

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

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、色が異なるピーマンで構成される混合ピーマンマトリックス中の残留農薬の分析で使用する多成分残留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 AOAC 抽出キットによる抽出後に、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigmented Fresh (EMR-GPF) によるパススルークリーンアップ、次に LC/MS/MS および GC/MS/MS 検出をそれぞれ使用します。新しいサンプル前処理ワークフローは、効率的で選択的なマトリックスクリーンアップを提供しており、LC/MS/MS および GC/MS/MS 分析の両方に対して、高速、シンプル、便利な 1 回のサンプル前処理を実現しました。Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップは従来の分散 SPE (dSPE) クリーンアップと比較して、高効率で選択的なマトリックス/色素除去を実現しており、ターゲットの回収率と再現性が向上していると同時に、マトリックス効果と干渉が低減しています。多数の農薬 (240 種類の農薬) の分析では、LC/MS/MS と GC/MS/MS の両方において、このワークフローにより、98 % のターゲットの回収率が許容範囲内 (60 ~ 120 %) に収まり、99 % のターゲットの RSD が許容範囲内 ($\leq 20\%$) に収まり、さらに 94 % のターゲットが良好な検量線の直線性 (キャリブレーション範囲内で $R^2 > 0.99$) を示しました。

はじめに

新鮮な果物および野菜中には天然色素が、豊富に含まれている場合があります。例えば、緑色野菜のクロロフィルやルテイン、赤色、青色、紫色、黒色果物のアントシアニンやアントシアニン、オレンジ色および黄色果物と野菜のカロテノイドやキサントフィルなどです。これらの色素は、有機溶媒を使用した抽出方法により簡単に抽出できます。色素共溶出物を十分に除去しない場合、LC/MS/MS や GC/MS/MS のような検出機器で非常に色素が多いサンプル抽出物を直接注入すると、LC/MS/MS でのマトリックスによるイオン抑制、GC/MS/MS でのマトリックス干渉、検出流路および MS イオン源でのマトリックス堆積物の蓄積など、複数のマトリックス効果を引き起こす場合があります。そのため、機器による分析の前に十分なクリーンアップを実施して、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、色素を効率的に除去するためにサンプル前処理で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ている QuEChERS 前処理メソッドでは、色素除去用の dSPE キットで GCB が使用されています。GCB は色素除去の効率が高いですが、ヘキサクロロベンゼン、チアベンダゾール、シプロジニルなど、特に平面構造を持つ化合物に対して、不要な成分損失を引き起こす場合もあります。競合製品のマトリックス色素除去では、他のタイプの合成炭素材やポリマーベースの充填剤も使用されていますが、依然として成分の回収率やマトリックス/色素除去が妥協の産物になっています。特に影響を受けやすい化合物に対して、効果的なマトリックス/色素除去と成分の回収率の間のバランスを保つことは困難です。

アジレントの Carbon S 充填剤は、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す。Carbon S 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色素を同等またはより適切に除去し、影響を受けやすい分析対象物の回収率が大幅に向上しています。結果として、Carbon S 充填剤は従来の GCB 充填剤と比較して、分析対象物の回収率とマトリックス色素除去の効率の間のバランスをより適切に保っています。この高度な充填剤は Agilent Captiva EMR 製品で展開されています。ここでは、効率的で選択的なマトリックス除去に対して、便利なパススルークリーンアップが採用されています。パススルークリーンアップは従来の dSPE クリーンアップと比較して、dSPE チューブのキャップの取り外しと取り付け、ボルテックス、遠心分離が排除されるなど、ワークフローのステップがシンプルになっています。

このアプリケーションノートでは、LC/MS/MS (LC で検査可能な 129 種類の農薬) および GC/MS/MS (GC で検査可能な 101 種類の農薬) による、ピーマン混合物中の 230 種類の農薬の分析において、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用したサンプル前処理について評価しました。ピーマン混合物には、赤色、緑色、オレンジ色、および黄色のピーマンが含まれていました。一般的な色素の多いさまざまな野菜を代表して、このマトリックスを選択しました。

実験方法

材料および試薬

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

溶液および標準試料

標準スパイク溶液 A (LC で検査可能な 129 種類の農薬) を、1:1 の ACN:水中で 10 µg/mL として作成しました。標準スパイク溶液 B (GC で検査可能な 101 種類の農薬) を、ACN 中で 10 µg/mL として作成しました。混合 IS スパイク溶液 A (LC 用の 2 種類の IS 化合物) を、1:1 の ACN:水中で 10 µg/mL として作成しました。混合 IS スパイク溶液 B (GC 用の 3 種類の IS 化合物) を、ACN 中で 10 µg/mL として作成しました。4 種類のスパイク溶液をすべて、冷凍庫で -20 °C で保管しました。標準スパイク溶液を室温で十分に温めて、使用前に超音波処理し、使用後に戻しました。

1 % 酢酸抽出溶媒を含む ACN は、10 mL の氷酢酸を 990 mL の ACN に添加して作成し、室温で保管しました。

実験装置と材料

Agilent 1290 Infinity パイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)、Agilent 1290 Infinity サーモスタットカラムコンパートメント (G1316C) で構成される Agilent 1290 Infinity LC システムで、LC/MS/MS 検出を実行しました。この LC システムを、Agilent Jet Stream iFunnel エレクトロスプレーイオンソースを搭載した Agilent トリプル四重極 LC/MS システム (G6490) に連結しました。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。

GC/MS/MS では、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。GC システムには、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)、G4513A オートインジェクタ、および補助電子式圧力コントロール (AUX EPC) モジュールで制御される、ページ付き Ultimate ユニオンに基づくバックフラッシュシステムを搭載しています。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。

サンプル前処理に使用したその他の装置は次のとおりです。Centra CL3R 遠心分離機 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)、Geno/Grinder (SPEX、ニュージャージー州、米国)、Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph、シュヴァーバツハ、ドイツ)、ピペットとリピーター (Eppendorf、ニューヨーク州、米国)、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 AOAC 抽出キット (部品番号 5982-5755)、Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジ、3 mL (部品番号 5610-2090)、Agilent 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

分析条件は、以前使用したメソッドに従いました。^{3, 4}表 1 に、LC/MS/MS 条件を示します。表 2 に、GC/MS/MS 条件を示します。表 3 に、すべてのターゲットのダイナミック MRM (dMRM) パラメータを示します。図 1 に、濃度 100 ng/g で添加したピーマンサンプルに対して、上の (A) LC/MS/MS 条件および (B) GC/MS/MS 条件を使用した、ターゲット農薬の代表的な MRM クロマトグラムを示します。サンプルは、QuEChERS AOAC 抽出およびその後の Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用して前処理しました。

表 1. Agilent 1290 Infinity LC および Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS メソッド条件

LC 条件			
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 959758-902) Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム、UHPLC ガード、2.1 × 5 mm、1.8 μm (部品番号 821725-901)		
流量	0.3 mL/min		
カラム温度	40 °C		
注入量	2 μL		
移動相	A) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム水溶液、0.125 % 酢酸 B) 10 mM 酢酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム、95:5 の ACN:水、0.125 % 酢酸		
ニードル洗浄	1 : 1 : 1 : 1 の ACN:MeOH:IPA:水、0.2 % 酢酸		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0.0	15	0.3
	6.0	95	0.3
	8.01	100	0.3
ストップタイム	10 分		
ポストタイム	2.3 分		
MS 条件			
イオン化モード	エレクトロスプレーイオン化 (ESI)		
ガス温度	120 °C		
ガス流量	20 L/min		
ネプライザ	40 psi		
シースガスヒーター	225 °C		
シースガス流量	11 L/min		
キャピラリー電圧	4,500 V (ポジティブおよびネガティブ)		
ノズル電圧	0 V (ポジティブとネガティブの両方)		
iFunnel パラメータ	高圧 RF : 150 V (ポジティブ)、90 V (ネガティブ) 低圧 RF : 60 V (ポジティブ)、60 V (ネガティブ)		
極性	ポジティブおよびネガティブ、表 2 を参照		

表 2. 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 J&W HP-5ms ウルトラライナート GC カラム、15 m × 0.25 mm、膜厚 0.25 μm (2 個) (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/min
カラム 2 流量	1.4 mL/min
注入量	1 μL コールドスプリットレス
注入口ライナ	Agilent 注入口ライナ、ウルトラライナート、スプリットレス、シングルテーパー、ガラスウール入り、内径 4 mm (部品番号 5190-2293)
MMI 温度プログラム	75 °C で 0.02 分間、750 °C/min で 350 °C まで昇温して保持
オープン温度プログラム	60 °C で 1 分間、40 °C/min で 170 °C まで昇温、10 °C/min 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 分間ポストラン 310 °C のオープン温度 50 psi の AUX EPC 圧力、および 2 psi の注入口圧力
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
溶媒ディレイ	3 分

表 3. (A) LC/MS/MS および (B) GC/MS/MS でのターゲット農薬の dMRM 条件

A ターゲット名	LC/MS/MS での dMRM 条件						
	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)	極性
メタミドホス	1.156	142 -> 124.9	13	142 -> 94.1	9	1	陽
ピメトロジン	1.238	218.1 -> 105	25	218.1 -> 51.2	73	1	陽
アセフェート	1.253	184 -> 143	9	184 -> 95	25	1	陽
オメトエート	1.391	214 -> 183	9	214 -> 124.9	17	1	陽
アミノカルブ	1.609	209.1 -> 152.2	9	209.1 -> 137	21	1	陽
プロバモカルブ	1.775	189.2 -> 102	17	189.2 -> 74	25	1	陽
ジノテフラン	1.994	203.1 -> 129	5	203.1 -> 43	61	1	陽
カルベンダジム	2.750	192.1 -> 160	17	192.1 -> 65.1	61	1	陽
モノクロトホス	2.930	224.1 -> 127	13	224.1 -> 58	29	1	陽
ニテンピラム	2.950	271.1 -> 125.9	25	271.1 -> 56.1	49	1	陽
チアベンダゾール	3.001	202.1 -> 175.1	25	201.1 -> 131	37	1	陽
フベリダゾール	2.259	185.1 -> 157.1	25	185.1 -> 156.1	33	1	陽
チアメトキサム	3.512	292 -> 211	9	292 -> 131.9	17	1	陽
シモキサニル	3.680	199.1 -> 157.2	21	199.1 -> 156.1	29	1	陽
メキサカルバート	3.750	223.2 -> 151.1	25	223.2 -> 136.1	45	1	陽
エチリモール	3.786	210.2 -> 140.1	17	210.2 -> 43	61	1	陽
メタミロン	3.852	203.1 -> 104	21	203.1 -> 41.9	49	1	陽
フェヌロン	3.951	165.1 -> 72.1	21	165.1 -> 46	13	1	陽
クロリダゾン	4.036	222 -> 76.9	33	222 -> 51	77	1	陽
イミダクロプリド	4.088	256.1 -> 208.8	17	256.1 -> 175	17	1	陽
シミアゾール	4.125	219.1 -> 171.2	28	219.1 -> 100	17	1	陽
ジメトエート	4.199	230 -> 125	17	230 -> 47.1	41	1	陽
フェノプカルブ	4.259	206.1 -> 66.1	21	NA	NA	1	陰
アセタミプリド	4.265	223.1 -> 126	17	223.1 -> 73.1	69	1	陽
メトスルフロン	4.501	368.1 -> 325.2	17	368.1 -> 231.2	5	1	陽
フルメツラム	4.523	326.1 -> 129	21	326.1 -> 109	73	1	陽
4-ニトロフェノール D ₄ (IS)	4.608	142 -> 112	17	142 -> 46	45	1	陰
テブチウロン	4.656	229.1 -> 172.1	13	229.1 -> 116	33	1	陽
4-ニトロフェノール	4.737	138 -> 107.9	17	138 -> 46	57	1	陰
チアクロプリド	4.743	253 -> 125.9	17	253 -> 73	73	1	陽
ニコスルフロン	4.761	411.1 -> 182	22	411.1 -> 106	32	1	陽
シマジン-D ₁₀ (IS)	4.925	212.2 -> 137.1	25	212.2 -> 44	49	1	陽
チジアズロン	4.946	221.1 -> 101.9	13	221.1 -> 51.1	80	1	陽
セクブメトン	5.051	226.2 -> 170.1	17	226.2 -> 113.9	24	1	陽
イマザリル	5.103	297.1 -> 158.9	25	297.1 -> 69	21	1	陽
ベンタゾン	5.127	239.1 -> 197	21	239.1 -> 132.1	29	1	陰
オキサスルフロン	5.129	407.1 -> 150.1	17	407.1 -> 107	57	1	陽
カルフェントラゾン-エチル	5.165	388.1 -> 204.9	29	388.1 -> 167.1	17	2	陽
レナシル	5.216	235.2 -> 153	13	235.2 -> 136	37	1	陽
メトリブジン	5.315	215.1 -> 49.1	214	215.1 -> 47	80	1	陽
シアゾファミド	5.334	325.1 -> 233	21	325.1 -> 231.2	29	1	陽
プロボスキル	5.348	210.1 -> 111.1	9	210.1 -> 64.9	41	1	陽

ターゲット名	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)	極性
フェンメディファム	5.371	301.1 -> 281.2	17	301.1 -> 238.1	33	1	陽
2,4-D	5.417	221 -> 163.1	13	219 -> 161.1	17	1	陰
クロルスルフロン	5.481	358 -> 167.1	17	358 -> 141.2	21	2	陽
メタバズチアズロン	5.498	222.1 -> 165.1	17	222.1 -> 150	45	1	陽
ジオキサカルブ	5.498	224.1 -> 167.1	12	224.1 -> 123.1	20	1	陽
カルボフラン	5.498	222.1 -> 165.1	9	222.1 -> 123.1	25	1	陽
2,4,5-TP	5.551	266.9 -> 198.8	9	266.9 -> 141	17	1	陰
MCPA	5.552	201 -> 143.1	13	199 -> 141.1	13	1	陰
シクルロン	5.561	199.2 -> 72	29	199.2 -> 69.1	21	1	陽
アミドスルフロン	5.591	370.1 -> 261.1	9	370.1 -> 218	25	1	陽
フルトリアホル	5.592	302.1 -> 123	25	302.1 -> 70.1	13	1	陽
カルバリル	5.596	202.1 -> 145.1	9	202.1 -> 127.2	33	1	陽
クロトルロン	5.597	213.1 -> 72.1	29	213.1 -> 46.1	17	1	陽
ピラカルボリド	5.634	218.1 -> 124.9	13	218.1 -> 43.1	65	1	陽
フルオメツロン	5.645	233.1 -> 72	17	233.1 -> 46	17	1	陽
アトラジン-D ₅ (IS)	5.660	221.1 -> 137.1	17	221.1 -> 44.1	57	1	陽
ホルクロルフェヌロン	5.669	248.1 -> 129	13	248.1 -> 93.1	41	1	陽
ホスチアゼート	5.692	284.1 -> 227.9	9	284.1 -> 103.9	25	1	陽
アザコナゾール	5.778	300 -> 231.1	13	300 -> 159.1	29	1	陽
メトプロリン	5.779	272.2 -> 198.1	21	272.2 -> 170.1	29	1	陽
DEET	5.783	192.1 -> 118.9	21	192.1 -> 91	33	1	陽
フェンプロピジン	5.803	274.3 -> 147.1	29	274.3 -> 117	61	1	陽
カルボキシシ	5.842	236.1 -> 143	13	236.1 -> 42.9	49	1	陽
ジウロン	5.855	233 -> 72.1	17	233 -> 46.1	21	1	陽
2,4,5-T	5.896	254.9 -> 197	9	252.9 -> 195	9	1	陰
スピロキサミン	5.901	298.3 -> 144.1	21	298.3 -> 100	33	1	陽
ジクロルプロップ	5.957	233 -> 175.1	9	233 -> 160.9	17	1	陰
メコプロップ	6.056	213 -> 141	13	213 -> 71	9	1	陰
メトプロムロン	6.063	259 -> 170	13	259 -> 90.9	45	1	陽
ジメトモルフ I	6.183	388.1 -> 300.9	24	388.1 -> 165	36	1	陽
ジメタクロール	6.223	256.1 -> 224	9	256.1 -> 148.1	29	1	陽
クロラントラニプロール	6.266	482 -> 284	33	482 -> 112	80	1	陽
クロマゾン	6.284	240.1 -> 125	32	240.1 -> 89.1	68	1	陽
ジメトモルフ II	6.303	388.1 -> 300.9	24	388.1 -> 165	36	1	陽
シプロコナゾール	6.325	292.1 -> 125	45	292.1 -> 70	17	1	陽
フララキシル	6.539	302.1 -> 242.1	13	302.1 -> 95.1	33	1	陽
クロロクスロン	6.591	291.1 -> 72.1	21	291.1 -> 45.9	27	1	陽
イプロバリカルブ	6.601	321.2 -> 119	21	321.2 -> 91.1	65	1	陽
ハロフェノジド	6.620	329.1 -> 120.9	21	329.1 -> 77.1	37	1	陰
スピノサド A	6.622	732.5 -> 142.1	33	732.5 -> 98.1	77	1	陽
リニューロン	6.630	249 -> 159.9	13	249 -> 133.1	37	1	陽
フェナミホス	6.653	304.1 -> 216.9	21	304.1 -> 201.9	37	1	陽
プロメカルブ	6.668	208.1 -> 109	13	208.1 -> 41	49	1	陽
マイクロブタニル	6.718	289.1 -> 125	41	289.1 -> 70.2	21	1	陽
マンジプロバミド	6.737	412.1 -> 328.2	9	412.1 -> 125.1	53	1	陽
アゾキシストロビン	6.737	404.1 -> 372	13	404.1 -> 344.1	25	1	陽
フェンアミドン	6.766	312.1 -> 92.1	29	312.1 -> 65	65	1	陽

ターゲット名	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)	極性
ボスカリド	6.855	343 -> 307	17	343 -> 139.9	17	1	陽
フルオピコリド	6.944	383 -> 173	33	383 -> 108.9	80	1	陽
スピノサド D	6.966	746.5 -> 142.2	33	746.5 -> 98.1	65	1	陽
イソキサベン	6.971	333.2 -> 165.1	17	333.2 -> 106.9	77	1	陽
ビフェナゼート	6.985	301.2 -> 198.1	9	301.1 -> 170.2	17	1	陽
ベンコナゾール	7.008	284.1 -> 159.9	33	284.1 -> 70	1	1	陽
ピリデート	7.025	389.1 -> 59.1	17	379.1 -> 42	77	1.5	陽
ジフロベンズロン	7.058	311 -> 158.1	13	311 -> 141.1	37	1	陽
エトキシキン	7.169	218.2 -> 174.1	33	218.2 -> 160.1	37	2	陽
フルオキサストロビン	7.186	459.1 -> 427	17	459.1 -> 188	41	1	陽
ブクロラズ	7.201	376 -> 308	9	376 -> 70.1	21	1	陽
イソプロチオラン	7.204	291.1 -> 231.1	5	291.1 -> 188.9	21	1	陽
フルフェナセット	7.225	364.1 -> 194.1	9	364.1 -> 152.1	17	1	陽
ロテノン	7.233	395.2 -> 213.1	25	395.2 -> 192.2	21	1	陽
ジモキシストロビン	7.239	327.2 -> 205.1	9	327.2 -> 116	29	1	陽
シプロジニル	7.277	226.1 -> 93	45	226.1 -> 51.1	80	1	陽
モキシデクチン	7.295	640.4 -> 478.1	8	640.4 -> 413.1	25	1	陽
アジンホスエチル	7.311	346.1 -> 289.1	4	346.1 -> 132	16	1	陽
テブフェノジド	7.352	351.2 -> 149	21	351.2 -> 105.1	37	1	陰
フルベンジアミド	7.354	683 -> 408	8	683 -> 273.9	40	1	陽
ベフルブタミド	7.406	356.1 -> 91	33	356.1 -> 65.2	80	1	陽
ヒドラメチルノン	7.465	495.2 -> 323.2	33	495.2 -> 151.1	80	1	陽
ジノセブ	7.470	239.1 -> 192.9	25	239.1 -> 134	50	1	陰
クレソキシムメチル	7.502	314.1 -> 267.1	5	314.1 -> 221.9	9	1	陽
ピコキシストロビン	7.524	368.1 -> 205.1	9	368.1 -> 145.1	29	1	陽
ピラクロストロビン	7.804	388.1 -> 193.9	12	388.1 -> 163	25	1	陽
イソフェンホス-メチル	7.805	332.1 -> 231	17	332.1 -> 120.9	44	1	陽
ジフルフェニカン	8.033	395.1 -> 266.1	25	395.1 -> 217.8	57	1	陽
トリフロキシストロビン	8.075	409.1 -> 186.1	13	409.1 -> 144.9	65	1	陽
メトラフェノン	8.185	409.1 -> 226.9	21	109.1 -> 209.1	9	1	陽
メタフルミゾン	8.215	507.1 -> 178.1	25	507.1 -> 178.1	65	2	陽
シクロエート	8.222	216.1 -> 83.2	13	216.1 -> 55.2	29	1	陽
フルアジナム	8.299	462.9 -> 415.9	21	462.9 -> 397.9	17	1	陰
テメホス	8.488	467 -> 419	21	467 -> 125	37	1	陽
フェナザキン	8.619	307.2 -> 160.9	13	307.2 -> 56.9	25	1	陽
ピリプロキシフェン	8.627	322.2 -> 227.1	14	322.2 -> 95.9	17	1	陽
ヘキシチアソックス	8.843	353.1 -> 228.1	9	353.1 -> 168.1	21	1	陽
トラルコキシジム	8.862	330.2 -> 138	17	330.2 -> 96.1	33	1	陽
ブプロフェジン	8.893	306.2 -> 201	9	306.2 -> 57.2	25	1	陽
フェンピロキシメート	8.966	422.2 -> 366.1	16	422.2 -> 135.1	36	1	陽
プロキナジド	9.255	373 -> 331	13	373 -> 289.1	25	1	陽
ピリダベン	9.531	365.2 -> 309.1	13	365.2 -> 147	25	1	陽
スピロジクロフェン	9.638	411.1 -> 71.2	13	411.1 -> 42.9	65	1	陽

B	GC/MS/MS での 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)
ジクロルボス	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	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
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
ヘブタクロル	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
プロパルギット	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	10.786	262.9 -> 192.9	35	254.9 -> 220	20	1.5	ワイド
トリアジメホ	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
メカルバム	11.382	158.9 -> 131	5	130.9 -> 74	5	1.5	ワイド
トリルフルアニド	11.386	237.9 -> 137	15	136.9 -> 91.1	20	1.5	ワイド

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 分離能
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
バクロブトラゾール	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
フルジオキサニル	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
イブロジオン	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
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
ソキサミド	14.422	189 -> 161.1	15	187 -> 159.1	15	1.5	ワイド
エポキシコナゾール	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
フロムコナゾール 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

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 分離能
フロムコナゾール 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

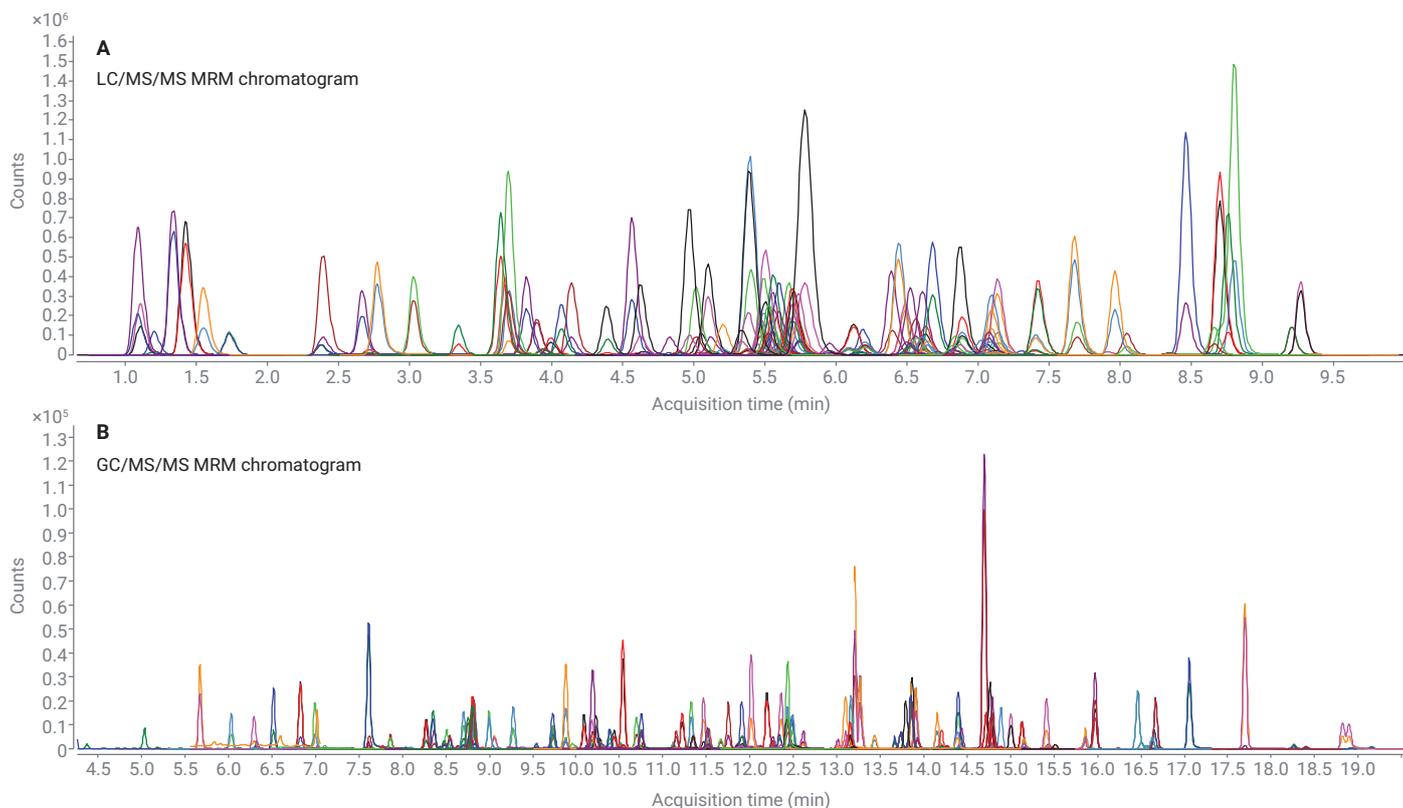


図 1. 100 ng/g の 230 種類のターゲット農薬を添加した抽出済みピーマンサンプルの (A) LC/MS/MS および (B) GC/MS/MS MRM クロマトグラム。サンプルは、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットの後に Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用して前処理しました。リテンションタイムの順序に基づいたピーク同定については、表 3 を参照してください。

サンプル前処理

新鮮な有機混合ピーマンは、地元の食品店から購入しました。サンプルを小さく切って一晩 -20°C の冷凍庫で冷凍してから、グライNDERでホモジナイズしました。次に、すりつぶしたマトリックスサンプルを 50 mL 遠心分離チューブ中で 15 g 計量し、抽出するまで -20°C の冷凍庫で保管しました。計量した混合ピーマンサンプル (15 g) を事前に解凍してから、QuEChERS AOAC メソッドに従って抽出しました。次に未処理の抽出物を、パススルークリーンアップのために Agilent Captiva EMR-GPF 3 mL カートリッジにロードしました。LC/MS/MS 分析では、サンプル溶出液を水で 5 倍に希釈して、機器での注入のために 20:80 の ACN:水で最終サンプルを作成しました。GC/MS/MS 分析では、クリーンアップしたサンプル溶出液を無水 MgSO_4 で脱水させ、機器での注入のために残留水分を完全に除去しました。前に説明したように、脱水手順は無水 MgSO_4 粉末を添加することにより半定量的に実行しましたが、これは、ボルテックス時および遠心分離後に残留水分を完全に除去するための重要で視覚的なインジケータに基づいています。³図 2 に、詳細なサンプル前処理手順を示します。約 30 種類のサンプルのバッチでは通常、全手順に約 40 ~ 50 分を要します。

メソッド性能の評価

Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用して開発したサンプル前処理メソッドの性能を、(a) GCB が含まれる QuEChERS 汎用分散 SPE (GCB が含まれる U-dSPE) キットを使用した従来の dSPE クリーンアップ、(b) 競合他社のポリマー相ベースの dSPE (ベンダー 1 の dSPE)、および (c) 別の合成炭素相ベースの dSPE (ベンダー 2 の dSPE) と比較しました。LC/MS/MS および GC/MS/MS による混合ピーマン中の農薬分析における比較は、マトリックスクリーンアップおよびターゲットの回

収率と再現性の点から、詳細なメソッド性能の評価に基づいて実施しました。マトリックスのクリーン度の評価に、色素除去、LC/MS/MS でのマトリックス効果、および GC/MS/MS でのマトリックス干渉の評価を含めました。

回収率と再現性の評価では、データは 6 回の繰り返し分析での混合ピーマンサンプルホモジネート中の 10 ng/g のスパイクレベルで採取しました。LC/MS/MS および GC/MS/MS によるピーマン中の 230 種類の農薬の定量分析において、マトリックス適合ダイナミック

キャリブレーション範囲と検量線の直線性、低 (10 ng/g) および高 (100 ng/g) スパイクレベルでのメソッドの真度と精度などについて新しいメソッドを検証しました。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測定しました。

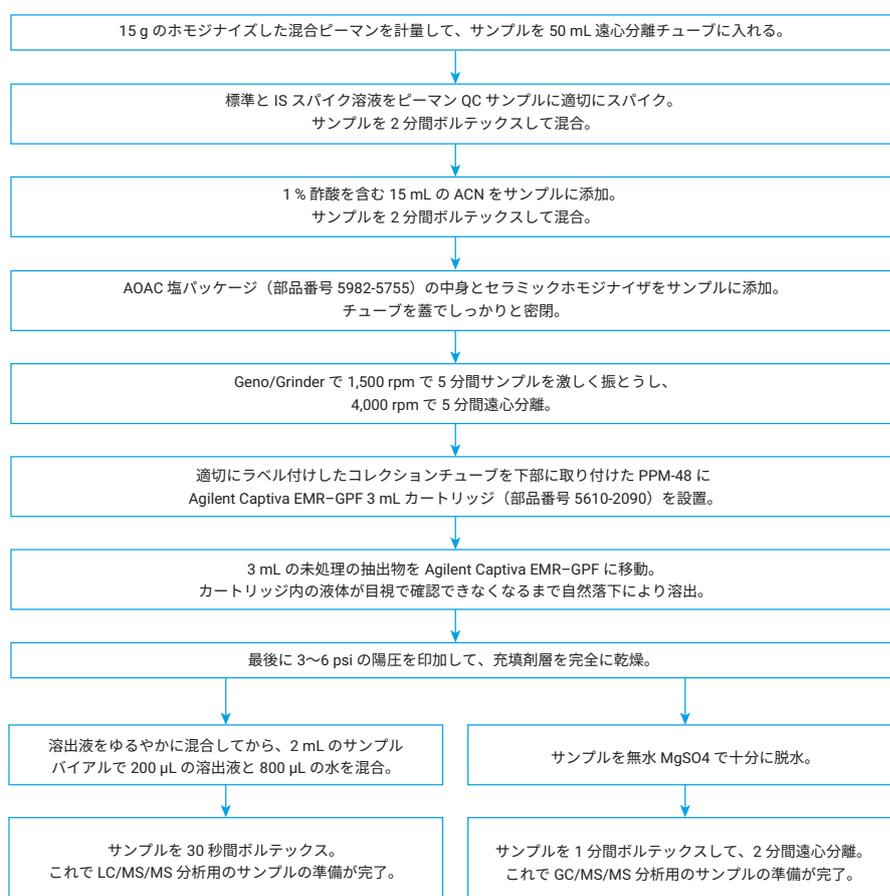


図 2. LC/MS/MS および GC/MS/MS 分析の両方において、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットの後に Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップを使用した、ピーマンサンプルのサンプル前処理手順

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 充填剤は高度なハイブリッドの炭素材であり、分析対象物の回収率とマトリックス色素除去の効率の間で優れたバランスを保っています。Agilent Captiva EMR パススルークリーンアップ手法は、マトリックス干渉の除去において高い選択性と効率を実現しており、便利かつ高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、特にマルチクラスの多成分残留分析に適していますが、これは、マトリックスクリーンアップが、不要なマトリックス干渉の選択的な保持に基づいていることにより、ターゲット回収率に与える影響が最小限に抑えられるためです。パススルークリーンアップは従来の dSPE クリーンアップと比較して、dSPE チューブのキャップの取り外しと取り付け、ボルテックス、遠心分離が排除されるなど、ワークフローのステップがシンプルになっています。Agilent Captiva EMR 製品を使用したパススルークリーンアップは、Agilent Captiva EMR-Lipid による脂肪の多いマトリックスの分析^{3, 4}や、Agilent Captiva EMR-GPF⁵ および Agilent Captiva EMR-HCF⁶ による生鮮食品の分析のような食品分析で使用されています。植物由来のマトリックスに対するすべての Agilent Captiva EMR カートリッジとその推奨分析対象物に関する詳細な説明を表 4 に示します。

充填剤の製剤を、多成分残留ターゲットの回収率とマトリックスクリーンアップの効率に基づいて、慎重かつ完全に最適化しました。これらの Agilent Captiva 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物などマトリックスの種類に応じて、選択的に効率的なマトリックスクリーンアップを実現しています。dSPE キットで一般的に使用されている無水 MgSO₄ 粉末は、Agilent Captiva EMR カートリッジには充填されていません。これは、調査により、クリーンアップ手順時の MgSO₄ による同時脱水がバッファ効果を大幅に損ない、影響を受けやすい一部の農薬が損失する可能性があることがわかったためです。シンプルなワークフローにより、効率的で選択的なマトリックスクリーンアップ、高いターゲット回収率と再現性、マトリックス効果の低減および、よりクリーンなマトリックスバックグラウンドを達成しました。これにより、さまざまな検出メソッドで必要になる詳細な変更を加えなくても、LC/MS/MS および GC/MS/MS 検出の両方に対して、比較的一貫性のあるサンプル前処理メソッドが実現します。

サンプル前処理手順

新鮮な果物および野菜マトリックスでは、標準のサンプル抽出方法として QuEChERS 抽出が広く採用されています。この実験では、QuEChERS AOAC 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、3 mL の未処理の抽出物をパススルークリーンアップのために、Agilent

Captiva EMR-GPF カートリッジにロードしました。溶出は自然落下により実行しましたが、3 mL の未処理のサンプル抽出物が完全に溶出するまで 5 ~ 10 分を要しました。LC/MS/MS 分析のために、200 μL の溶出液を 800 μL の水と混合しました。残りの溶出液を無水 MgSO₄ で十分に乾燥させ、残留水分を完全に除去しました。Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジでの自然落下による溶出は簡単で、手間はほとんどかかりません。溶出を実行している間、その後のサンプル希釈など、次のステップを準備できます。通常、LC/MS/MS および GC/MS/MS 分析の両方で 30 種類のサンプルを準備するために、約 40 ~ 50 分を要します。

サンプルクリーンアップメソッドの性能の比較

Agilent Captiva EMR-GPF カートリッジは、Carbon S、1 級-2 級アミン (PSA)、およびエンドキャッピング C18 (EC-C18) の充填剤製剤が最適に混合されているなど、一般的な色素が多い新鮮なサンプルマトリックスのパススルークリーンアップで使用するように設計されています。新しいパススルークリーンアップメソッドを、従来の GCB が含まれる U-dSPE および 2 種類の対応するベンダーの dSPE (ベンダー 1 および 2) と詳細に比較しました。

表 4. さまざまな植物由来のマトリックスに対する Agilent Captiva EMR カートリッジとその推奨分析対象物

アジレント製品名	充填剤	サンプルロード量	サンプルマトリックスに基づいた推奨分析対象物	適用可能な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 : 2.5 ~ 3 mL 6 mL カートリッジ : 5 ~ 6 mL	高脂肪油性マトリックス	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	ホウレンソウ、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	ホウレンソウ、パセリ、アルファルファ
Captiva EMR-GPF	Carbon S/PSA/EC-C18	3 mL	一般的な色素の多い新鮮な植物由来のマトリックス	果実、コショウ、ブロッコリ、ブドウ、セロリ
Captiva EMR-GPD	Captiva EMR-Lipid/PSA/EC-C18/Carbon S	2.5 ~ 3 mL	一般的な色素の多い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	色素が少ない/存在しない乾燥した植物由来のマトリックス	ナッツ、色素の淡い香辛料、タバコ

サンプルマトリックスクリーンアップ

サンプルマトリックスのクリーン度の評価には、色の比較、450 nm でのサンプルの LC-UV 吸光度、および GC/MS フルスキャンバックグラウンドの比較があります。図 3 は、QuEChERS 抽出後にさまざまなクリーンアップを使用して、ピーマンマトリックスのクリーン度を比較したものです。内容は次のとおりです。(A) 最終抽出物の色の比較、(B) 波長 450 nm における UV 吸光度の比較、(C) GC/MS フルスキャンバックグラウンドの比較。混合ピーマンの未処理の抽出物の色は茶色でした。Agilent Captiva EMR-GPF またはベンダー 2 の dSPE クリーンアップ後のサンプルは透明で、非常に薄い黄色でした。GCB が含まれる U-dSPE クリーンアップ後のサンプルも薄い黄色でしたが、前の 2 つのサンプルよりも少し濃くなっていました。これら 3 種類のクリーンアップメソッドはすべて、色素成分の UV 吸収に基づいて、> 95 % の色素除去を達成しました。比較してみると、ベンダー 1 の dSPE クリーンアップ後のサンプルは、クリーンアップを実施していない未処理の抽出物よりもわずかに薄い茶色でした。UV 吸収に基づいたこのサンプルの色素除去は、わずか約 50 % であることが確認されました。これらの結果は GC/MS フルスキャンバックグラウンドの比較結果とも一致しており、Agilent Captiva EMR-GPF、ベンダー 2 の dSPE、および GCB が含まれる U-dSPE クリーンアップ後のサンプル抽出物は、同等の低いフルスキャンバックグラウンドを示しました。ベンダー 1 の dSPE クリーンアップ後のサンプルは、クリーンアップを実施していないサンプルと同等のバックグラウンドを示しただけではなく、リテ

ンジョンタイムウィンドウ 3 ~ 7 分でバックグラウンドに影響を与える追加の大幅な夾雑も示しました。これは、サンプルクリーンアップ時に汚染物が混入したことを示しています。結果から明らかにわかるのは、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップは既存

の dSPE クリーンアップ製品と比較して、高効率のマトリックスクリーンアップを実現したということです。特に、ベンダー 1 の dSPE クリーンアップは、マトリックス/色素除去に対して最も不良な性能を示しました。

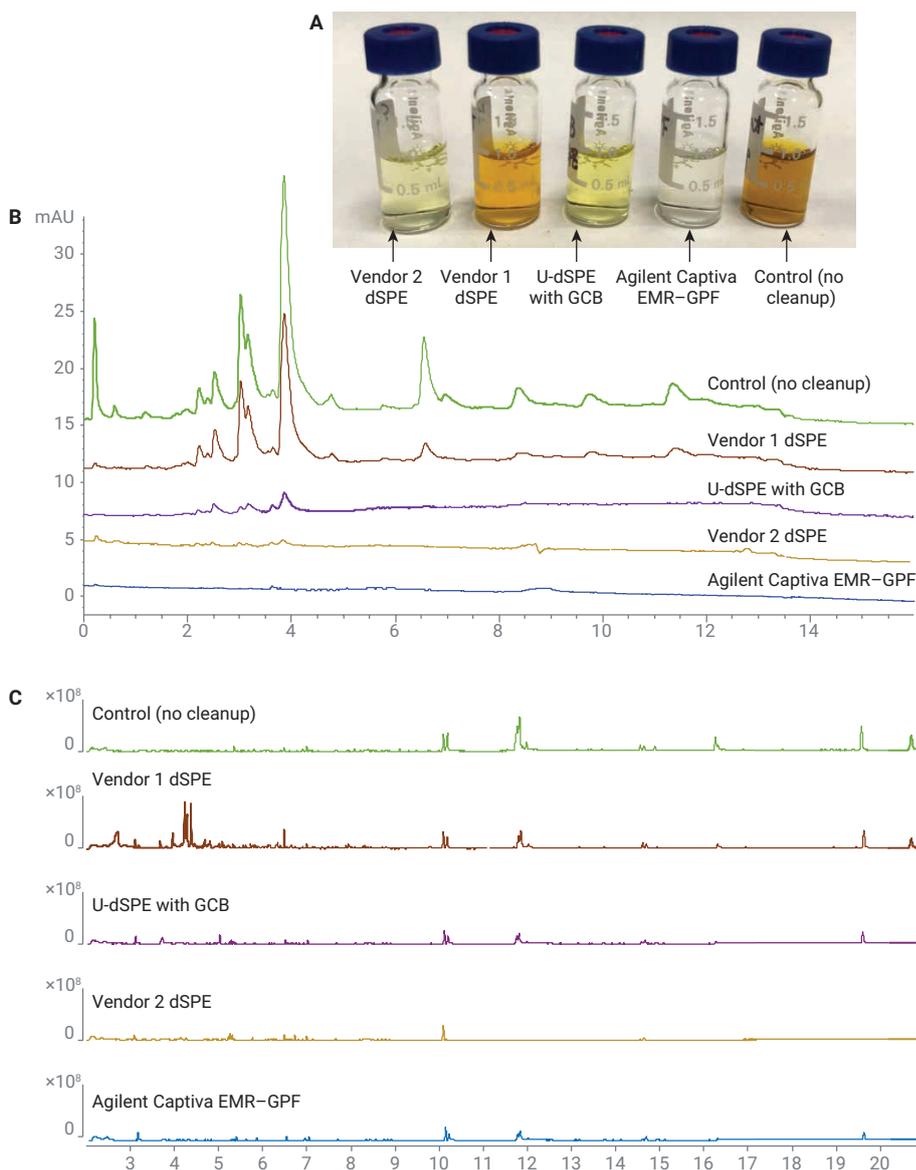


図 3. 混合ピーマンマトリックスサンプルのクリーン度の評価。(A) 抽出したサンプルの色の比較。(B) サンプルの UV 吸収の LC-UV ($\lambda = 450 \text{ nm}$) クロマトグラムの重ね表示。(C) GC/MS フルスキャンバックグラウンドのクロマトグラム

成分の回収率と再現性

成分の回収率と再現性は、サンプル前処理メソッドが許容できるものであるかどうかを判別する際の主な考慮事項です。マトリックスクリーンアップの効率は高いことが望ましいですが、ターゲット回収率を大幅に損なう場合は許容できません。したがって、230 種類の LC および GC で検査可能な農薬を含む多数の農薬を使用して、ターゲット回収率に対してサンプルクリーンアップが与える影響について、開発したメソッドを詳細に評価しました。回収率の実験では 10 ng/g のスパイクレベルを使用しました。これは、生鮮食品では通

常、この濃度が農薬の規制上の最大残留基準値 (MRL) を下回っているためです。さらに、低濃度分析では高濃度分析よりも、メソッドの性能が要求されます。図 4A に、4 種類のクリーンアップメソッドを使用した、10 ng/g の添加レベルでの 230 種類のターゲットの平均回収率の分布をまとめて示します。Agilent Captiva EMR-GPF クリーンアップは、ターゲット回収率の不合格率が最も低い最適なクリーンアップメソッドであることが実証されましたが、他の 3 種類のクリーンアップメソッドでは、回収率の不合格率が高くなっていました。ベンダー 1 の dSPE クリーンアップは

2 番目に良好な回収率の結果を示しており、不合格率は約 5 % ですが、サンプルマトリックスクリーンアップの効率が低下していました。ベンダー 2 の dSPE と GCB が含まれる U-dSPE クリーンアップはともに、マトリックスクリーンアップの効率が許容できるものでしたが、ターゲット回収率を大幅に損ないました。

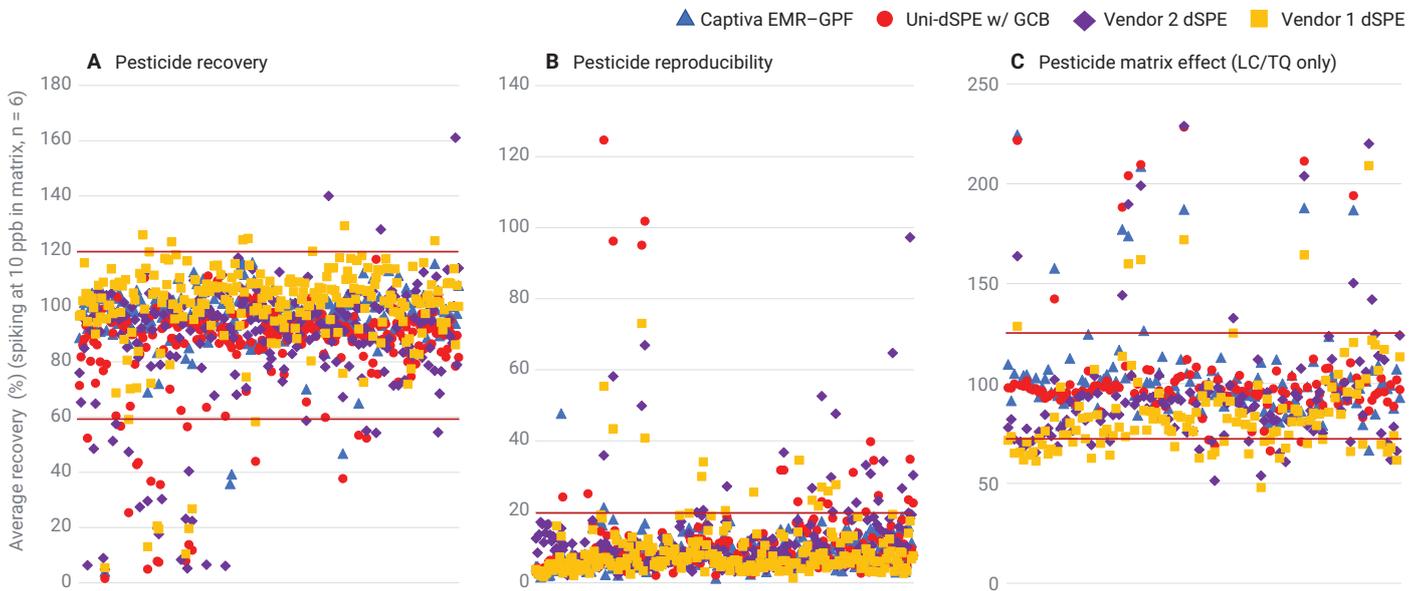


図 4. さまざまなクリーンアップメソッドを使用した際の (A) ターゲット回収率、(B) ターゲットの再現性 (RSD%)、(C) マトリックス効果 (LC/TQ のみ) に基づいた、10 ng/g の添加レベルでの混合ピーマン中の 230 種類の農薬の定量分析 (n = 6)。ターゲットの詳細については、表 3 を参照してください。

平面構造を持つ農薬、酸性農薬、その他の影響を受けやすい化合物などの影響を受けやすい農薬は、サンプルクリーンアップ時に損失する可能性があります。これは、これらの化合物とマトリックスクリーンアップに使用する充填剤の間で、不要な相互作用が発生するためです。図 5 は、4 種類のクリーンアップメソッド後の影響を受けやすい化合物の個別の回収率を比較したものです。この結果から、GCB が含まれる U-dSPE とベンダー 2 の dSPE では、平面構造を持つ農薬、酸性農薬、弱酸性農薬、弱塩基性農薬が大幅に損失したことがわかります。ベンダー 1 の dSPE は、平面構造を持つ農薬に対して良好な回収率を示していますが、酸性および塩基性農薬が大幅に損失していました。比較してみると、Agilent Captiva EMR-GPF では、これらの影響を受けやすい農薬の回収率が大幅に向上していました。

サンプル前処理メソッドの許容可能性に関しては、メソッドの再現性が別の重要な考慮事項です。通常、再現性の低下は、ターゲットと充填剤の間の相互作用に一貫性がないこと、またはターゲットのレスポンスに対するマトリックスの影響に一貫性がないことに関係してい

ます。一般に、3~6 回の繰り返し分析によるメソッドの再現性の評価には成分の相対標準偏差 (RSD) が使用され、 $RSD\% \leq 20$ が許容基準です。図 4B に、10 ng/g のスパイクレベルで添加したピーマンの 6 回の繰り返し分析における、230 種類のターゲット農薬の RSD をまとめて示します。結果から、Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップが、最高のメソッド再現性を示していることが再度実証されました

メソッドの性能に対するマトリックスの影響

メソッドの性能に対するサンプルマトリックスの影響について、LC/MS/MS でのマトリックス効果および GC/MS/MS でのマトリックス干渉に基づいて評価しました。通常、LC/MS/MS でのマトリックス効果 (ME) の原因になるのは、ターゲットのレスポンスを抑制または促進するマトリックス共溶出干渉です。通常 ME は、対応する濃度における純粋な標準での成分のレスポンスに対する、マトリックス適合スパイクサンプルでの成分のレスポンスの比により算出します。ME が 100% に近づくほど、ターゲット分析に対するサンプルマトリックスからの影響が小さくなりま

す。マトリックス効果に対する厳格な許容基準がない場合でも、メソッド定量の信頼性に関してサンプルマトリックスのクリーン度の影響を評価することが重要になります。図 4C は、LC で検査可能な 129 種類の農薬を使用して、さまざまなクリーンアップメソッドにより前処理したサンプルの ME を比較したものです。Agilent Captiva EMR-GPF パススルークリーンアップ、GCB が含まれる U-dSPE、およびベンダー 2 の dSPE クリーンアップで得られたマトリックスクリーンアップの効率は高く、概して良好なマトリックス効果の結果を達成しました。数種類の農薬では大幅なマトリックス向上を示しましたが、これはほとんど、サンプルマトリックスブランクからの陽性的影響が原因でした。ベンダー 1 の dSPE クリーンアップで前処理されたサンプルのマトリックスクリーンアップの効率が低下していたことを考えると、多数の成分でマトリックスによるイオン抑制が大きかったことは驚くことではありません。

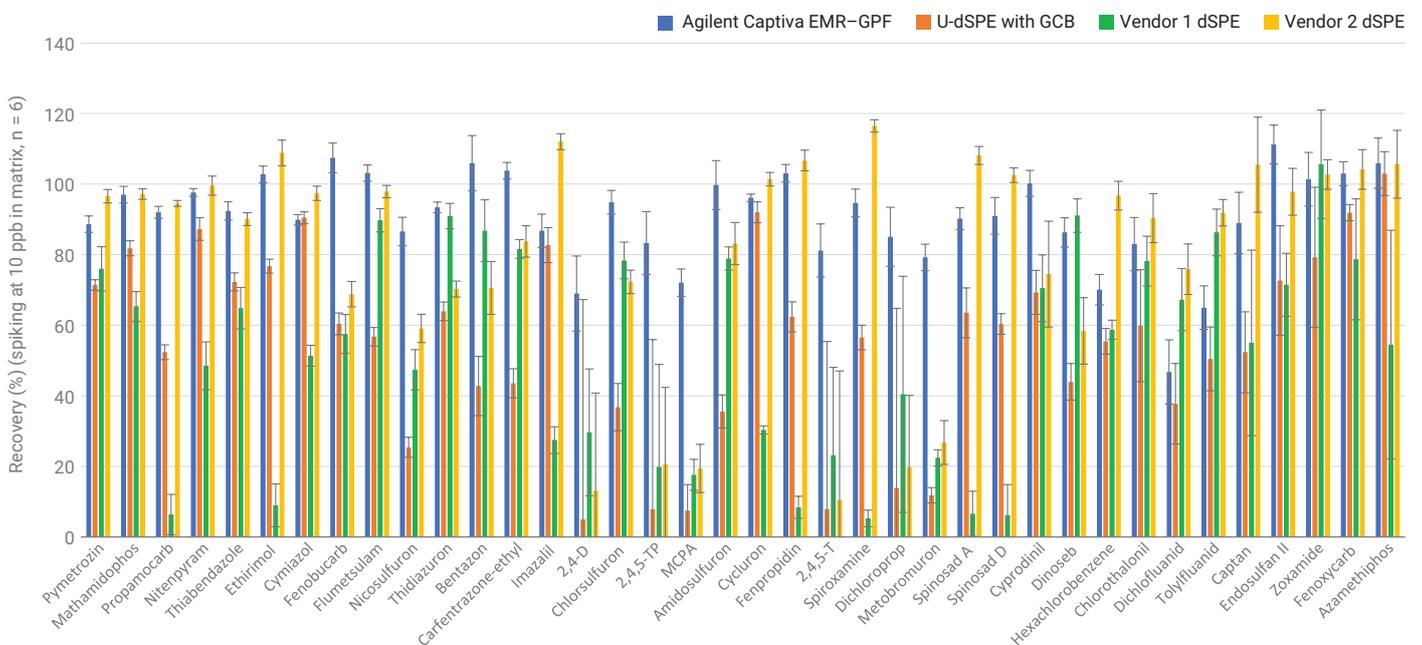


図 5. さまざまなクリーンアップメソッド間で比較した、マトリックスの 10 ng/g の添加レベルでの混合ピーマン中の影響を受けやすい農薬の回収率 (n = 6)

GC/MS/MS 分析に対するマトリックスの影響は、ターゲットの取り込みウィンドウに示されているマトリックス干渉として表されます。GC/MS/MS のイオン化の特性を考えると、ターゲットの MRM トランジションは、LC/MS/MS の場合ほど選択的ではありません。そのため、複雑なサンプルマトリックスで効率的なクリーンアップを実施しない場合、サンプルバックグラウンドが示すマトリックス干渉のピークにより、積分の精度に大幅に影響

を与えることがあるのは非常に一般的なことです。図 6 は、さまざまなクリーンアップメソッドを使用して、10 ng/mL でポストスパイクしたマトリックスサンプルの MRM クロマトグラムを比較したものです。特定の比較例として、1 種類の農薬（モリネート）を抽出しました。比較結果は、Agilent Captiva EMR-GPF クリーンアップにより得られたよりクリーンな成分バックグラウンド、および最終的な成分の積分精度を明確に示しています。

ターゲット分析の不合格率

多数の農薬のマルチクラスの多成分残留分析では、すべてのターゲットが厳格な許容基準に適合しているという完璧なメソッドを実現することは非現実的です。許容可能な定量、マトリックスのクリーン度、および検出機器に対する影響のバランスを保つためには、必ず妥協点が必要になります。最適なバランスとは、妥協を最小限に抑えながら、常に大部分のターゲットに対して目的の定量結果を達成することです。

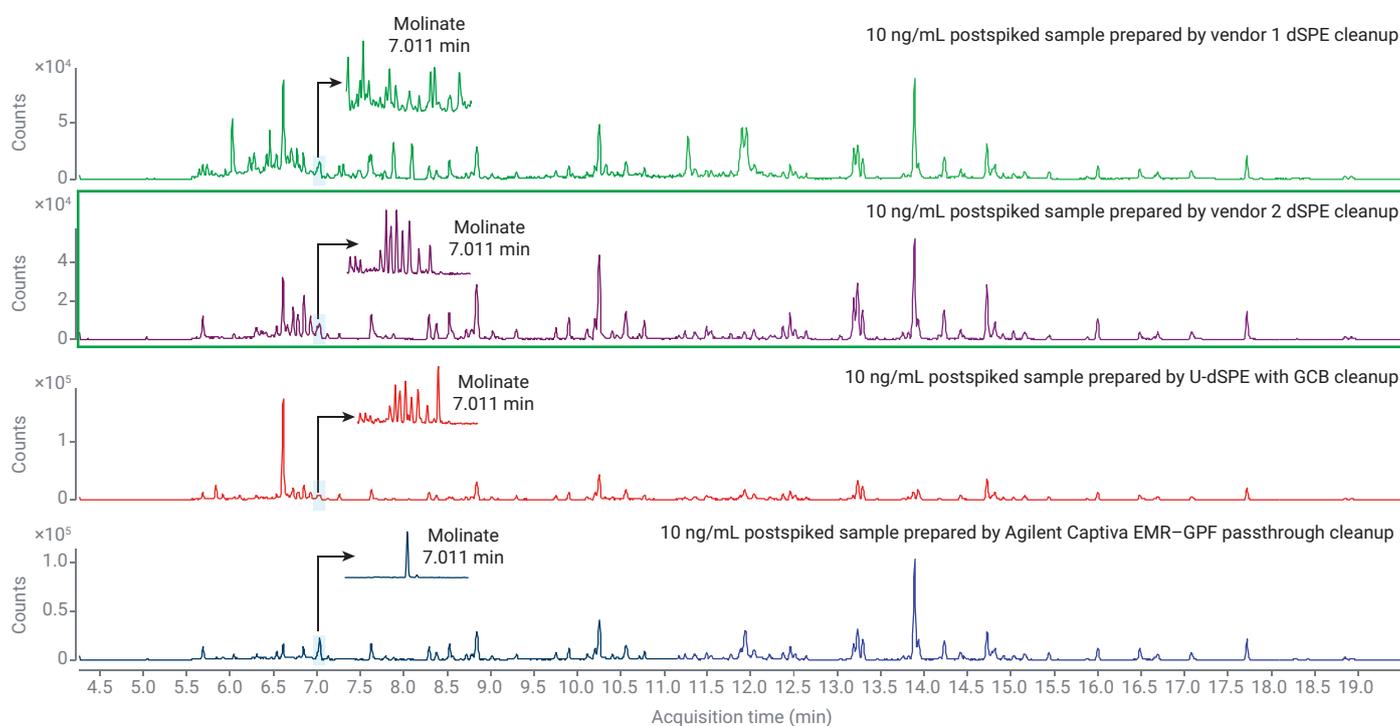


図 6. 10 ng/mL でポストスパイクした抽出済みピーマンサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラム。拡大したクロマトグラムは、1.5 分の取り込みウィンドウでのモリネートの MRM クロマトグラムを示しています。

図 7 に、定量分析における回収率、再現性、およびマトリックス効果の許容基準に基づいた、230 種類のターゲットの不合格率を示します。結果から、他のクリーンアップメソッドと比較して、従来の QuEChERS 抽出の後に新しく開発した Agilent Captiva EMR-GPF パスルークリーンアップを使用した際に、多数の農薬の定量分析で不合格率が最低であったことを確認しました。

メソッド定量の検証

10 ng/g および 100 ng/g の 2 つの濃度でプレスパイクした QC に対して、QuEChERS 抽出の後に Agilent Captiva EMR-GPF パスルークリーンアップを使用して、混合ピーマンでのメソッド定量の性能を検証しました。LC/MS/MS で 0.5 ~ 500 ng/g、GC/MS/MS で 1 ~ 500 ng/g のダイナミックレンジに対応するために、9 種類のマトリックス適合標準溶液を前処理しました。直線回帰と $1/x^2$ の重み付けを使用して、検量線を生成しました。GC/MS/MS における定量では、3 種類の IS (アトラジン-D₅、DDT-D₈、および TPP) を 100 ng/g で使用しました。同様に、LC/MS/MS における定量では、2 種類の IS (4-ニトロフェノール-D₄ およびシマジン-D₁₀) を 50 ng/g で使用しました。ターゲット定量の真度と精度 (RSD) および検量線の直線性の結果を、図 8 に統計的にまとめて示します。次に示す農薬は外れ値を示しました。キンメラック、ピフェナゼート、ジクロフルアニドは回収率が低かったため、キンメラック、2,4-D は RSD が高かったため、ジメトモルフ、スピノサド、プロクロラズ、モキシデクテン、メトリブジン、マラチオン、トリアジメホン、ゾキサミド、アザメチホス、クマホス、ピラクロストロピンは検量線の R² が 0.98 ~ 0.99 の間であったためです。

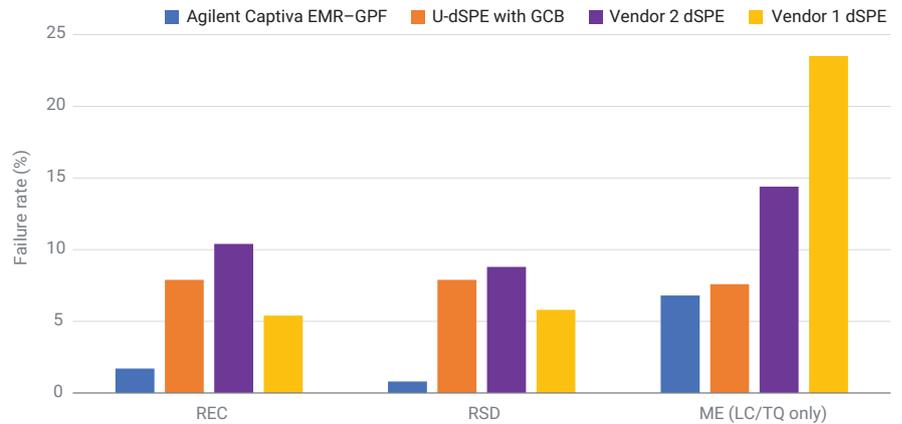


図 7. さまざまなメソッド間で比較した、多数のマルチクラスの多成分残留農薬 (230 種類の化合物) の不合格率。許容基準は、回収率については 60 ~ 120 %、RSD については ≤ 20 %、LC/MS/MS でのマトリックス効果 (ME) については 70 ~ 130 % です。

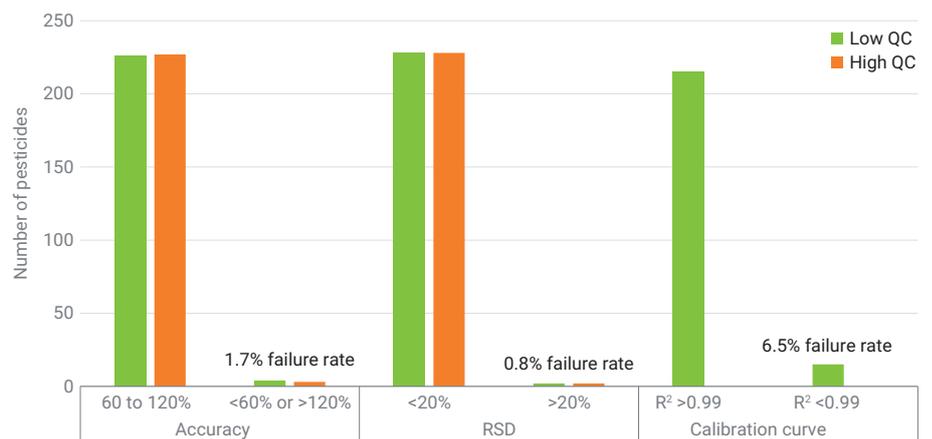


図 8. LC/MS/MS および GC/MS/MS による混合ピーマン中の 230 種類の農薬の定量に関するメソッド検証結果のまとめ。サンプルは、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットの後に Agilent Captiva EMR-GPF パスルークリーンアップを使用して前処理しました。

結論

混合ピーマン中の 230 種類の LC および GC で検査可能な農薬について、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットの後に Agilent Captiva EMR-LPD カートリッジによるパススルークリーンアップを使用した LC/MS/MS と GC/MS/MS による、シンプルで高速かつ信頼性の高いメソッドを開発して検証しました。この新しいメソッドは、従来の GCB が含まれる dSPE クリーンアップおよび 2 種類の他のベンダーの dSPE クリーンアップと比較して、便利でシンプルなサンプルパススルークリーンアップを実現しています。またこのメソッドは、選択的で効率的な色素/マトリックス除去、高いターゲット回収率と再現性、およびマトリックス効果と干渉の低減を実現しています。結果は、生鮮食品マトリックス中の多数の農薬の分析において、高い定量合格率を示しています。

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. Zhao, L. *et al. Multiclass Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Meat using Enhanced Matrix Removal Lipid Cleanup and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. J. Chromatog.A* **2018**, 1549, 14–24.
4. Lucas D.; Zhao L. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップおよび LC/MS/MS を用いたチーズ中の複数の種類のマイコトキシンの分析, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-8694JAJP, **2017**.
5. 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**.
6. Zhao L.; Wei T. スプリングリーフミックス中のマルチクラス、多成分残留農薬の測定 - Captiva EMR-HCF パススルークリーンアップと LC/MS/MS の利用, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4765JAJP, **2022**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE21688961

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

5994-4767JAJP