

セロリ中の残留農薬分析

Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップと LC/MS/MS による分析

著者

Xia Yang and Zongyuan Li
Agilent Technologies, Inc.
Shanghai, China

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

このアプリケーションノートでは、LC/MS/MS によるセロリ中の多成分残留農薬の分析に対する、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigmented Fresh (EMR-GPF) パススルークリーンアップの導入について説明します。Captiva EMR-GPF は分散 SPE (dSPE) クリーンアップと比較して、特に影響を受けやすい農薬に対して、高速なワークフロー、同等の色素除去効率、および高い回収率と再現性を実現できることを実証します。

はじめに

新しく設計された Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジは、ベリー、コショウ、ブドウ、セロリなど、一般的な色素の多い新鮮な非葉野菜および果実マトリックスに対して、有用なパススルークリーンアップを実行するように最適化されています。Captiva EMR-GPF カートリッジで使用されている、高度な合成ハイブリッド炭素充填剤である Carbon S は、特に影響を受けやすい化合物に対して、効率的で選択的なマトリックス色素除去を実現しており、ターゲットとの不要な相互作用を大幅に低減しています。グラファイトカーボンブラック (GCB) が含まれる従来の Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用分散 SPE キットを使用したクリーンアップと比較することにより、Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップが、特に影響を受けやすい農薬に対して、簡単、高効率、選択的なサンプルクリーンアップメソッドであると同時に、ターゲット全体で優れた回収率を実現できることを実証します。結果は、マルチクラスの多成分残留農薬分析において、新しく開発したメソッドが信頼性の高いマトリックスクリーンアップ手法であることを示しています。メソッドは、一般的な Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットに簡単に採り入れることができ、一般的な新鮮で色素が多いマトリックスの信頼性の高い定量でターゲット全体の回収率の合格率を向上させます。

実験方法

機器および消耗品

- Eppendorf Centrifuge 5810R (ハンブルグ、ドイツ)
- SPEX SamplePrep 2010 Geno/Grinder (メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キット、セラミックホモジナイザ付き (部品番号 5982-5755CH)
- GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用分散 SPE キット、15 mL (部品番号 5982-0029)

- Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジ、3 mL (部品番号 5610-2090)
- Agilent 加圧式マニホールド SPE カートリッジ 48 本用 (PPM-48) (部品番号 5191-4101)

分析条件

Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)、Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) を含む、Agilent 1290 Infinity II LC 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 トリプル四重極 LC/MS (G6470A) と組み合わせて使用し、LC/MS/MS 検出を実行しました。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。

表 1 に、LC/MS/MS メソッド条件を示します。

サンプル前処理

サンプル前処理に、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットを使用した、バッファ QuEChERS プロトコルによるサンプル抽出、および GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE を使用した、分散 SPE (dSPE) クリーンアップを行いました。ホモジナイズしたセロリ 15 g を 50 mL ポリプロピレンチューブに計量し、1 % 酢酸を含む 15 mL のアセトニトリル (ACN) を使用して抽出しました。AOAC 抽出塩を添加した後、Geno/Grinder により 1,000 rpm でサンプルを 5 分間激しく振とうしました。その後、チューブを 10 °C において 4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

表 1. LC/MS/MS メソッド条件

LC/MS/MS パラメータ		設定値	
カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm カラム (部品番号 695775-902)		
カラム温度	40 °C		
オートサンブラ温度	10 °C		
注入量	2 μL		
移動相	A) 水溶液：4.5 mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム、0.1 % ギ酸を含む B) メタノール溶液：4.5 mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム、0.1 % ギ酸を含む		
グラジエント	時間 (分)	%A	流量 (mL/min)
	0	98	0.4
	0.5	98	
	3	80	
	16	0	
	18	0	
	18.1 20	98 98	
ストップタイム	20 分		
イオン源パラメータ			
ガス温度	250 °C		
ガス流量	10 L/min		
ネブライザ	40 psi		
シースガス温度	350 °C		
シースガス流量	11 L/min		
キャピラリー電圧	+3500		
ノズル電圧	+300		
時間セグメント Agilent 1290 Infinity II LC システム			
開始時間 (分)	スキャンタイプ	ダイバータバルブ	デルタ EMV (+)
0	dMRM	廃液へ	0
1.2	dMRM	MS へ	400
19	dMRM	廃液へ	0

次の手順を図 1 に示しています。汎用 dSPE クリーンアップでは、8 mL の ACN 未処理抽出物の上澄みを dSPE チューブに移しました。サンプルチューブにしっかりとふたをして 3 分間振とうした後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。Captivea EMR-GPF パススルー クリーンアップでは、3 mL の未処理抽出物を 3 mL カートリッジにロードし、カートリッジ内の液体が目視で確認できなくなるまで自然落下させ、溶出しました。PPM-48 でカートリッジを陽圧 (6 ~ 9 psi) で乾燥させました。200 μ L の dSPE チューブ内の上澄みまたはパススルー クリーンアップからの溶出液を移して 800 μ L の水と混合し、LC/MS/MS 分析を実施しました。

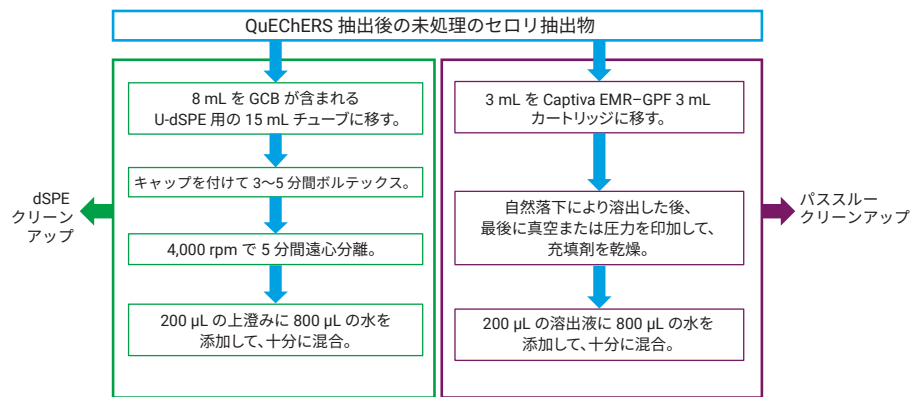


図 1. Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットによる抽出に従った手順。(左) GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用分散 SPE キット (GCB が含まれる U-dSPE) を使用した dSPE クリーンアップ、(右) Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジを使用したパススルー クリーンアップ

結果と考察

サンプル前処理手順

GCB が含まれる従来の汎用 dSPE クリーンアップでは、QuEChERS 抽出後の dSPE チューブのキャップの取り外しと取り付け、混合、遠心分離のような複数のステップで、dSPE によるクリーンアップ用の上澄みの処理に時間がかかりました。Captivea EMR-GPF クリーンアップでは、これらの手順を自然落下による溶出に置き換えて簡素化し時間を減らすことにより、時間を 30 ~ 40 % 節約できます。

Captivea EMR-GPF による回収率と再現性

7 種類の酸性ターゲットおよび 7 種類の平面構造を持つターゲットを含む、セロリ中の 52 種類の農薬の回収率と再現性について、2 つの品質管理 (QC) レベルで Captiva EMR-GPF により検証しました (図 2)。結果から、酸性または平面構造特性を持つ数種類の影響を受けやすい農薬を除いて、農薬の 90 % 超において良好な回収率 (70 ~ 120 %) を達成したことがわかりました。RSD はすべて 20 % を下回っていました。

さらに、Captivea EMR-GPF カートリッジでのサンプルロード量は、特に平面構造を持つ農薬に対して、成分の回収率に影響を与える可能性のある重要な要因です。Captivea EMR-GPF カートリッジでは、平面構造を持つ農薬の回収率に基づいて、2 mL と 3 mL のサンプルロード量を調査して比較しました。図 3 に示すように、2 mL のサンプルロード量よりはむしろ 3 mL において、平面構造を持つ化合物の回収率が大幅に向上しました。これは、充填剤の相互作用におけるマトリックスの競合作用が原因であると考えられます。サンプル

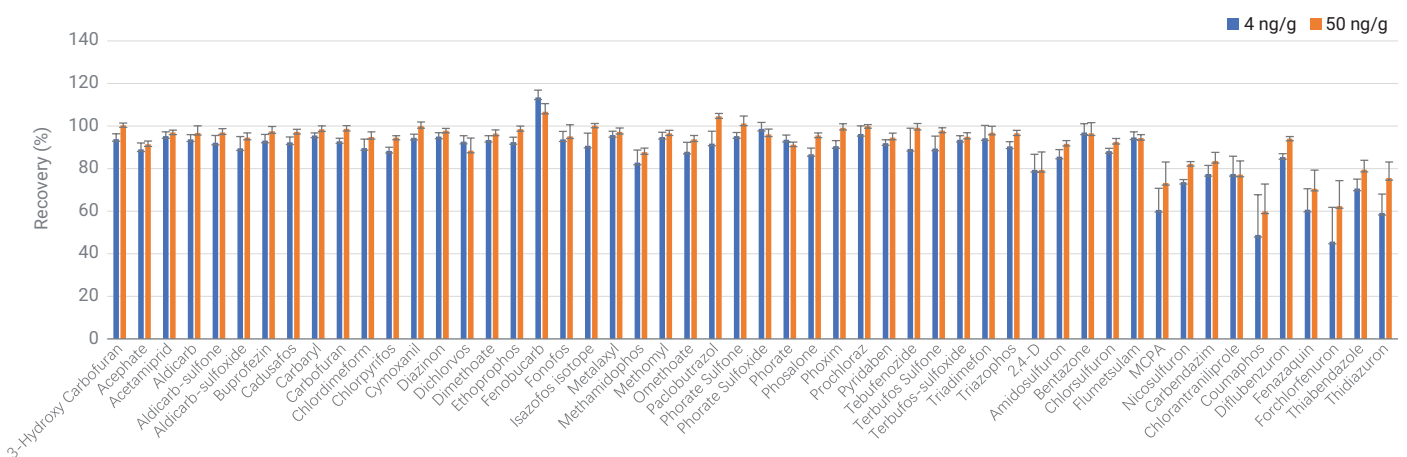


図 2. Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジを使用したクリーンアップ後の 2 つの QC レベル (n = 5) でのセロリ中の農薬の平均回収率と RSD

ロード量が低い場合、マトリックスにおける充填剤との相互作用は活性点に対応するのに十分ではなく、ターゲットの不要なリテンションが発生する場合があります。結果的に、推奨される適切なサンプル量をロードして、平面構造を持つターゲットの損失を防止することが非常に重要です。

Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップと GCB が含まれる汎用 dSPE

セロリ中でプレススパイクした QC の 2 つのレベル 4 ng/g および 50 ng/g を使用した 5 回の繰り返し分析により、Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用した場合の回収率と RSD を、GCB が含まれる汎用 dSPE を使用した場合の結果と比較しました。図 4 に、比較の統計結果を示します。全体的に見て、Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップの方が、GCB が含まれる汎用 dSPE よりも多少良好な結果を示しており、52 種類の農薬すべてにおいて、平均回収率は 80 % を超えており、平均 RSD は ≤ 10 % でした。

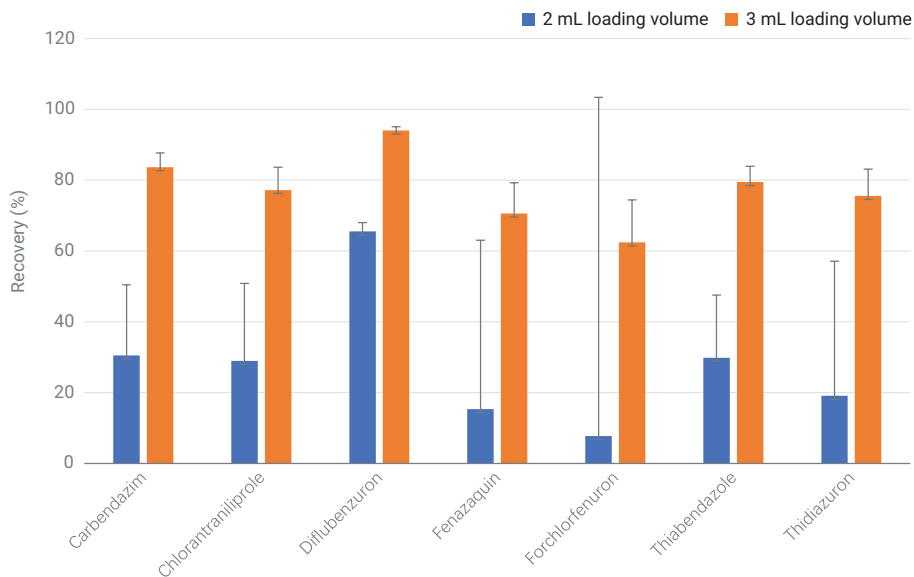


図 3. セロリ中の 50 ng/g スパイクでの平面構造を持つ農薬の回収率における Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジでのサンプルロード量の効果の比較 (n = 5)

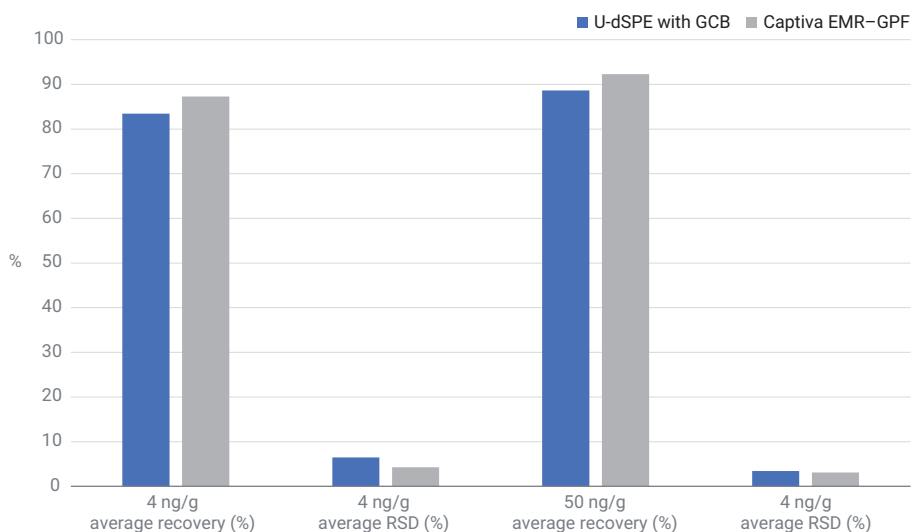


図 4. セロリ中の農薬の平均回収率と RSD に関する、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップと従来の GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE (GCB が含まれる U-dSPE) クリーンアップの比較 (n = 5)

平面構造を持つ農薬や酸性農薬など、影響を受けやすい農薬について特に比較するために、実験を実施しました。図 5 に示すように、7 種類の平面構造を持つ農薬では、Captive EMR-GPF パススルークリーンアップは、GCB が含まれる汎用 dSPE クリーンアップと同等の回収率を達成しました。

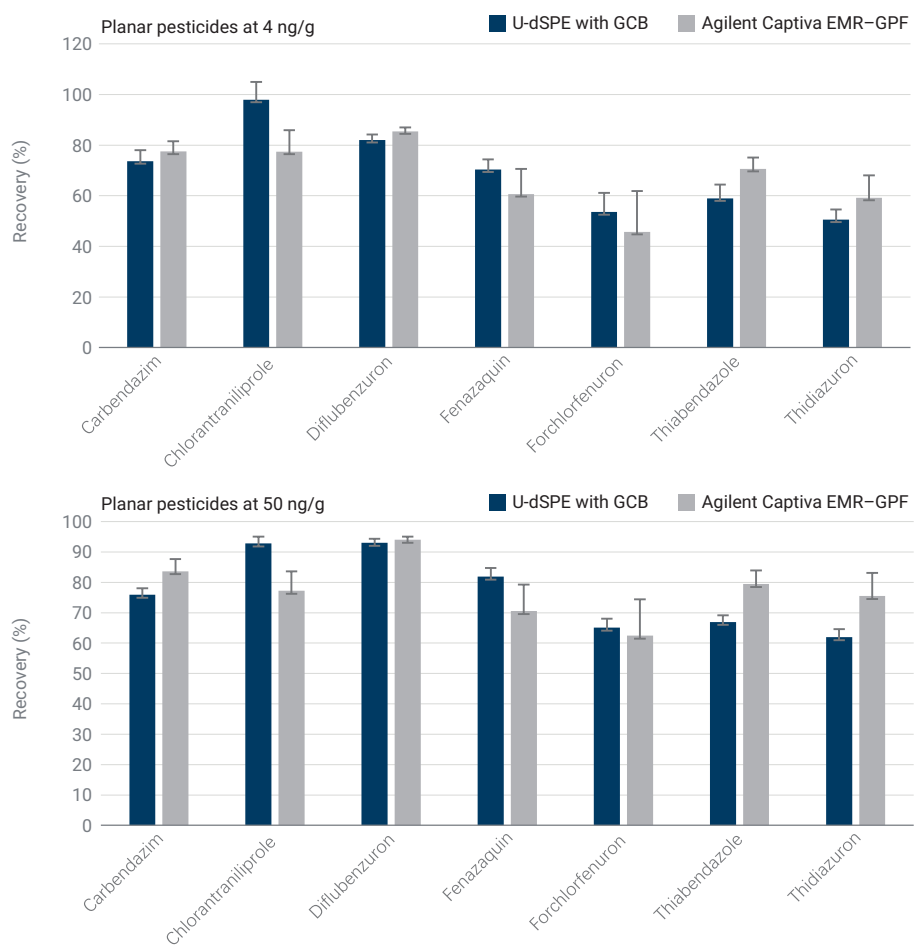


図 5. セロリ中の平面構造を持つ農薬の回収率に関する、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップと GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE (GCB が含まれる U-dSPE) クリーンアップの比較 (n = 5)

さらに重要なのは、図 6 に示すように、GCB が含まれる汎用 dSPE を使用した場合、酸性およびその他の影響を受けやすい農薬が大幅に損失していることであり、これは回収率が低く再現性が不十分であることからわかります。ただし、Captive EMR-GPF パススルークリーンアップでは、大幅に向上していました。これらの結果は、その他の Captiva EMR-GPF アプリケーションの結果と一致しています。^{1, 2} 向上したのは、次の 2 つの要因によるものと考えられます。(A) Carbon S 充填剤が、炭素の含有量が最適化されてポア構造を持つ高度なハイブリッドの炭素材であること。これにより、充填剤とその他の化合物との間の相互作用が良好に制御されます。その結果、相互作用の選択性が大幅に改善されており、充填剤とターゲット分子との間の不要な損失が低減されています。(B) MgSO₄ により同時に水を除去しないパススルークリーンアップでは、影響を受けやすい化合物に対する良好なバッファ保護を実現することにより、クリーンアップ時の損失を防止していること。その他の影響を受けやすい農薬に関しては、広い範囲で回収率が向上していると同時に、失敗率が低減することでメソッド全体の性能が向上していることにより、食品中に存在する多数のマルチクラスの多成分残留農薬に対しては、Captive EMR-GPF パススルークリーンアップがより適切なサンプルクリーンアップメソッドになります。このことは、他のアプリケーションで実証されています。^{2, 3}

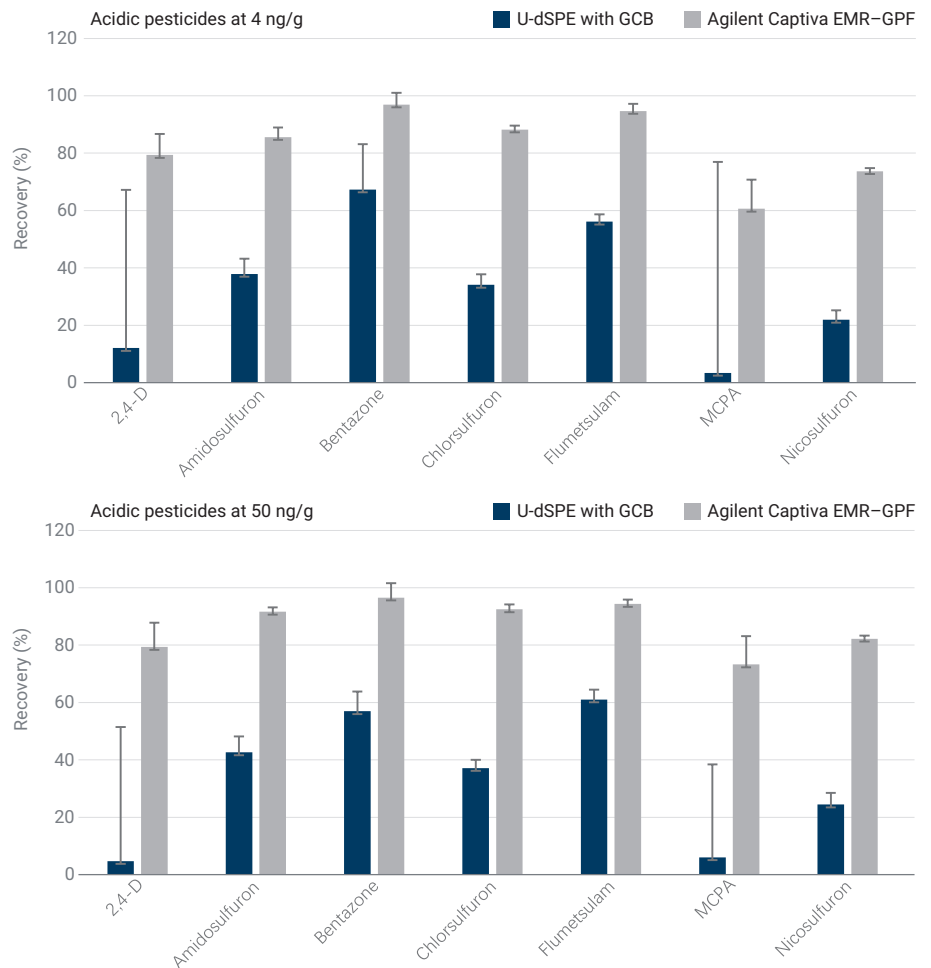


図 6. セロリ中の酸性農薬に関する、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップと GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE (GCB が含まれる U-dSPE) クリーンアップの比較 (n = 5)

マトリックス色素の除去

図 7 に、GCB が含まれる汎用 dSPE クリーンアップおよび Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップ前後のサンプル上澄みの外観を示します。QuEChERS 抽出後にクリーンアップを実施していないサンプル（左）と比較して、GCB が含まれる汎用 dSPE 後のサンプル（中央）および Captiva EMR-GPF クリーンアップ後のサンプル（右）は、無色で透明であるように見えますが、これは、色素除去効率の性能が同等であることを示しています。セロリは緑色野菜ですが、高クロロフィルの葉マトリックスではなく、一般的な色素の多い新鮮なマトリックスが含まれていると考えられています。そのため、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-High Chlorophyll Fresh (EMR-HCF) カートリッジではなく、Captiva EMR-GPF カートリッジの使用を推奨します。そうしない場合、成分が大幅に損失する可能性があります。

結論

Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップは、セロリ中の農薬の分析において優れた性能を実現していることが実証されています。このクリーンアップは、GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE キットを使用した従来のクリーンアップと比較して、高速でシンプルなワークフローおよび同等の色素除去効率を実現しており、影響を受けやすい農薬の回収率と再現性が向上しています。セロリなど一般的な色素の多い新鮮なマトリックスに対して、Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップが、GCB が含まれる汎用 dSPE クリーンアップの優れた代替手段となることが確認されています。

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いません。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。

DE02722958

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, April 27, 2022

5994-4766JAJP

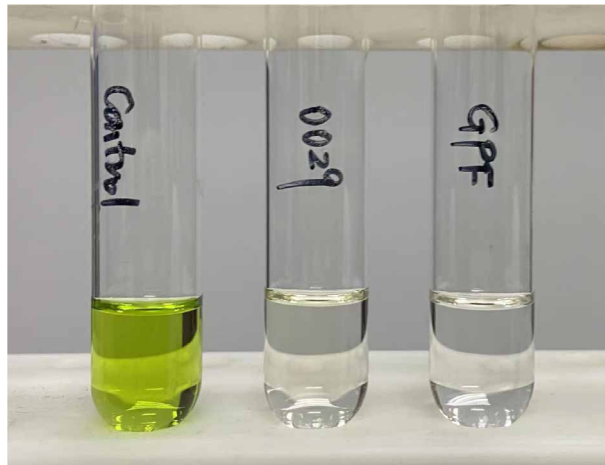


図 7. Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出からのセロリサンプル（左）、その後の GCB が含まれる Agilent Bond Elut QuEChERS 汎用 dSPE キットを使用したクリーンアップ（中央）、および Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジを使用したクリーンアップ（右）の上澄み

参考文献

1. Zhao L.; Wei T. 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, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4764JAJP, **2022**.
2. Zhao L.; ピーマン中のマルチクラスの多成分残留農薬の測定 - Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを用いた LC/MS/MS および GC/MS/MS による分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4767JAJP, **2022**.
3. Zou, A. et al. Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップおよび LC/MS/MS による黒コショウ中の 510 種の農薬の分析, Agilent Technologies application note, publication number 5994-4768JAJP, **2022**.