアセトニトリル (ACN) は Honeywell (米国、ミシガン州マスキーゴン) から購入しました。試薬グレードの酢酸アンモニウムおよびフッ化物アンモニウムも Sigma-Aldrich から入手しました。

溶液および標準試料

混合標準スパイク溶液 (108 種類の農薬) と混合内部標準 (3 種類の IS 化合物) スパイク溶液を ACN で 10 µg/mL に調製し、冷凍庫に -20 °C で保管しました。標準スパイク溶液は、室温で十分に温め、使用前に超音波処理し、使用後はもとに戻しました。

1 % 酢酸抽出溶媒を含む ACN は、10 mL の氷酢酸を 990 mL の ACN に加えて調製し、室温で保管しました。

実験器具と材料

実験には Agilent 8890 GC システムと Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS を組み合わせて使用しました。エレクトロニックニューマティクスコントロール (EPC)、空気冷却式マルチモード注入口 (MMI)、補助電子圧力制御 (AUX EPC) モジュールで制御される、パージ付き Ultimate ユニオンに基づくバックフラッシュシステム搭載の GC システムを使用しました。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。

サンプル前処理には、次の機器も使用しました。Centra CL3R 遠心分離機 (Thermo IEC、米国、マサチューセッツ州)、Geno/Grinder (SPEX、米国、ニュージャージー州)、Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph、ドイツ、シュワバハ)、ピペットとリピーター (Eppendorf、米国、ニューヨーク州)、Agilent 陽圧 マニホールド 48 プロセッサ (PPM-48) (部品番号 5191-4101)、Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット (部品番号 5982-5650)、Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジ、3 mL (部品番号 5610-2090)、Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid ポリッシュパウチ、3.5 g 無水 MgSO₄ (部品番号 5982-0102)、セラミックホモジナイザ、50 mL チューブ 100 個 (部品番号 5982-9313)。

分析条件

GC/MS/MS 機器の条件は、同等の機器を使用して以前に公開されたメソッドに基づいて決定しました。表 1 に GC/MS/MS 操作の条件を、表 2 に対象の MRM パラメータを示します。

表 1. Agilent 8890 GC および Agilent 7000D GC/MS/MS の条件

パラメータ	設定値
カラム	Agilent HP-5ms UI、15 m × 0.25 mm、膜厚0.25 μm (2 本) (部品番号 19091S-431UI)
キャリアガス	ヘリウム
カラム 1 流量	1.0 mL/分
カラム 2 流量	1.4 mL/分
注入量	1 μL、コールドスプリットレス
注入ロライナ	内径 4 mm ウルトラライナートライナシングルテーパ、ウール入り (部品番号 5190-2293)
MMI 温度プログラム	75 °Cで 0.02 分間、750 °C /分で 350 °Cまで昇温し、保持
オープン温度プログラム	60 °Cで 1 分間、40 °C /分で 170 °Cまで昇温した後、10 °C /分で 310 °Cまで昇温、3 分間保持
分析時間	20.75 分
バックフラッシュ条件	3 分間ポストラ オープン温度 310 °C Aux EPC 圧力 50 psi、注入口圧力 2 psi
トランスファライン温度	280 °C
イオン源温度	EI イオン源、300 °C
四重極温度	150 °C
データモニタリング	ダイナミック MRM モード (dMRM)
ゲイン係数	10
溶媒デレイ	3 分

表 2. ターゲット農薬の dMRM 条件

農薬	RT (分)	第 1 MRM トランジション (m/z)	CE (V)	第 2 MRM トランジション (m/z)	CE (V)	デルタ RT (分)	MS1 および MS2 の分解能
ジクロロボス	5.047	109 → 79	5	184 → 93	10	1.5	ワイド
ジクロベニル	5.686	171 → 100	25	171 → 136.1	15	1.5	ワイド
メンピンホス	6.049	127 → 109	10	127 → 95	15	1.5	ワイド
プロファミ	6.309	136.9 → 93	10	119 → 91	10	1.5	ワイド
メタクリホス	6.542	207.9 → 180.1	5	124.9 → 47.1	10	1.5	ワイド
2-フェニルフェノール	6.853	169.1 → 115.1	25	170.1 → 141.1	25	1.5	ワイド
モリネート	7.017	126.2 → 55.1	10	126.2 → 83.1	5	1.5	ワイド
ジフェニルアミン	7.634	169 → 168.2	15	168 → 167.2	15	1.5	ワイド
エタルフルラリン	7.638	275.9 → 202.1	15	315.9 → 275.9	10	1.5	ワイド
スルホテップ	7.896	201.8 → 145.9	10	237.8 → 145.9	10	1.5	ワイド
β-BHC	8.302	216.9 → 181	5	218.9 → 183	5	1.5	ワイド
ヘキサクロロベンゼン	8.387	283.8 → 213.9	30	283.8 → 248.8	15	1.5	ワイド
デメトン-S	8.394	88 → 60	5	126 → 65	10	1.5	ワイド
シマジン	8.508	201.1 → 173.1	5	173 → 172.1	5	1.5	ワイド
アトラジン-D ₅ (IS)	8.539	219.9 → 58.1	10	219.9 → 200.2	5	1.5	ワイド
アトラジン	8.574	214.9 → 58.1	10	214.9 → 200.2	5	1.5	ワイド
プロベタンホス	8.732	138 → 110	10	138 → 64	15	1.5	ワイド
トリエタジン	8.783	229 → 200.2	5	214.2 → 186.2	10	1.5	ワイド
テルブチラジン	8.810	228.9 → 173.1	5	172.9 → 172	5	1.5	ワイド
テルブホス	8.837	230.9 → 129	20	230.9 → 175	10	1.5	ワイド
リンデン	8.852	216.9 → 181	5	181 → 145	15	1.5	ワイド
ダイアジノン	8.869	137.1 → 84	10	137.1 → 54	20	1.5	ワイド
ピリメタニル	9.024	198 → 118.1	35	198 → 183.1	15	1.5	ワイド
クロロタロニル	9.088	263.8 → 168	25	263.8 → 229	20	1.5	ワイド

農薬	RT (分)	第1MRM トランジション (m/z)	CE (V)	第2MRM トランジション (m/z)	CE (V)	デルタRT (分)	MS1 および MS2 の 分解能
ピリミカルブ	9.307	238 -> 166.2	10	166 -> 55.1	20	1.5	ワイド
ホスファミドン	9.577	127 -> 95	10	127 -> 109	10	1.5	ワイド
メトリブジン	9.764	198 -> 82	15	198 -> 55	30	1.5	ワイド
クロルピリホスメチル	9.774	124.9 -> 47	15	142.9 -> 78.9	5	1.5	ワイド
フェントロチオン	9.916	125.1 -> 47	15	125.1 -> 79	5	1.5	ワイド
トルクロホスメチル	9.917	265 -> 250	15	265 -> 93	25	1.5	ワイド
ヘプタクロル	10.128	271.7 -> 236.9	15	273.7 -> 238.9	15	1.5	ワイド
ピリミホスメチル	10.215	290 -> 125	20	232.9 -> 151	5	1.5	ワイド
プロバルギット	10.220	135 -> 107.1	10	149.9 -> 135.1	5	1.5	ワイド
マラチオン	10.422	172.9 -> 99	15	126.9 -> 99	5	1.5	ワイド
ジクロフルアニド	10.472	223.9 -> 123.1	20	123 -> 77	20	1.5	ワイド
ジエトフェンカルブ	10.545	151 -> 123	10	207 -> 151	15	1.5	ワイド
メトラクロール	10.576	238 -> 162.2	10	162.2 -> 133.2	15	1.5	ワイド
テトラコナゾール	10.731	336 -> 217.9	20	170.9 -> 136	10	1.5	ワイド
アルドリシ	10.786	262.9 -> 192.9	35	254.9 -> 220	20	1.5	ワイド
トリアジメホン	10.788	208 -> 181.1	5	208 -> 111	20	1.5	ワイド
ベンジメタリン	11.189	251.8 -> 162.2	10	251.8 -> 161.1	15	1.5	ワイド
メタザクロル	11.261	133.1 -> 132.1	10	132.1 -> 117.1	15	1.5	ワイド
クロルフェンピホス	11.358	266.9 -> 159.1	15	322.8 -> 266.8	10	1.5	ワイド
メルカーバム	11.382	158.9 -> 131	5	130.9 -> 74	5	1.5	ワイド
トリフルアニド	11.386	237.9 -> 137	15	136.9 -> 91.1	20	1.5	ワイド
キナルホス	11.505	146 -> 118	10	146 -> 91	30	1.5	ワイド
トリフルミゾール	11.545	206 -> 179	15	206 -> 186	10	1.5	ワイド
トリアジメノール	11.559	168 -> 70	10	128 -> 65	25	1.5	ワイド
プロシミドン	11.562	284.8 -> 96	10	282.8 -> 96	30	1.5	ワイド
キャプタン	11.607	149 -> 79.1	10	151 -> 79.1	15	1.5	ワイド
メチダチオン	11.786	144.9 -> 85	5	144.9 -> 58.1	15	1.5	ワイド
バクロプロトラゾール	11.941	236 -> 125.1	10	125.1 -> 89	20	1.5	ワイド
メバニピリム	12.044	223.2 -> 222.2	10	222.2 -> 207.2	15	1.5	ワイド
エンドスルファン I	12.162	194.9 -> 159	5	194.9 -> 160	5	1.5	ワイド
フルジオキシニル	12.227	248 -> 154.1	20	248 -> 182.1	10	1.5	ワイド
ヘキサコナゾール	12.297	256 -> 82	10	231 -> 175	10	1.5	ワイド
プロフェノホス	12.375	338.8 -> 268.7	15	207.9 -> 63	30	1.5	ワイド
オキサジアゾン	12.394	174.9 -> 112	15	174.9 -> 76	35	1.5	ワイド
トリシクラゾール	12.455	189 -> 162.1	10	189 -> 161.1	15	1.5	ワイド
DDE	12.466	246.1 -> 176.2	30	315.8 -> 246	15	1.5	ワイド
ウニコナゾール-P	12.473	234.1 -> 164.9	10	234.1 -> 136.9	15	1.5	ワイド
ブピリメート	12.519	272.9 -> 193.1	5	272.9 -> 108	15	1.5	ワイド
フルシラゾール	12.528	233 -> 165.1	15	233 -> 91	20	1.5	ワイド
ディルドリン	12.650	262.9 -> 193	35	277 -> 241	5	1.5	ワイド
エンドリン	13.052	262.8 -> 193	35	244.8 -> 173	30	1.5	ワイド
イプロジオン	13.130	187 -> 124	25	313.8 -> 55.9	20	1.5	ワイド
ジニコナゾール	13.167	269.9 -> 232	10	267 -> 232.1	10	1.5	ワイド
オキサジキシル	13.192	163 -> 132.1	5	163 -> 117.1	25	1.5	ワイド
エチオン	13.204	230.9 -> 175	10	152.9 -> 96.9	10	1.5	ワイド
エンドスルファン II	13.231	194.9 -> 159	5	194.9 -> 160	5	1.5	ワイド
DDD	13.244	234.9 -> 165.1	20	236.9 -> 165.1	20	1.5	ワイド

農薬	RT (分)	第1MRM トランジション (m/z)	CE (V)	第2MRM トランジション (m/z)	CE (V)	デルタRT (分)	MS1 および MS2 の 分解能
トリアゾホス	13.471	161.2 -> 134.2	5	161.2 -> 106.1	10	1.5	ワイド
プロピコナゾール I	13.769	172.9 -> 109	15	172.9 -> 145	15	1.5	ワイド
キノキシフェン	13.827	271.9 -> 237.1	10	NA	NA	1.5	ワイド
プロピコナゾール II	13.885	172.9 -> 109	30	172.9 -> 145	15	1.5	ワイド
DDT-D ₈ (IS)	13.903	243 -> 173.1	20	245 -> 173.1	20	1.5	ワイド
DDT	13.951	235 -> 165.2	20	237 -> 165.2	20	1.5	ワイド
フェンヘキサミド	13.967	177.1 -> 78	25	177.1 -> 113	15	1.5	ワイド
テブコナゾール	14.195	250 -> 125	20	125 -> 89	15	1.5	ワイド
TPP (IS)	14.242	325.9 -> 169	30	325.9 -> 233	27	1.5	ワイド
ゾキサミド	14.422	189 -> 161.1	15	187 -> 159.1	15	1.5	ワイド
エボキシコナゾール	14.435	192 -> 138.1	10	192 -> 111	25	1.5	ワイド
スピロメシフェン	14.475	272 -> 254.2	5	272 -> 209.2	10	1.5	ワイド
ピフェントリン	14.738	181.2 -> 165.2	25	181.2 -> 166.2	10	1.5	ワイド
ブロムコナゾール I	14.759	173 -> 145	15	173 -> 109	30	1.5	ワイド
ホスメット	14.801	160 -> 77.1	20	160 -> 133.1	20	1.5	ワイド
EPN	14.828	169 -> 77	25	169 -> 141.1	5	1.5	ワイド
ピコリナフェン	14.829	376 -> 238.1	20	376 -> 239.1	10	1.5	ワイド
フェノキシカルブ	14.844	255.2 -> 186.2	10	186.2 -> 158.2	5	1.5	ワイド
メトキシクロル	14.927	227.1 -> 169.1	25	227.1 -> 121.1	10	1.5	ワイド
テブフェンピラド	15.041	275.9 -> 171.1	10	332.9 -> 171	15	1.5	ワイド
ブロムコナゾール II	15.167	173 -> 109	30	173 -> 145	15	1.5	ワイド
メトコナゾール	15.189	125 -> 89	20	125 -> 99	20	1.5	ワイド
アザメチホス	15.451	183 -> 112	15	215 -> 171.1	10	1.5	ワイド
ホサロン	15.451	182 -> 111	15	182 -> 102.1	15	1.5	ワイド
イブコナゾール	15.893	125 -> 89	20	125 -> 99	20	1.5	ワイド
マイレックス	16.016	271.8 -> 236.8	15	273.8 -> 238.8	15	1.5	ワイド
フェナリモル	16.017	219 -> 107.1	10	251 -> 139.1	10	1.5	ワイド
ピテルタノール	16.503	170.1 -> 115	40	170.1 -> 141.1	20	1.5	ワイド
ベルメトリン	16.670	183.1 -> 168.1	10	183.1 -> 153.1	15	1.5	ワイド
クマホス	16.693	361.9 -> 109	15	210 -> 182	10	1.5	ワイド
フルキンコナゾール	16.707	340 -> 107.8	40	340 -> 298	15	1.5	ワイド
フェンブコナゾール	17.097	197.9 -> 129	5	128.9 -> 102.1	15	1.5	ワイド
エトフェンプロックス	17.742	163 -> 135	10	163 -> 107.1	20	1.5	ワイド
フルミオキサジン	18.308	287 -> 258.7	15	354 -> 325.9	5	1.5	ワイド
ピラクロストロピン	18.440	164 -> 132.1	35	164 -> 77.1	10	1.5	ワイド
ジフェノコナゾール	18.870	322.8 -> 264.8	15	264.9 -> 202	20	1.5	ワイド
デルタメトリン	19.208	252.9 -> 93	25	181 -> 152.1	25	1.5	ワイド

図 1 は、上記の GC/MS/MS 条件を使用した 100 ng/g レベルで添加したブラックベリーサンプル中のターゲットとする農薬の MRM クロマトグラムを示しています。

サンプル前処理法

地元の食品店から新鮮な有機ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリーを購入しました。サンプルを -20 °C の冷凍庫で一晩凍結し、グラインダーでホモジナイズしました。次に、粉碎したマトリックスサンプルを 50 mL 遠心管で 10 g 秤量し、抽出するまで -20 °C の冷凍庫に保管しました。秤量したベリーサンプル (10 g) を事前に解凍し、QuEChERS EN メソッドに従って抽出しました。次に、粗抽出物を 3 mL Captiva EMR-GPF カートリッジにロードして、パススルークリーンアップを行いました。クリーンアップしたサンプル溶出液を無水 MgSO₄ で脱水し、サンプル抽出物に残っている水を完全に除去しました。これで、脱水したサンプルの GC/MS/MS 分析の準備ができました。図 2 にサンプル前処理の詳細手順を示します。約 30 サンプルのバッチの場合、手順全体で通常約 40 ~ 45 分かかります。

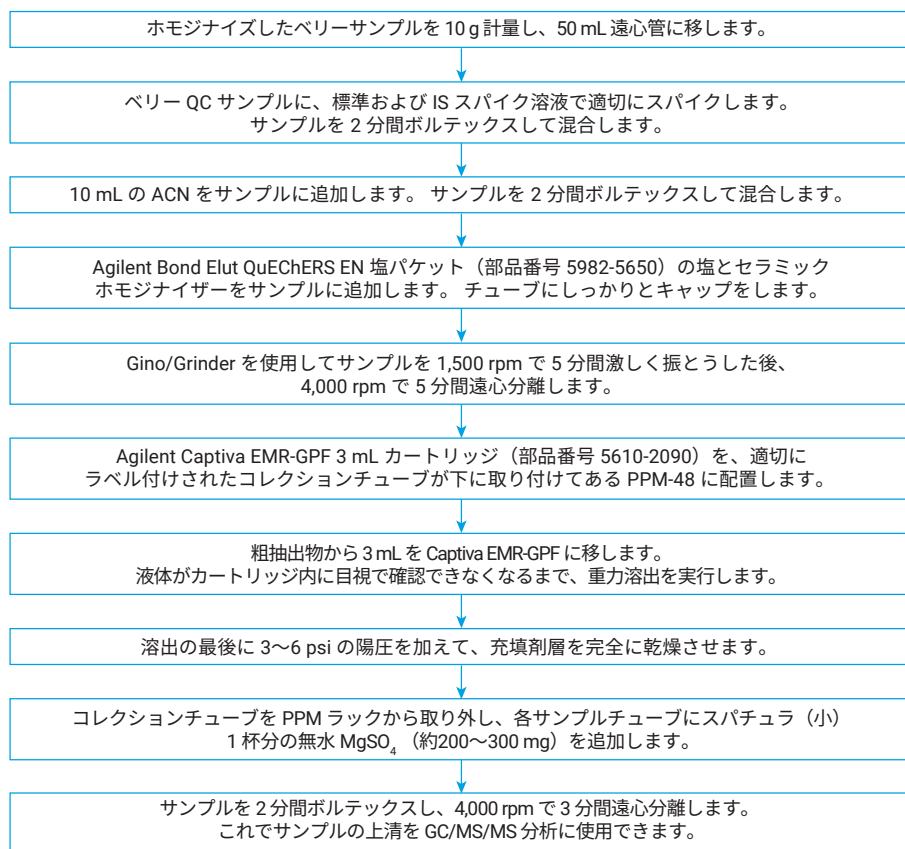


図 2. Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出とその後の Agilent Captiva EMR-GPF クリーンアップによるベリーサンプルのサンプル前処理手順

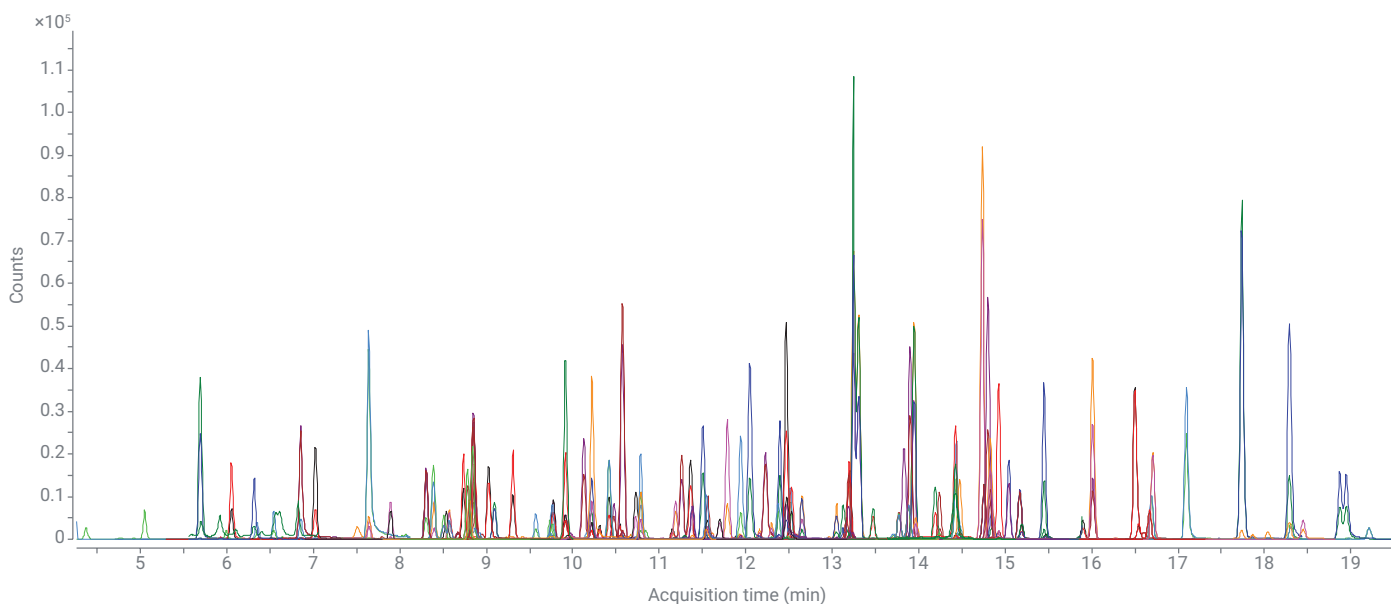


図 1. 108 種類のターゲット農薬を 100 ng/g で添加した抽出ブラックベリーサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラム。サンプルは、Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットを使用して前処理した後、Agilent Captiva EMR-GPF クリーンアップを行いました。

Captiva EMR-GPF は、使いやすいパススルークリーンアップを行うことができます。溶出は重力溶出で行うことができます。LC/MS/MS によるサンプル分析では、サンプル溶出液を LC/TQ 機器に直接注入するか、注入前に水でさらに希釈することができます。GC/MS/MS でのサンプル分析では、さらにサンプル溶出液を無水 MgSO₄ 粉末で脱水させることが必要になります。MgSO₄ の添加は、Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid ポリッシュパウチから無水 MgSO₄ 粉末 (約 200 ~ 300 mg) を小さなスパチュラで加えることで簡単に行えます。添加する MgSO₄ の量は正確である必要はありません。残留水が完全に除去されたことは、2 つの簡単な指標によって確認できます。1 つ目は、乳白色の均一なサンプル混合物がボルテックス中に観察できることです。2 つ目は、塩が沈殿する際、凝固した塊ではなく、粉末として底に沈殿していることです。図 3 は、Captiva EMR-GPF クリーンアップ後の GC/MS/MS 分析前のサンプル乾燥の手順です。

メソッドの性能評価

ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリーの 3 つのベリーマトリックスにおけるマトリックス色素の除去、ターゲットの回収率と再現性、マトリックス適合検量線の直線性、および定量

限界 (LOQ) の観点から、新しいサンプル前処理メソッドの性能を評価しました。回収率と再現性を評価するために、2 つのレベルの品質管理 (QC) サンプルをベリーサンプルのホモジネートに 10 および 100 ng/g でプレスパイクして作成しました。次に、スパイクしたサンプルとマトリックスブランクサンプルを手順に従って調製しました。次に、最終的なマトリックスブランク抽出物に 10 および 100 ng/mL でポストスパイクしました。各レベルでプレスパイク QC を 6 回繰り返して分析しました。次に、プレスパイク QC サンプルとポストスパイク QC サンプルの対応するターゲットのピーク面積比を使用して、サンプル前処理手順によるターゲットの回収率を計算しました。さらに GCB を用いた Bond Elut QuEChERS Universal dSPE (U-dSPE with GCB) を使用した従来の dSPE クリーンアップについて、ブラックベリーのターゲット回収率と再現性を比較しました。マトリックスに合わせた検量線の直線性と LOQ を、3 種類のマトリックスブランク抽出物に 1、2、5、10、50、100、250、400、500 ng/mL のレベルでポストスパイクすることによって評価しました。成分の同定、確認、定量は、リテンションタイムと MRM トランジションから決定しました。

結果と考察

Carbon S 充填剤と Captiva EMR パススルークリーンアップ

アジレントの Carbon S 充填剤は、炭素含有量と細孔構造が最適化された先進的なハイブリッド炭素材料です。この改良された充填剤は、GCB 充填剤と比較して、植物由来のサンプルマトリックスから同等以上の色素を除去し、影響を受けやすい対象化合物の回収率を大幅に向上させます。すなわち Carbon S 充填剤は、分析対象物の回収率とマトリックスの色素除去効率の優れたバランスを実現しています。

Captiva EMR パススルークリーンアップ手法は、Captiva EMR-Lipid 製品で最初に導入されました。EMR-Lipid パススルークリーンアップ手法は、脂質を除去する際に高い選択性と効率性を実現し、使いやすく迅速で信頼性の高いサンプルマトリックスクリーンアップ手法です。このサンプルクリーンアップ手法は、マトリックス洗浄が不要なマトリックス干渉の選択的保持に基づいているため、ターゲット回収率への影響を最小限に抑えられ、マルチクラス、多成分残留物分析に特に適しています。

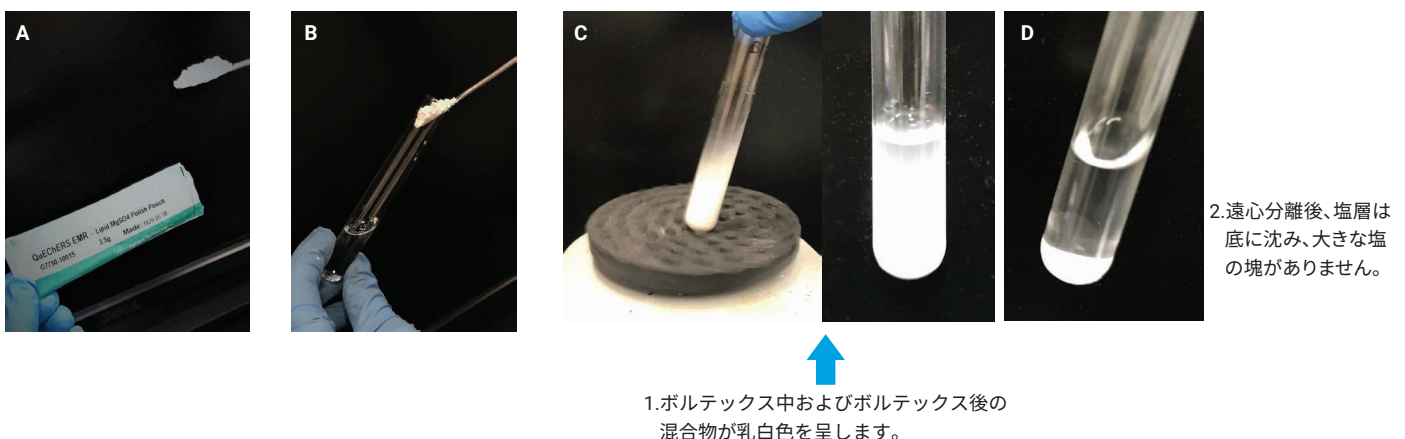


図 3. Agilent Captiva EMR-GPF クリーンアップ後の GC/MS/MS 分析のためのサンプル乾燥。(A) Agilent Bond Elut QuEChERS EMR-Lipid 脱水キットから MgSO₄ 無水粉末をスパチュラ 1 杯分取り出します。(B) MgSO₄ 粉末をクリーンアップしたサンプル溶出液を含むコレクションチューブに添加します。(C) サンプルを 2 ~ 3 分間ボルテックスします。(D) サンプルを 3 分間遠心分離します。(1) と (2) は、残留水分を完全に除去するための重要な指標です。

従来の dSPE クリーンアップと比較して、パススルークリーンアップでは、dSPE チューブのキャップの取り外しとキャップの取り付け、ボルテックス、遠心分離などのワークフロー手順が簡素化されます。Captiva EMR-Lipid 製品を使用したパススルークリーンアップは、GC/MS/MS による脂肪の多いマトリックス中の食品分析に広く使用されています。^{3,5}

新しい Carbon S 充填剤により、アジレントは Captiva EMR ファミリーをさらに拡張することで、新鮮なマトリックスや乾燥マトリックスなどの植物由来のサンプルマトリックスの選択的かつ効率的なマトリックス パススルークリーンアップを提供できるようになりました。5 つの新しい Captiva EMR カートリッジが、さまざまな複雑な植物サンプルマトリックス用に最適化された処方が開発されました。表 3 は、すべての Captiva EMR カートリッジの詳細な説明と推奨事項を示しています。

充填剤の処方、多成分ターゲット残留物の回収率とマトリックスのクリーンアップ効率に基づいて、慎重かつ徹底的に最適化されました。これらの EMR カートリッジは、有機酸、色素、脂質/脂肪、その他の疎水性干渉など、

さまざまなマトリックスに応じて、選択的かつ効率的なマトリックスクリーンアップを実現します。dSPE キットで一般的に使用される無水 MgSO₄ 粉末は、どの EMR カートリッジにも含まれていません。その理由は、調査の結果、クリーンアップ手順中に MgSO₄ によって同時に水を除去すると緩衝効果が損なわれ、一部の不安定な農薬が大幅に失われる可能性があることが分かったからです。したがって GC および GC/MS 分析の場合、残留水分を完全に除去するために、EMR クリーンアップ後にさらに脱水させる必要があります。

この検討で用いた新鮮なベリーマトリックス（ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリー）では、QuEChERS 抽出後のパススルークリーンアップに Captiva EMR-GPF 3 mL カートリッジを使用しました。3 つのベリーマトリックスすべてでマトリックス色素除去を効率的に行うことができました。図 4 は、パススルークリーンアップの前後の外観を視覚的に示したものです。処理前と処理後のサンプルも、450 nm で LC/UV 検出して分析したところ、色素は > 99 % 除去されていました。

表 3. Agilent Captiva EMR カートリッジと、さまざまな植物由来マトリックスに対する推奨事項

製品名	充填剤	サンプルロード量	サンプルマトリックスに基づく推奨事項	該当するサンプルマトリックスの例
Captiva EMR-Lipid	Captiva EMR-Lipid	3 mL カートリッジの場合は 2.5 ~ 3 mL、6 mL カートリッジの場合は 5 ~ 6 mL	脂肪の多いマトリックス	食用油
Captiva EMR-HCF1	Carbon S/NH ₂	3 mL	高クロロフィルの新鮮な葉野菜	ほうれん草、パセリ、アルファルファ
Captiva EMR-HCF2	Carbon S/PSA	3 mL	高クロロフィルの新鮮な葉野菜	ほうれん草、パセリ、アルファルファ
Captiva EMR-GPF	Carbon S/PSA/EC-C18	3 mL	一般的な色素を有する新鮮な植物由来のマトリックス	ベリー、ピーマン、ブロッコリー、ブドウ
Captiva EMR-GPD	Captiva EMR-Lipid/PSA/EC-C18/Carbon S	2.5 ~ 3 mL	一般的な色素を有する乾燥した植物由来のマトリックス	香辛料、紅茶、コーヒー
Captiva EMR-LPD	Captiva EMR-Lipid/PSA/EC-C18/Carbon S	2.5 ~ 3 mL	色素が低い/ない乾燥植物由来マトリックス	ナッツ類、淡色香辛料、たばこ

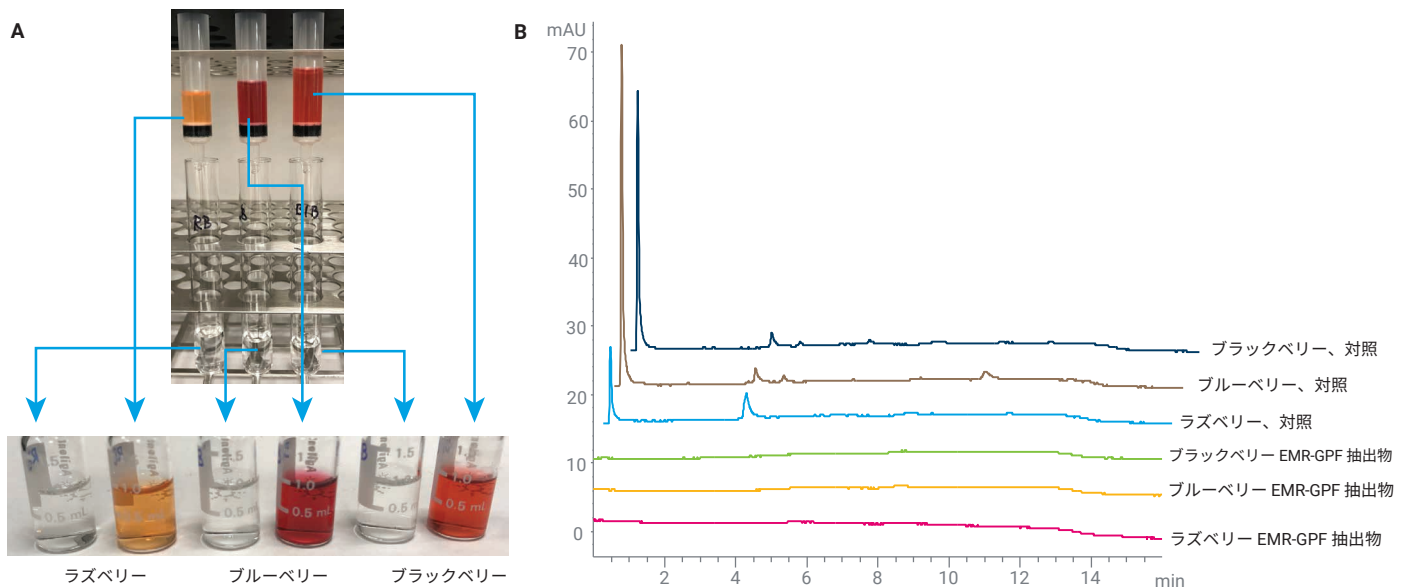


図 4. ベリーマトリックスサンプルの色素除去効率のデモンストレーション。(A) Captiva EMR-GPF クリーンアップ前後の抽出サンプルの色の比較。(B) Captiva EMR-GPF クリーンアップ前後の抽出ベリーサンプルの LC-UV ($\lambda = 450 \text{ nm}$) スタッククロマトグラム

サンプル前処理手順

新鮮な果物や野菜のマトリックスでは、標準的なサンプル抽出手順として QuEChERS 抽出が広く採用されています。この検討では、Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットを使用して、標準の QuEChERS 抽出メソッドを適用しました。抽出後、パスルークリーンアップ用に 3 mL の粗抽出物を 3 mL Captiva

EMR-GPF カートリッジにロードしました。溶出は重力で行い、3 mL の粗ベリー抽出物をすべて溶出させるのに 5 ~ 10 分かかりました。その後、GC/MS/MS による分析で、サンプル溶出液を無水 MgSO_4 粉末で脱水させました。無水 MgSO_4 の添加量は厳密である必要はありません。脱水手順と完全な水分除去の様子を図 3 に示します。

サンプル前処理メソッドの性能評価

Captiva EMR-GPF クリーンアップを使用したサンプル前処理メソッドは、次の実験で詳しく評価しました。

- A. Captiva EMR-GPF クリーンアップと U-dSPE と GCB クリーンアップとの分析成分の回収率の比較
- B. メソッドの定量精度と正確度の検証
- C. 3 つのベリーマトリックス (ブラックベリー、ブルーベリー、ラズベリー) における、10 ng/g スパイクレベルにおける分析成分の回収率と再現性 ($n = 6$)、およびマトリックス中の 500 (または 400) ng/g までの LOQ のダイナミックレンジでの検量線の直線性に関するメソッドの相互検証

A. Captiva EMR-GPF クリーンアップと U-dSPE と GCB クリーンアップの分析成分の回収率の比較

Captiva EMR-GPF クリーンアップを使用して新しく開発されたメソッドを、GCB クリーンアップを使用した従来の U-dSPE と、分析成分の回収率と再現性について比較しました。回収率の範囲が 70 ~ 120 % という一般的に受け入れられている基準を適用すると、Captiva EMR-GPF クリーンアップを使用し

た場合 108 個のターゲットすべてが 0 % の失敗率で回収率の許容範囲に入りました。これと比べて、GCB クリーンアップで U-dSPE を使用した場合、5 つのターゲットが回収率の許容範囲から外れ、失敗率は 4.6 % でした。失敗した 5 つのターゲットのうち 4 つは回収率が著しく低く、ポストスパイクしたサンプルのレスポンスがはるかに低くなりました。これは、GCB クリーンアップを使用した U-dSPE によって、これら影響を受けやすい農薬がか

なりの量失われたことを示しています。これらのターゲットに対するマトリックスの影響が異なるため、GC/MS/MS 機器でのターゲットの応答も低くなるという結果になりました。図 6 は、Captiva EMR-GPF クリーンアップと GCB クリーンアップを使用した U-dSPE に関して、ブラックベリーでのプレススパイクおよびポストスパイク 10 ppb サンプルのクロマトグラフィーの比較を行ったものです。

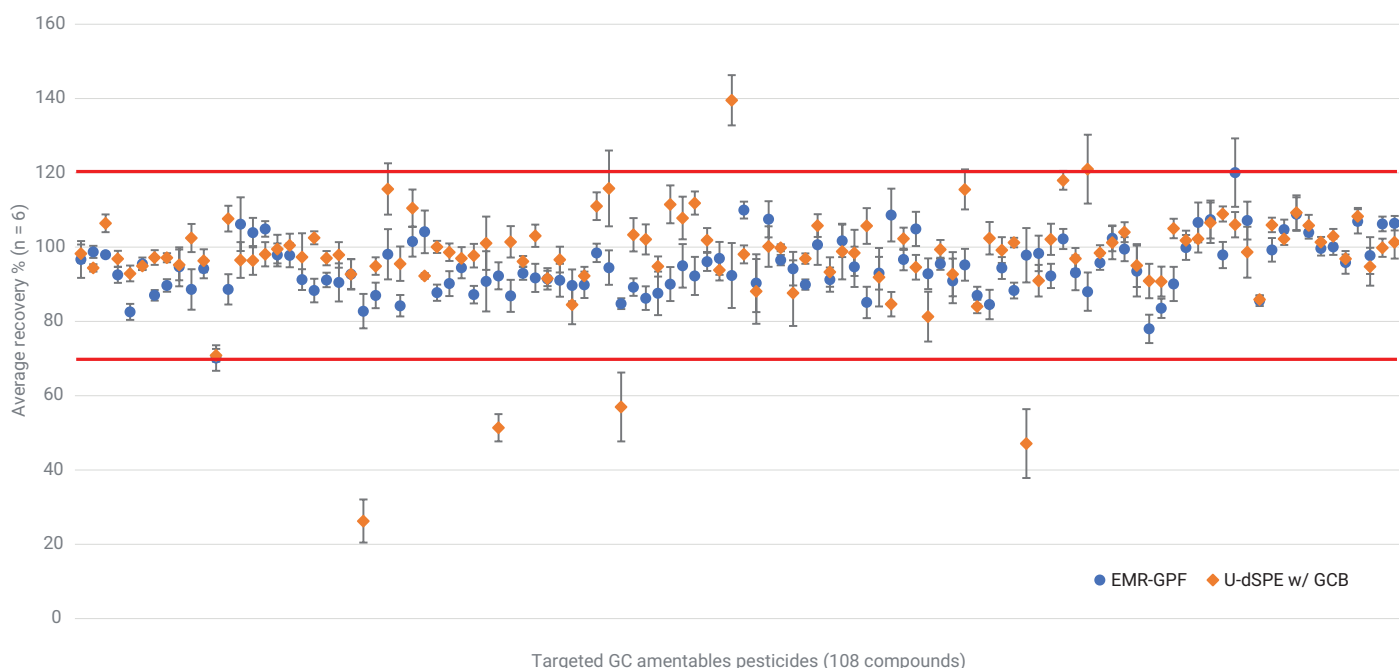


図 5. GCB クリーンアップを使用した Agilent Captiva EMR-GPF と QuEChERS U-dSPE のターゲット農薬回収率の比較。ブラックベリー中 10 ng/g のスパイクレベル。農薬は、GC/MS/MS での溶出時のリテンションタイムの順です。ターゲット農薬のラベルについては、表 2 を参照してください。

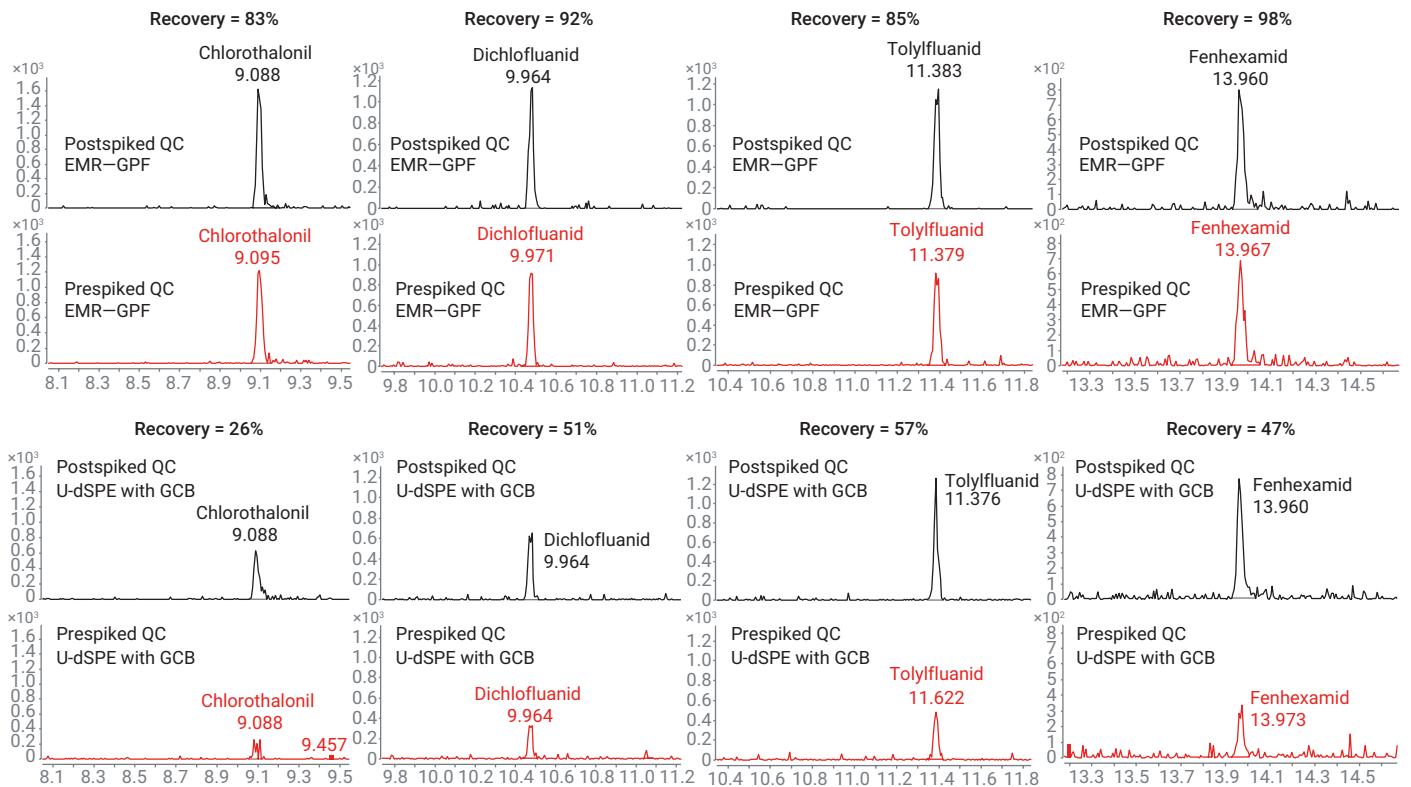


図 6. さまざまなクリーンアップメソッドを使用して調製されたサンプルの高感度ターゲットのクロマトグラフィー比較

B. メソッドの定量精度と正確度の検証

メソッドの定量真度と精度は、10 および 100 ng/g の 2 レベルのプレスパイク QC を使用してブラックベリーで検証しました。ブラックベリーで 1 ~ 500 ng/g のダイナミックレンジをカバーする9段階のマトリックス適合検量線用試料を作成しました。検量線は、直線回帰と $1/x^2$ 重みを使用して作成しました。定量には3つのIS (アトラジン-D₅、DDT-D₈、および

TPP) を 100 ng/g で使用しました。定量結果を表 4 にまとめます。108 個のターゲットのうち 84 個はブラックベリーで、許容可能な精度基準で 1 ~ 500 ng/g のダイナミックキャリブレーションレンジが得られました。23 個のターゲットは、マトリックスの感度が不足しているか、許容される精度基準を達成できなかったため、定量下限 (LLOQ) が高くなりました。馬拉チオンの LLOQ は、サンプルマトリックス

ブランクからのプラスの寄与により、大幅に上昇しました。馬拉チオンではプラスの発生が確認されたため、この場合も 10 ng/g 低 QC で計算された濃度が大幅に高くなり、許容される精度基準を満たしませんでした。

表 4. ブラックベリーの結果の要約におけるメソッドの定量的検証

農薬	検量線			真度および精度			
	LLOQ (ng/g)	HLOQ (ng/g)	R ²	低 QC (10 ng/g, n = 6)		高 QC (100 ng/g)	
				平均精度 (%)	RSD%	平均精度 (%)	RSD%
ジクロルボス	1	500	0.9968	107	3.7	103	4.2
ジクロベニル	1	500	0.9993	101	3.1	95	2.7
メンピンホス	1	500	0.9965	98	4.9	102	4.4
プロファム	1	500	0.9936	108	5.8	100	1.7
メタクリホス	1	500	0.9957	94	3.5	97	2.2
2-フェニルフェノール	1	500	0.9949	96	4.2	100	5.3
モリネート	1	500	0.9993	99	3.5	98	1.7
ジフェニルアミン	1	500	0.9985	92	4.1	95	4.7
エタルフルラリン	1	500	0.9881	94	5.6	105	3.5
スルホテップ	1	500	0.9984	94	7.2	102	3.9
β-BHC	1	500	0.9972	98	6.4	100	5.4
ヘキサクロロベンゼン	1	500	0.9985	82	7.9	74	3.9
デメトン-S ¹	2	500	0.9921	94	4.8	98	6.6
シマジン ¹	2	500	0.9951	103	12.7	99	6.4
アトラジン	1	500	0.9919	92	6.5	104	5.5
プロベタンホス	1	500	0.9990	106	5.9	100	5.9
トリエタジン	1	500	0.9989	93	3.0	99	1.1
テルブチラジン	1	500	0.9980	86	9.3	98	4.1
テルブホス	1	500	0.9949	89	4.2	100	3.1
リンデン	1	500	0.9928	99	9.1	101	2.0
ダイアジノン	1	500	0.9961	101	9.4	104	1.7
ピリメタニル	1	500	0.9932	84	6.5	96	1.6
クロロタロニル	1	500	0.9945	60	5.6	77	2.6
ピリミカルブ	1	500	0.9988	90	7.2	98	4.2
ホスファミドン ¹	2	500	0.9935	80	8.5	102	9.7
メトリブジン ¹	2	500	0.9928	105	9.8	99	3.4
クオルピリホスメチル	1	500	0.9919	91	4.5	104	7.6
フェントロチオン	1	500	0.9986	99	9.5	100	4.3
トルクロホスメチル	1	500	0.9972	98	4.6	100	2.8
ヘブタクロル	1	500	0.9970	101	7.5	100	4.0
ピリミホスメチル	1	500	0.9966	94	4.2	99	2.9
プロパルギット ¹	5	500	0.9964	96	5.0	101	4.7
マラチオン ²	50	500	0.9961	147	11.1	103	0.8
ジクロフルアニド	1	500	0.9911	61	8.4	78	7.3
ジエトフェンカルブ ¹	10	500	0.9918	91	11.4	103	8.7
メトラクロール	1	500	0.9980	95	8.2	100	3.9
テトラコナゾール	1	500	0.9950	92	2.8	103	7.8
アルドリソ	1	500	0.9966	98	2.8	96	3.6
トリアジメホン	1	500	0.9932	92	6.87	103	6.0
ベンジメタリン	1	500	0.9942	102	12.0	106	6.6
メタザクロル	1	500	0.9981	96	3.7	102	3.3
クオルフェンピンホス	1	500	0.9925	99	2.9	102	4.1
メルカーバム ¹	5	500	0.9909	103	5.5	97	5.3
トリルフルアニド ¹	2	500	0.9929	84	1.4	97	3.7

農薬	検量線			真度および精度			
	LLOQ (ng/g)	HLOQ (ng/g)	R ²	低 QC (10 ng/g, n = 6)		高 QC (100 ng/g)	
				平均精度 (%)	RSD%	平均精度 (%)	RSD%
キナルホス	1	500	0.9950	83	8.1	97	3.0
トリフルミゾール	1	500	0.9952	104	3.2	105	5.6
トリアジメノール ¹	5	500	0.9988	100	5.7	103	8.4
プロシミドン	1	500	0.9918	94	7.5	104	2.1
キャプタン ¹	5	500	0.9903	86	5.6	81	13.0
メチダチオン	1	500	0.9916	89	5.1	102	5.1
バクロブトラゾール	1	500	0.9995	102	5.0	103	5.8
メバニピリム	1	500	0.9953	86	7.7	95	5.1
エンドスルファン I ¹	5	500	0.9980	94	15.6	103	5.1
フルジオキシニル ¹	2	500	0.9980	89	8.3	102	4.8
ヘキサコナゾール ¹	2	500	0.9923	89	15.6	100	8.7
プロフェノホス	1	500	0.9916	80	6.0	103	2.6
オキサジアゾン	1	500	0.9973	96	7.8	102	4.4
トリシクラゾール ¹	5	500	0.9952	94	8.2	92	6.4
DDE	1	500	0.9987	94	4.2	95	2.5
ウニコナゾール-P	1	500	0.9934	88	4.0	100	4.9
ブピリメート	1	500	0.9956	100	5.9	101	2.8
フルシラゾール	1	500	0.9919	104	5.9	103	3.3
ディルドリン ¹	2	500	0.9907	95	6.6	102	2.0
エンドリン ¹	2	500	0.9961	108	13.5	104	2.5
イプロジオン	1	500	0.9948	99	7.0	97	3.0
ジニコナゾール	1	500	0.9988	95	5.9	105	1.6
オキサジキシル	1	500	0.9949	103	5.1	105	0.9
エチオン	1	500	0.9942	82	7.2	100	2.1
エンドスルファン II ¹	5	500	0.9937	101	10.9	106	7.2
DDD	1	500	0.9967	92	6.5	103	1.7
トリアゾホス ¹	2	500	0.9946	87	0.7	102	3.6
プロピコナゾール I ¹	2	500	0.9934	108	5.0	100	3.2
キノキシフェン	1	500	0.9972	89	7.0	90	1.9
プロピコナゾール II	1	500	0.9926	96	8.1	100	2.1
DDT	1	500	0.9967	91	3.9	100	1.0
フェンヘキサミド ¹	2	500	0.9911	76	12.5	87	7.8
テブコナゾール	1	500	0.9960	97	9.4	104	1.7
ゾキサミド	1	500	0.9914	77	5.9	105	9.1
エボキシコナゾール	1	500	0.9911	87	4.5	93	4.0
スピロメシフェン	1	500	0.9980	85	3.1	96	4.8
ピフェントリン	1	500	0.9988	91	8.8	97	4.5
プロムコナゾール I	1	500	0.9942	101	9.0	101	4.7
ホスメット	1	500	0.9939	85	9.4	102	2.6
EPN ¹	2	500	0.9983	87	3.9	89	3.6
ピコリナフェン	1	500	0.9953	77	4.9	86	4.9
フェノキシカルブ	1	250	0.9906	101	4.7	87	1.7
メトキシクロル	1	500	0.9913	87	3.8	96	4.1
テブフェンピラド	1	500	0.9973	89	4.5	97	3.5
プロムコナゾール II	1	500	0.9943	88	5.3	99	4.1

農薬	検量線			真度および精度			
	LLOQ (ng/g)	HLOQ (ng/g)	R ²	低 QC (10 ng/g, n = 6)		高 QC (100 ng/g)	
				平均精度 (%)	RSD%	平均精度 (%)	RSD%
メトコナゾール	1	500	0.9971	89	7.5	96	6.3
アザメチホス	1	500	0.9964	89	3.2	88	7.5
ホサロン	1	500	0.9935	72	3.9	83	6.0
イブコナゾール	1	500	0.9935	86	5.6	100	8.1
マイレックス	1	500	0.9985	97	6.3	108	5.6
フェナリモル	1	500	0.9973	86	6.3	100	5.9
ピテルタノール	1	500	0.9969	95	7.4	105	6.7
ベルメトリン	1	500	0.9939	91	6.5	99	5.4
クマホス	1	500	0.9954	81	9.0	97	7.5
フルキンコナゾール	1	500	0.9932	89	8.2	100	5.7
フェンブコナゾール	1	500	0.9969	94	8.8	102	4.6
エトフェンプロックス	1	500	0.9979	90	6.8	97	3.1
フルミオキサジン ¹	2	500	0.9929	96	9.6	96	4.6
ピラクロストロピン	1	500	0.9902	100	7.3	108	5.6
ジフェノコナゾール	1	500	0.9992	89	7.3	101	6.0
デルタメトリン	1	500	0.9990	96	7.9	111	5.8

¹ マトリックス中の分析成分の感度または許容基準からの逸脱により LLOQ が上昇。

² マトリックスからのプラスの寄与により、LLOQ が上昇。

C. 他のベリーマトリックスにおける メソッドのクロス検証

開発されたメソッドを、相互検証のためにブルーベリーとラズベリーの他の 2 つのベリーマトリックスに拡張しました。マトリックスでの 10 ng/g のプレスパイクレベルに対する回収率と再現性の検証、および 1 ~ 500 ng/g の範囲の検量線の直線性の検証を行いました。図 7 は、3 つのベリーマトリックスすべての定量結果の統計的要約です。ブラックベリーとラズベリーの両方で優れた定量結果が得られ、回収率、再現性、検量線の直線性の許容基準の失敗率は 1 % 未満でした。ブルーベリーの失敗率はやや高く、回収率、RSD、および検量線の直線性についてそれぞれターゲットの 3.7、6.5、および 1.8 % がの許容基準を満たしていませんでした。明らかにサンプルマトリックスの複雑さが、メソッドの定量結果に直接影響しています。ただし、100 を超える多成分残留農薬分析では、合格率が 90 % を超えれば許容範囲です。

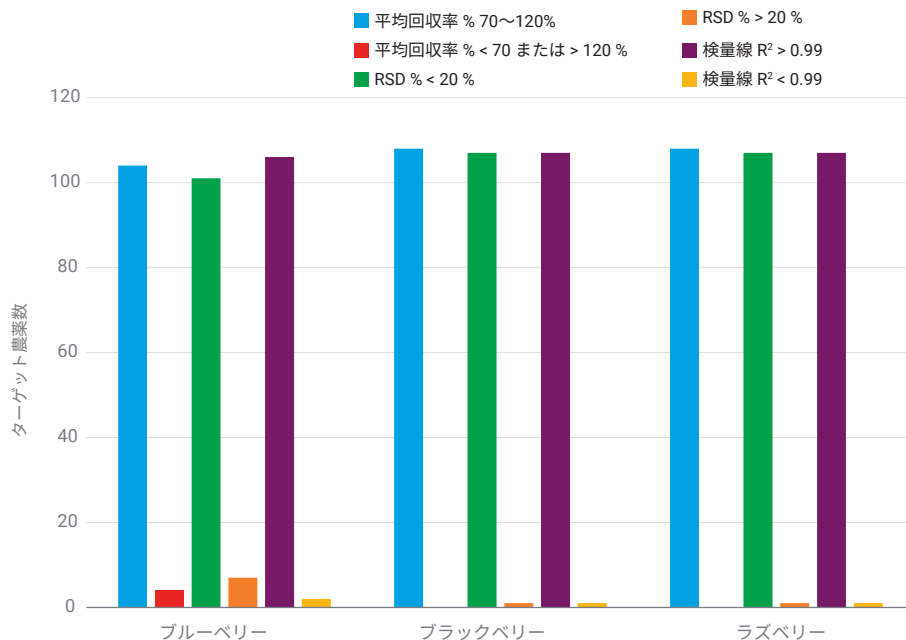


図 7. ブルーベリー、ブラックベリー、ラズベリーの定量結果の統計サマリー

結論

Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットの次に Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジ パススルークリーンアップを使用する、シンプルかつ迅速で信頼性の高いメソッドを開発し、GC/MS/MS を用いてベリー中の 108 種類の GC で検査できる農薬について検証しました。従来の dSPE クリーンアップと比較すると、Captiva EMR-GPF カートリッジは、使いやすく簡素化されたサンプル パススルークリーンアップ、ベリーマトリックスからの選択的かつ効率的な色素除去、影響を受けやすいターゲットの回収率と再現性の向上、マルチクラス多成分残留農薬分析の高い合格率を実現しました。許容基準に関して、ターゲット回収率、RSD、およびキャリブレーションの直線性を組み合わせた結果を考慮すると、定量結果から、ブルーベリーで 93 % を超える合格率、ブラックベリーとラズベリーで 99 % を超える合格率が実証されました。さらに、クリーンアップ後の最終的な抽出物が無色であり、UV 吸収が 99 % を超えて減少したことから、非常に効率的に色素が除去されたことが確認されました。

参考文献

1. González-Curbelo, M. Á. et al. Trends In Anal. Chem. **2015**, 71, 169-185.
2. Varela-Martínez, D. A.; et al. Liquid-Phase Extraction Handbooks in Separation Science, **2020**, Chp 14, 399-437.
3. Santos P. J. et al. Agilent Captiva EMR-Lipid と GC/MS/MS によるサケ中の残留農薬の多成分分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-1717JAJ, **2020**.
4. Zhao L. 食用油中の多環芳香族炭化水素化合物 13 種の測定, Agilent Technologies application note, publication number 5994-1483JAJ, **2019**.
5. Zhao L. et al. Multi-Class Multi-Residue Analysis of Pesticides in Edible Oil by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Liquid-Liquid Extraction and Enhanced Matrix Removal Lipid Cartridge Cleanup, J. Chromatogr. A **2019**, 1584, 1-12.

ホームページ

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

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。

DE00778826

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, May 19, 2022
5994-4764JAJ