

オリーブ中のマイコトキシンおよび 農薬の測定

Agilent Captiva EMR-Lipid と Agilent Ultivo トリプル四重極
LC/MS によるサンプル前処理

著者

Marlos Eduardo Zorzella
Fontana, Barbara Reichert,
Rosselei Cael da Silva, and
Ionara Regina Pizzutti
Universidade Federal de
Santa Maria,
Departamento de Química,
Centro de Pesquisa e Análise
de Resíduos e Contaminantes
(CEPARC)
Santa Maria-RS, Brazil

Mariana Baptistão and
Andrea Rezemini
Agilent Technologies, Inc.
Barueri-SP, Brazil

概要

このアプリケーションノートでは、オリーブ中のマイコトキシンと農薬を同時測定するための分析メソッドについて説明します。サンプル前処理メソッドは、QuEChERS 抽出後の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ、および Agilent 1260 Infinity II Prime LC と Ultivo トリプル四重極 MS (LC/MS/MS) を Agilent Jet Stream イオン源 (AJS) と組み合わせて使用した分析をベースにしています。Agilent MassHunter Optimizer ソフトウェアを使用して、化合物トランジションと最適化パラメータを開発しました。Captiva EMR-Lipid は、オリーブ中のマトリックス干渉を高効率で除去し、低濃度で各種成分を検出することができます。71 種類の農薬と 6 種類のマイコトキシンを合わせて 14 分の分析で同時測定しました。このメソッドは、オリーブ中の農薬とマイコトキシンの抽出および測定に適しており、オリーブのスクリーニングまたはモニタリング試験向けのルーチン分析に導入することを推奨できます。

はじめに

オリーブとオリーブ油の摂取は、その抗腫瘍および抗炎症作用により、健康に有益な効果をもたらすと考えられています。¹ オリーブ油は一価不飽和脂肪酸を豊富に含んでおり、興味深い生理学的性質を持つ独自のフェノールプロファイルを備えています。

オリーブの木は、他の作物と同様に、害虫、疾患、雑草の影響を受け、生産量が減少する場合があります。マイコトキシン産生菌もオリーブを腐食させ、マイコトキシンにより穀物が汚染される場合があります。このような毒物は、ヒトや家畜に健康被害をもたらす可能性があり、急性中毒に加えて、免疫不全、がんといった長期的悪影響を引き起こします。² 世界で収穫された穀物のほぼ 25 % がマイコトキシンによって被害を受けており、これにより農業および工業分野において、年間に何十億ドルもの重大な損失が発生しています。³ マイコトキシンのような毒物は、その化学的および熱的安定性により、調理や油炒めのような食品加工に耐えることができます。大部分のマイコトキシンは脂溶性であるため、体脂肪中に蓄積しやすく、体内から排出させるのは困難です。⁴ 農業は果実を保護するために、生産、保管、輸送中にオリーブの木やオリーブによく使用されています。このため、EU などの多くの国では、オリーブに対して最大残留レベル (MRL) を規定しており、商品としてのオリーブ中の農業の MRL が設定されています。⁵ そのため、オリーブ中の農業とマイコトキシンの測定では、信頼性の高い分析メソッドが不可欠になっています。

実験方法

材料および試薬

アセトニトリル (ACN、農業グレード)、ギ酸 (99.8 %)、HPLC グレードの酢酸は J.T. Baker (フィリップスバーグ、米国) から購入しました。純水は、Milli Q Gradient 超純水製造装置 (Millipore、ミルフォード、米国) で作成しました。試薬グレードの酢酸ナトリウムは J.T. Baker (ハロストック、メキシコ) から購入しました。

農業の標準試薬 (純度 > 97 %) は Dr. Ehrenstorfer (アウクスブルク、ドイツ) から入手しました。マイコトキシン標準は Fermentek Biotechnology (エルサレム、イスラエル) および Sigma-Aldrich (シュタインハイム、ドイツ) から購入しました。

溶液および標準試料

農業の個別標準原液およびすべての農業の混合液を、1 mg/L の ACN 溶液で作成しました。農業は、グループ 1 として分類しています。

マイコトキシンを、LC/MS/MS システムにおける感度に従って 2 グループに分けました。アフラトキシン B1、B2、G1、G2 を含むグループ 2 標準を、1 µg/mL の ACN 溶液として作成しました。シトリニン、ゼアラレノンを含むグループ 3 標準を、50 µg/mL の ACN 溶液として作成しました。

前処理内部標準 (PIS) と機器内部標準 (IIS) を使用しました。PIS をサンプルにスパイクしてから抽出し、IIS を最終希釈溶媒 (ACN:水、1:1) に添加しました。1,000 µg/L のプロポキスルを含む PIS を ACN 溶液で作成し、12.5 µg/L のキナルホスを含む IIS を ACN 溶液として作成しました。溶液を ≤ -18 °C の冷凍庫に保管しました。

機器および消耗品

- 電子天びん (Sartorius、ドイツ)
- 振とう機 3016 (GFL、ドイツ)
- ボルテックスジェニー 2 (Scientific Industries、米国)
- Heraeus Varifugue 遠心分離機 (Thermo Fisher Scientific、ドイツ)
- 超純水 (18 MΩ cm)、Milli-Q システム (Millipore、ミルフォード、米国)
- Agilent コレクションラックとファンネルセット、16 × 100 mm 試験管用、Vac Elut 24 マニホールド用 (部品番号 12234028)
- さまざまな容量の自動ピペット (Eppendorf、米国)
- Agilent QuEChERS 抽出キット、AOAC (部品番号 5982-5755CH)
- Agilent QuEChERS 抽出キット、オリジナル (部品番号 5982-5550CH)
- Agilent QuEChERS 抽出キット、EN (部品番号 5982-5650CH)
- Agilent セラミックホモジナイザ、50 mL チューブ (部品番号 5982-9313)
- Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ、3 mL、300 mg (部品番号 5190-1003)
- Agilent バイアル、スクリュートップ、透明、認定、2 mL (部品番号 5182-0714)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18、100 × 3 mm、2.7 µm (部品番号 685975-302)
- Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18、2.1 mm、2.7 µm、UHPLC ガード (部品番号 821725-928)

分析条件

InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 カラムをUHPLC ガードに接続し、Agilent 1290 Infinity II LC システムに取り付けて、クロマトグラフィー分離を実施しました。

AJS エレクトロスプレーイオン源を搭載した Agilent Ultivo 質量分析計を、ダイナミック MRM (dMRM) モードで動作させました。データの取り込みと処理はすべて、Agilent MassHunter ソフトウェア、バージョン 12 で行いました。LC/MS/MS システムの使用条件とパラメータを表 1 に示します。ターゲット化合物のリテンションタイム、MRM トランジション、コリジョンエネルギーを表 2 に示します。

表 1. LC/MS/MS 条件

| | パラメータ | 設定値 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------|--|--------|----|----|---|----|----|---|----|----|---|----|----|------|----|----|----|---|----|----|---|----|----|----|----|
| LC | カラム | Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 100 mm、2.7 μm UHPLC ガード：Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 5 mm、2.7 μm | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | カラム温度 | 45 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 注入量 | 2 μL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 移動相 A | 0.1 % ギ酸水溶液 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 移動相 B | 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | グラジエントプログラム | <table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>5</td><td>80</td><td>20</td></tr> <tr><td>9</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>9.25</td><td>10</td><td>90</td></tr> <tr><td>11</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>13</td><td>5</td><td>95</td></tr> <tr><td>14</td><td>80</td><td>20</td></tr> </tbody> </table> | 時間 (分) | %A | %B | 0 | 80 | 20 | 5 | 80 | 20 | 9 | 10 | 90 | 9.25 | 10 | 90 | 11 | 5 | 95 | 13 | 5 | 95 | 14 | 80 | 20 |
| | 時間 (分) | %A | %B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 0 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 5 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 9 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9.25 | 10 | 90 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 5 | 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 5 | 95 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 80 | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 分析後 | 1 分 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流量 | 300 μL/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 合計分析時間 | 15 分 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MS | イオン化モード | 陽性 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | スキャンタイプ | ダイナミック MRM | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | MS1/MS2 分解能 | Unit/Unit | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ガス温度 | 11 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ガス流量 | 250 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | シーガス流量 | 12 L/min | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | シーガス温度 | 350 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | キャピラリー電圧 | 3,845 V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

表 2. ターゲット化合物、リテンションタイム、MRM トランジション、およびコリジョンエネルギー

| 分析対象物 | RT (分) | トランジション | | | |
|-------------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | | 定量 MRM トランジション (m/z) | CE (V) | 定性 MRM トランジション (m/z) | CE (V) |
| アセフェート | 1.64 | 184 -> 49.1 | 20 | 184 -> 143 | 5 |
| アセトクロール | 8.05 | 270.1 -> 148.1 | 17 | 270.1 -> 224.2 | 9 |
| アフラトキシン B1 | 5.84 | 313.1 -> 128.2 | 89 | 313.1 -> 241.2 | 41 |
| アフラトキシン B2 | 5.55 | 315.1 -> 77.2 | 117 | 315.1 -> 287 | 29 |
| アフラトキシン G1 | 5.83 | 329.1 -> 115 | 89 | 329.1 -> 213.8 | 41 |
| アフラトキシン G2 | 5.03 | 331.1 -> 201 | 41 | 331.1 -> 245.1 | 33 |
| アルジカルブスルホン | 1.86 | 240.1 -> 58.1 | 37 | 240.1 -> 63.1 | 37 |
| アジンホスメチル | 7.32 | 318 -> 125 | 24 | 318 -> 260.9 | 4 |
| アゾキシストロピン | 7.49 | 404.1 -> 329.1 | 32 | 404.1 -> 372.1 | 8 |
| ピテルタノール | 7.92 | 338.2 -> 99.1 | 10 | 338.2 -> 269.3 | 4 |
| ボスカリド | 7.76 | 316.1 -> 165 | 29 | 316.1 -> 247.1 | 17 |
| ブロムコナゾール II | 7.55 | 376 -> 122.8 | 81 | 376 -> 158.8 | 41 |
| ピリメート | 7.14 | 317.2 -> 166.1 | 33 | 317.2 -> 210.2 | 20 |
| ブプロフェジン | 8.54 | 306.2 -> 116.1 | 10 | 306.2 -> 201.1 | 5 |
| カズサホス | 8.61 | 271.1 -> 130.7 | 21 | 271.1 -> 158.9 | 12 |
| カルバリル | 6.44 | 202.1 -> 127.1 | 28 | 202.1 -> 145.1 | 4 |
| クロルフェンピホス | 8.16 | 358.9 -> 99.2 | 28 | 358.9 -> 155 | 8 |
| シトリニン | 6.89 | 251.1 -> 90.9 | 61 | 251.1 -> 115 | 69 |
| シアゾファミド | 8.13 | 325 -> 108 | 8 | 325 -> 261 | 4 |

| 分析対象物 | RT (分) | トランジション | | | |
|------------------|-----------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|
| | | 定量 MRM トランジション (m/z) | CE (V) | 定性 MRM トランジション (m/z) | CE (V) |
| ダイアジノン (ジムピラート) | 8.58 | 305.1 -> 97 | 40 | 305.1 -> 169.1 | 32 |
| ジエトフェンカルブ | 7.39 | 268.2 -> 124 | 30 | 268.2 -> 226.1 | 0 |
| ジメトエート | 3.58 | 230 -> 125 | 16 | 230 -> 198.8 | 0 |
| ジメトモルフ (E) | 7.17 | 388.1 -> 273.1 | 32 | 388.1 -> 301 | 24 |
| ジニコナゾール | 8.13 | 326.1 -> 70 | 25 | 326.1 -> 159 | 28 |
| ジウロン | 6.65 | 233 -> 72 | 20 | 233 -> 160.1 | 29 |
| エチオン | 9.33 | 385 -> 142.8 | 24 | 385 -> 199 | 12 |
| エチリモール | 1.66 | 210.2 -> 98 | 32 | 210.2 -> 140.1 | 20 |
| エトプロホス | 7.77 | 243.1 -> 97 | 30 | 243.1 -> 130.9 | 15 |
| エトキサゾール | 9.62 | 360.2 -> 113 | 60 | 360.2 -> 141 | 32 |
| フェンアミドン | 7.53 | 312 -> 92.2 | 28 | 312 -> 236.2 | 8 |
| フェナザキン | 10.4 | 307.2 -> 147.1 | 16 | 307.2 -> 161.1 | 10 |
| フェンブコナゾール | 7.77 | 337.1 -> 70 | 33 | 337.1 -> 125.1 | 40 |
| フェンヘキサミド | 7.64 | 302.1 -> 55.1 | 40 | 302.1 -> 97.1 | 20 |
| フェンプロビモルフ | 6.16 | 304.3 -> 132 | 40 | 304.3 -> 147 | 28 |
| フェンピロキシメート | 9.71 | 422.2 -> 107 | 64 | 422.2 -> 366.2 | 12 |
| フルフェノクスロン | 9.08 | 489 -> 140.9 | 56 | 489 -> 158 | 20 |
| フルキンコナゾール | 7.70 | 376 -> 272.2 | 40 | 376 -> 348.9 | 21 |
| フルシラゾール | 7.76 | 316.1 -> 165 | 24 | 316.1 -> 247.1 | 12 |
| フルトラニル | 7.85 | 324.1 -> 92.9 | 37 | 324.1 -> 144.9 | 65 |
| フルトリアホル | 6.37 | 302.1 -> 108.9 | 40 | 302.1 -> 122.9 | 33 |
| ハロキシホップ2-エトキシエチル | 8.84 | 434.1 -> 90.8 | 45 | 434.1 -> 316.1 | 17 |
| ヘキサコナゾール | 7.97 | 314.1 -> 124.8 | 40 | 314.1 -> 159 | 30 |
| ヘキシチアゾックス | 9.47 | 353.1 -> 168.1 | 24 | 353.1 -> 227.9 | 8 |
| イミダクロプリド | 3.50 | 256 -> 175 | 12 | 256 -> 208.9 | 12 |
| イプロバリカルブ | 7.44 | 321.2 -> 115.9 | 17 | 321.2 -> 203.1 | 5 |
| リニユロン | 7.39 | 249 -> 160.1 | 20 | 249 -> 182 | 17 |
| メカルバム | 8.10 | 330 -> 97.1 | 45 | 330 -> 227 | 15 |
| メバニプリム | 7.8 | 224.1 -> 192.1 | 29 | 224.1 -> 207.9 | 17 |
| メタミドホス | 1.62 | 142 -> 94 | 10 | 142 -> 125 | 10 |
| メソミル | 2.05 | 163.1 -> 88 | 0 | 163.1 -> 106 | 4 |
| モノクロトホス | 1.70 | 224.1 -> 127 | 10 | 224.1 -> 193 | 0 |
| ミクロブタニル | 7.52 | 289.1 -> 70.1 | 16 | 289.1 -> 125.1 | 32 |
| オメトエート | 1.63 | 214 -> 109 | 24 | 214 -> 125 | 16 |
| オキサジキシル | 5.62 | 279.1 -> 132.3 | 32 | 279.1 -> 219.2 | 5 |
| オキサミル | 1.82 | 237.1 -> 72 | 12 | 237.1 -> 220.1 | 0 |
| パクロブトラゾール | 7.16 | 294.1 -> 70.1 | 16 | 294.1 -> 125.2 | 36 |
| ペンコナゾール | 8.07 | 284.1 -> 70.1 | 15 | 284.1 -> 158.9 | 37 |
| ホサロン | 8.59 | 368 -> 110.9 | 44 | 368 -> 182 | 8 |
| ピコキシストロピン | 8.22 | 368.1 -> 145 | 20 | 368.1 -> 205.2 | 4 |
| ピラゾホス | 8.46 | 374.1 -> 194.1 | 37 | 374.1 -> 222.2 | 21 |
| ピリミホスメチル | 8.59 | 306.2 -> 108.1 | 30 | 306.2 -> 164.1 | 20 |
| プロフェノホス | 8.91 | 373 -> 302.9 | 17 | 373 -> 344.8 | 9 |
| プロバルギット | 9.58 | 368.1 -> 175.2 | 8 | 368.1 -> 231.2 | 0 |
| プロファム | 6.99 | 180.1 -> 120 | 12 | 180.1 -> 138.1 | 4 |
| プロビコナゾール | 8.18 | 342.1 -> 123 | 60 | 342.1 -> 159 | 32 |

抽出手順の最適化

5通りの予備実験（図1）を実施し、メソッドの真度、精度、マトリックスのクリーンアップ度を評価しました。すべての試験において、農薬とマイコトキシンに対して同時に、オリーブペーストサンプルを2つの濃度でスパイクしました（n = 3）。

| 分析対象物 | RT (分) | トランジション | | | |
|----------|--------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | | 定量 MRM トランジション (m/z) | CE (V) | 定性 MRM トランジション (m/z) | CE (V) |
| プロピザミド | 7.68 | 256 -> 172.9 | 21 | 256 -> 190 | 15 |
| ピリダベン | 10.20 | 365.1 -> 147.2 | 20 | 365.1 -> 309.1 | 4 |
| シマジン | 5.76 | 202.1 -> 104 | 30 | 202.1 -> 132 | 17 |
| スピロキサミン | 6.20 | 298.3 -> 100.1 | 32 | 298.3 -> 144.1 | 16 |
| テブフェノジド | 9.06 | 334.2 -> 145 | 37 | 334.2 -> 147.1 | 24 |
| テブフェンピラド | 8.09 | 353.2 -> 133 | 16 | 353.2 -> 297.1 | 0 |
| チアベンダゾール | 1.64 | 202 -> 65 | 52 | 202 -> 175 | 24 |
| チオジカルブ | 6.04 | 355.1 -> 88.1 | 8 | 355.1 -> 108.1 | 8 |
| トリアジメホン | 7.64 | 294.1 -> 197.2 | 8 | 294.1 -> 225.1 | 20 |
| トリアソホス | 7.88 | 314.1 -> 118.9 | 37 | 314.1 -> 162 | 17 |
| トリチコナゾール | 7.32 | 318.1 -> 69.9 | 17 | 318.1 -> 124.9 | 40 |
| ゼアラレノン | 7.33 | 319.2 -> 127.8 | 65 | 319.2 -> 301.2 | 5 |

試験 A と B

QuEChERS EN

試験 A : 5 g のサンプル (オリーブ) または
試験 B : 5 g のサンプル (オリーブ) + 5 g の水

10 mL の ACN 0.1 % 酢酸

EN メソッド用の QuEChERS
抽出塩パッケージを添加

0.6 mL の水と 2.4 mL の抽出物の混合液を
Captiva EMR-Lipid カートリッジに通過

0.5 mL の溶出液 + 0.5 mL の 1:1 ACN:H₂O

LC/MS/MS で分析

試験 C

QuEChERS オリジナル

試験 C : 10 g のサンプル

10 mL の ACN 0.1 % 酢酸

オリジナルメソッド用の QuEChERS
抽出塩パッケージを添加

0.6 mL の水と 2.4 mL の抽出物の混合液を
Captiva EMR-Lipid カートリッジに通過

0.5 mL の溶出液 + 0.5 mL の 1:1 ACN:H₂O

LC/MS/MS で分析

試験 D と E

QuEChERS AOAC

10 g のサンプル (オリーブ)

10 mL の ACN 0.1 % 酢酸

AOAC メソッド用の QuEChERS
抽出塩パッケージを添加

試験 D : 上層をチューブに移し、
液体窒素中に 90 秒間浸漬

試験 E : 上層をチューブに移し、2 時間冷凍

0.6 mL の水と 2.4 mL の抽出物の混合液を
Captiva EMR-Lipid カートリッジに通過

0.5 mL の溶出液 + 0.5 mL の 1:1 ACN:H₂O

LC/MS/MS で分析

図 1. 予備抽出プロトコルのスキーム

最終抽出手順 (図 2)

1. 10 ±0.05 g のオリーブサンプルを計量し、50 mL 遠心管に入れる。
2. 4 つのスパイクレベルでスパイクした後 10 ng/kg の PIS をスパイクし、しっかりとキャップをしてボルテックスし、約 15 分間平衡化させる。
3. 10 mL の酢酸 1 % 含有アセトニトリルを添加し、4 分間振とうする。
4. Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットを添加し、1 分間振とうする。
5. 4,000 rpm で 5 分間遠心分離。
6. 上層を 15 mL チューブに移し、チューブを液体 N₂ 中に 90 秒間置く。
7. 2.4 mL の上澄みを新しいチューブに移す。0.6 mL の水を混合物に静かに添加した後、サンプル混合物を Captiva EMR-Lipid カートリッジ、3 mL、300 mg にロードして、自然落下させる。
8. 0.5 mL の溶出液をバイアルに移してから、0.5 mL の ACN:H₂O (1:1、v.v) で希釈する。

サンプル前処理



オリーブを粉碎

10 g のサンプル

サンプル抽出

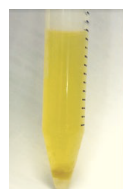


Agilent QuEChERS
抽出キット

振とう機

遠心分離

クリーンアップ



液体窒素中に
90 秒間

Agilent Captiva EMR-Lipid
カートリッジ、3 mL、300 mg

LC/MS/MS



Agilent 1290 Infinity II LC と
Ultivo トリプル四重極 LC/MS

図 2. オリーブ中の農薬とマイコトキシンを抽出するためのサンプル前処理手順

結果と考察

LC/MS/MS メソッドの開発

成分ごとに、MRM トランジション、フラグメント電圧、コリジョンエネルギー、および最もアバンドンスが高いイオンを、MassHunter Optimizer ソフトウェアとフローインジェクションにより最適化しました。抽出イオンクロマトグラムにおける両方のプロダクトイオンの成分ピークは完全にオーバーラップし、サンプル抽出物のイオン比は、同じシーケンスでの標準溶液の平均値の ±30 % (相対値) 以内に収まっていた。

サンプル前処理の最適化

5 通りの試験から得られたクロマトグラフィープロファイルも、最適な QuEChERS アプローチの選択に対して評価しました。異なるメソッドで前処理したサンプルのマトリックス効果を調査するために、最終マトリックスブランク抽出物に 50 ng/mL の標準をポストスパイクして、全体的な TIC ピーク強度を比較しました。図 3 に示すように、メソッド D と E で前処理したサンプルの TIC クロマトグラムは全体的に、メソッド A、B、C と比較して、極性および非極性ターゲットの両方において強度がより高くなりました。これは、この 2 通りのメソッドでは、回収率がより高くマトリックス効果がより低かったことを示しています。マトリックス効果が低く、ターゲット強度が高いと、LOQ レベルにおいて高い信頼性と一貫性の高い結果で、より多くの成分が定量されます。これにより、Captiva EMR-Lipid クリーンアップ前に凍結のステップを追加する必要があることを確認しました。

液体 N₂ と冷凍庫で凍結手順を実施した際のターゲット回収率を評価することにより、試験 D と E を詳細に比較しました。食品検査ラボでは、冷凍庫でサンプルを凍結することは一般的で実際ですが、冷凍庫での凍結メソッドはマイコトキシンを損失させることがわかりました。特にアフラトキシンの場合、約 50 % が損失しました。シトリニンとゼアラレノンの場合は、ほぼすべてが損失しました。

表 3 に、手順 D と E で抽出したサンプルのターゲット回収率の比較実験結果を示します。その結果から、最終の最適化サンプル前処理メソッドとして、手順 D を選択しました。

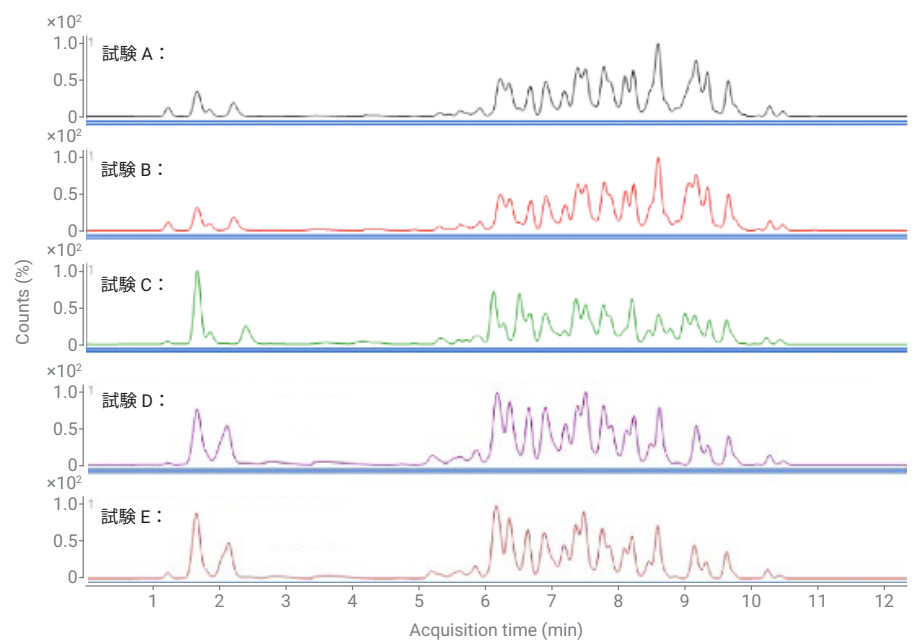


図 3. 50 ng/mL の標準をポストスパイクしたオリーブマトリックスブランクのトータルイオンクロマトグラム

表 3. 試験 D と E で抽出した農薬の真度と精度 (%) の比較

| 農薬 | 回収率 ±RSD (%) | |
|------------|--------------|--------|
| | 試験 D | 試験 E |
| アルジカルブスルホン | 117 ±3 | 検出されず |
| ピテルタノール | 78 ±11 | 50 ±2 |
| ジメトエート | 88 ±2 | 51 ±5 |
| フルフェノクスロン | 88 ±11 | 10 ±3 |
| リニユロン | 88 ±2 | 43 ±1 |
| ペンコナゾール | 83 ±2 | 検出されず |
| チオジカルブ | 78 ±1 | 46 ±8 |
| トリアジメホン | 94 ±9 | 27 ±17 |

バリデーション結果

オリーブ抽出物にスパイクした際の検量線を使用して、直線性を決定しました。実際の濃度から逆算した濃度の偏差は $\pm 20\%$ 以内に収まっていました。表 4 に、マトリックス適合検量線での農薬とマイコトキシンの直線範囲を示します。例として、溶媒標準溶液とマトリックス適合標準中のアセタミプリドの検量線をプロットした結果を図 4 に示します。大部分の農薬が、 $10 \sim 150 \text{ ng/g}$ の範囲で直線性を示しました。アフラトキシン B1、G1、G2 およびオクラトキシン A の直線範囲は $2 \sim 100 \text{ ng/g}$ 、アフラトキシン B2 の直線範囲は $10 \sim 100 \text{ ng/g}$ でした。シトリニンとゼアラレノンの直線範囲は $500 \sim 5,000 \text{ ng/g}$ でした。

直線性を評価するのに使用した標準溶液の場合と同じ分析シーケンスにより、マトリックス効果 (ME) を評価しました。その結果を表 4 に示します。正の ME はマトリックス向上を示しており、負の ME はマトリックス抑制を示しています。今回開発したメソッドでは、全ターゲットにおいて、ターゲットの 28% で無視できる ME (0 ± 20)、ターゲットの 42% で許容できる ME ($\pm 50 \sim \pm 20$ 、抑制または向上)、ターゲットの残り 28% で著しい ME ($\pm 50 \sim \pm 100$) を示しました。高い油含有成分と中間の水分含有成分の複雑な組み合わせのため、より多くのターゲット化合物がマトリックスイオン抑制の影響を受けました。

オリーブ中の農薬においてすべてのターゲットで得られた定量下限 (LOQ) は、EU の MRL 要件である 10 ng/g に適合しています。

許容基準は SANTE/11312/2021⁶ の回収率 ($70 \sim 120\%$) に従っており、RSD 値は 20% 未満でした。表 4 に示すように、すべての農薬において LOQ は 10 ng/g でした。マイコトキシン、アフラトキシン B1、G1、G2 では、メソッドの LOQ は 2 ng/g でした。アフラトキシン B2 の LOQ は 10 ng/g でした。シトリニンとゼアラレノンの LOQ は 500 ng/g でした。

メソッドで得られた LOQ を欧州規則と比較するために、国連食糧農業機関 (FAO) に問い合わせました。欧州委員会規則 EC No. 1881/2006 は、公衆衛生を保護するという目的で、食品中の特定汚染物質に対して、毒性学的に許容できるレベルを維持するための最大レベルを規定しています。食品中のゼアラレノンの MRL は、食品の種類により $20,000 \sim 400,000 \text{ ng/g}$ の間で変動する場合がありますが、シトリニンの MRL は $2,000,000 \text{ ng/g}$ に固定されています。アフラトキシンの MRL は、B1 および B1、B2、G1、G2 の合計として規定されており、その

値も食品の種類により、 $100 \sim 15,000 \text{ ng/g}$ の間で変動する場合があります。オリーブマトリックスに対する値はまだ規定されていませんが、このメソッドで示されている LOQ を使用して、現行の FAO 限度値に適合することができました。⁷

ブラジルでも、RDC n° 7/2011 に関して ANVISA (National Health Surveillance Agency: 国家衛生監督庁) により、MRL が規定されています。サンプルの種類 (牛乳、ナッツ、チーズ、コーヒー、米、離乳食、その他がリストされています) により、ゼアラレノンの MRL は $20,000 \sim 1,000,000 \text{ ng/g}$ の間で変動する場合があります。アフラトキシン B1、B2、G1、G2 の MRL は、 $1,000 \sim 20,000 \text{ ng/g}$ の間で変動する場合があります。この決定事項ではシトリニンは規定されておらず、オリーブマトリックスについては FAO は言及していません。⁸ 両方の規制において、新生児、授乳中の女性、幼児に対する最低 MRL が規定されています。

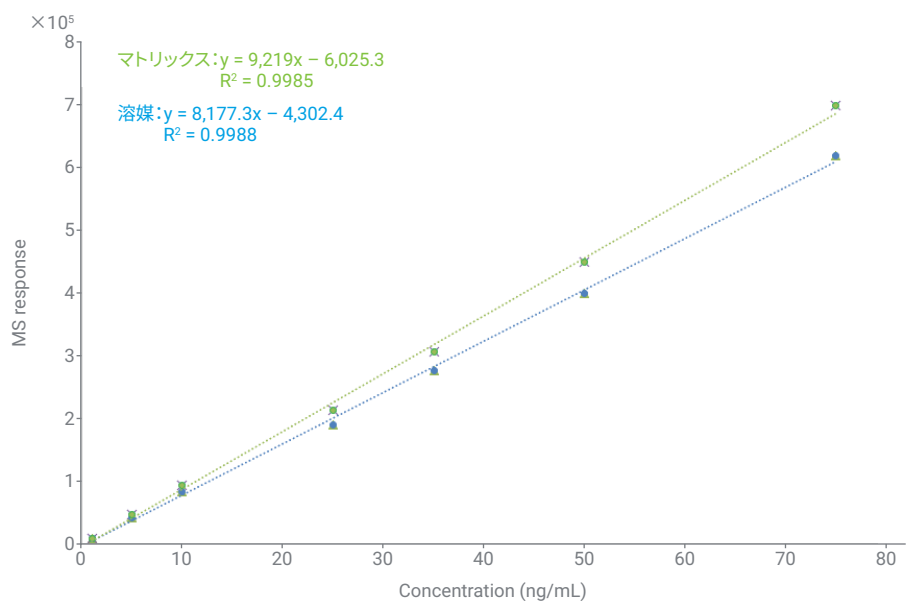


図 4. 原液およびマトリックス適合標準中のアセタミプリドの検量線

表 4. 農薬とマイコトキシンの定量下限 (LOQ、ng/g)、ME、検量線の直線範囲と R²、真度 (n = 6)、および RSD%

| 分析対象物 | LOQ (ng/g) | 検量線 | | | 真度および RSD% | | | |
|-------------------|---------------|------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | マトリックス 効果 (%) | R ² | 直線範囲 (ng/g) | レベル 1 ^a | レベル 2 ^a | レベル 3 ^a | レベル 4 ^a |
| アセフェート | 10 | -92 | 0.9955 | 10 ~ 150 | 109、5 | 101、6 | 89、6 | 89、16 |
| アセトクロール | 10 | -4 | 0.9990 | 10 ~ 150 | 99、7 | 77、7 | 80、11 | 98、7 |
| アフラトキシン B1 | 2 | -63 | 0.9994 | 2 ~ 100 | 119、7 | 105、7 | 95、3 | 95、9 |
| アフラトキシン B2 | 10 | -46 | 0.9989 | 10 ~ 100 | 該当なし | 113、6 | 98、3 | 95、4 |
| アフラトキシン G1 | 2 | 1 | 0.9994 | 2 ~ 100 | 106、16 | 117、8 | 95、5 | 91、8 |
| アフラトキシン G2 | 2 | -32 | 0.9995 | 2 ~ 100 | 111、12 | 104、4 | 92、5 | 93、3 |
| アルジカルブスルホン | 10 | -84 | 0.9975 | 10 ~ 150 | 117、4 | 105、5 | 97、2 | 80、8 |
| アジンホスメチル | 10 | -51 | 0.9847 | 10 ~ 150 | 87、9 | 103、13 | 107、5 | 93、12 |
| アゾキシストロピン | 10 | 10 | 0.9980 | 10 ~ 100 | 119、4 | 109、2 | 111、4 | 90、9 |
| ピテルタノール | 10 | -43 | 0.9994 | 10 ~ 150 | 107、12 | 92、8 | 95、10 | 79、12 |
| ボスカリド | 10 | -33 | 0.9829 | 10 ~ 150 | 92、11 | 94、3 | 98、6 | 78、15 |
| ブロムコナゾール HI | 10 | -54 | 0.9995 | 2 ~ 150 | 102、10 | 90、3 | 92、3 | 81、13 |
| ブピリメート | 10 | -31 | 0.9978 | 10 ~ 150 | 104、4 | 97、4 | 98、3 | 81、12 |
| ブプロフェジン | 10 | -17 | 0.9995 | 10 ~ 150 | 97、3 | 83、3 | 81、8 | 80、3 |
| カズサホス | 10 | -17 | 0.9965 | 10 ~ 150 | 97、3 | 87、11 | 97、18 | 94、15 |
| カルバリル | 10 | -60 | 0.9997 | 10 ~ 150 | 106、9 | 98、8 | 97、8 | 99、8 |
| クロルフェンピホス | 10 | -12 | 0.9997 | 10 ~ 150 | 107、14 | 96、12 | 104、12 | 104、13 |
| シトリニン | 500 | -22 | 0.9234 | 500 ~ 5,000 | 該当なし | 76、4 | 93、1 | 93、3 |
| シアゾファミド | 10 | -32 | 0.9878 | 10 ~ 150 | 116、11 | 98、15 | 119、6 | 118、9 |
| ダイアジノン | 10 | -14 | 0.9971 | 10 ~ 150 | 93、9 | 91、4 | 93、7 | 95、7 |
| ジエトフェンカルブ | 10 | -7 | 0.9841 | 10 ~ 150 | 101、8 | 101、6 | 104、6 | 101、4 |
| ジメトエート | 10 | -37 | 0.9980 | 10 ~ 150 | 114、3 | 98、2 | 97、2 | 100、2 |
| ジメトモルフ (E) | 10 | 22 | 0.9958 | 10 ~ 150 | 108、4 | 101、4 | 102、5 | 101、4 |
| ジニコナゾール | 10 | -42 | 0.9992 | 10 ~ 150 | 98、14 | 86、11 | 88、13 | 89、12 |
| ジウロン | 10 | -70 | 0.9989 | 10 ~ 150 | 102、13 | 101、6 | 101、5 | 102、2 |
| エチオン | 10 | -43 | 0.9998 | 10 ~ 150 | 87、13 | 80、9 | 84、8 | 81、3 |
| エチリモール | 10 | -81 | 0.9929 | 10 ~ 150 | 81、4 | 71、5 | 57、3 | 55、5 |
| エトプロホス | 10 | -12 | 0.9860 | 10 ~ 150 | 90、8 | 94、7 | 96、8 | 90、7 |
| エトキサゾール | 10 | -11 | 0.9996 | 10 ~ 150 | 87、3 | 81、3 | 79、3 | 78、3 |
| フェンアミドン | 10 | -43 | 0.9992 | 10 ~ 150 | 116、6 | 103、4 | 103、5 | 103、5 |
| フェナザキン | 10 | -21 | 0.9997 | 2 ~ 150 | 68、2 | 60、3 | 57、6 | 57、4 |
| フェンブコナゾール | 10 | -8 | 0.9818 | 10 ~ 150 | 91、18 | 97、12 | 94、9 | 93、9 |
| フェンヘキサミド | 10 | -60 | 0.9983 | 10 ~ 150 | 110、16 | 91、10 | 92、10 | 92、7 |
| フェンプロピモルフ | 10 | -33 | 0.9989 | 10 ~ 150 | 70、2 | 63、3 | 63、3 | 63、2 |
| フェンピロキシメート | 10 | -21 | 0.9993 | 10 ~ 150 | 81、4 | 72、3 | 70、3 | 71、3 |
| フルフェノクスロン | 10 | -37 | 0.9991 | 10 ~ 150 | 93、15 | 96、17 | 93、10 | 93、8 |
| フルキンコナゾール | 10 | -50 | 0.9988 | 10 ~ 150 | 97、14 | 95、9 | 94、9 | 90、9 |
| フルシラゾール | 10 | -33 | 0.9828 | 10 ~ 150 | 92、11 | 94、3 | 98、6 | 94、7 |
| フルトラニル | 10 | -16 | 0.9971 | 10 ~ 150 | 109、13 | 103、8 | 105、9 | 100、8 |
| フルトリアホル | 10 | -87 | 0.9971 | 10 ~ 150 | 118、7 | 113、11 | 108、9 | 108、8 |
| ハロキシホップ-2-エトキシエチル | 10 | -35 | 0.9986 | 10 ~ 150 | 95、11 | 95、6 | 96、9 | 97、7 |
| ヘキサコナゾール | 10 | -51 | 0.9982 | 10 ~ 150 | 88、7 | 84、9 | 86、10 | 85、8 |
| ヘキシチアゾックス | 10 | -42 | 0.9974 | 10 ~ 150 | 94、12 | 76、10 | 70、3 | 72、8 |

| 分析対象物 | LOQ (ng/g) | 検量線 | | | 真度および RSD% | | | |
|-----------|---------------|------------------|----------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | マトリックス 効果 (%) | R ² | 直線範囲 (ng/g) | レベル 1 ^a | レベル 2 ^a | レベル 3 ^a | レベル 4 ^a |
| イミダクロプリド | 10 | 116 | 0.9986 | 10 ~ 150 | 120、3 | 105、1 | 102、2 | 103、3 |
| イプロバリカルブ | 10 | 8 | 0.9962 | 10 ~ 150 | 108、7 | 103、2 | 107、6 | 102、4 |
| リニューロン | 10 | -25 | 0.9374 | 10 ~ 150 | 83、16 | 90、17 | 109、12 | 101、10 |
| メカルバム | 10 | -11 | 0.9844 | 10 ~ 150 | 107、12 | 105、14 | 108、17 | 102、14 |
| メバニピリム | 10 | -39 | 0.9953 | 10 ~ 150 | 71、11 | 76、9 | 79、9 | 102、14 |
| メタミドホス | 10 | -87 | 0.9991 | 2 ~ 150 | 88、6 | 79、3 | 79、3 | 77、3 |
| メソミル | 10 | -66 | 0.9991 | 10 ~ 150 | 108、3 | 95、3 | 95、3 | 96、3 |
| モノクロトホス | 10 | -79 | 0.9931 | 10 ~ 150 | 105、15 | 86、8 | 81、6 | 81、5 |
| マイクロプタニル | 10 | -15 | 0.9895 | 10 ~ 150 | 108、12 | 106、14 | 108、10 | 104、8 |
| オメトエート | 10 | -90 | 0.9978 | 10 ~ 150 | 100、8 | 84、6 | 76、6 | 77、6 |
| オキサジキシル | 10 | -23 | 0.9982 | 10 ~ 150 | 107、5 | 90、±4 | 85、3 | 85、4 |
| オキサミル | 10 | -68 | 0.9978 | 10 ~ 150 | 120、3 | 105、4 | 101、3 | 101、3 |
| バクロプトラゾール | 10 | -52 | 0.9864 | 10 ~ 150 | 97、7 | 102、5 | 107、5 | 104、3 |
| ベンコナゾール | 10 | -35 | 0.9925 | 10 ~ 150 | 89、15 | 88、10 | 93、9 | 93、7 |
| ホサロン | 10 | -34 | 0.9941 | 10 ~ 150 | 72、11 | 114、19 | 96、19 | 106、19 |
| ピコキシストロピン | 10 | -16 | 0.9971 | 10 ~ 150 | 112、6 | 105、6 | 106、6 | 108、5 |
| ピラゾホス | 10 | -11 | 0.9910 | 10 ~ 150 | 94、20 | 90、7 | 101、16 | 98、17 |
| ピリミホスメチル | 10 | -20 | 0.9972 | 10 ~ 150 | 85、10 | 85、6 | 88、9 | 87、7 |
| プロフェノホス | 10 | -36 | 0.9972 | 10 ~ 150 | 98、9 | 74、10 | 75、12 | 74、10 |
| プロバルギット | 10 | -27 | 0.9991 | 10 ~ 150 | 92、9 | 83、8 | 79、6 | 81、7 |
| プロファム | 10 | -29 | 0.9993 | 10 ~ 150 | 105、13 | 99、8 | 98、6 | 100、6 |
| プロピコナゾール | 10 | -38 | 0.9985 | 10 ~ 150 | 89、13 | 88、11 | 91、12 | 94、8 |
| プロピザミド | 10 | -44 | 0.9994 | 10 ~ 150 | 107、12 | 92、7 | 85、11 | 88、6 |
| ピリダベン | 10 | -20 | 0.9993 | 10 ~ 150 | 118、4 | 91、4 | 77、8 | 74、6 |
| シマジン | 10 | -71 | 0.9976 | 10 ~ 150 | 89、3 | 78、3 | 73、3 | 75、2 |
| スピロキサミン | 10 | -20 | 0.9986 | 10 ~ 150 | 73、2 | 70、3 | 73、2 | 75、1 |
| テブフェノジド | 10 | -2 | 0.9902 | 10 ~ 150 | 117、10 | 109、11 | 118、13 | 111、9 |
| テブフェンピラド | 10 | -47 | 0.9992 | 10 ~ 150 | 73、7 | 72、15 | 71、7 | 75、9 |
| チアベンダゾール | 10 | -91 | 0.9929 | 10 ~ 150 | 92、7 | 73、9 | 72、12 | 70、12 |
| チオジカルブ | 10 | 63 | 0.9996 | 2 ~ 150 | 112、4 | 99、3 | 97、3 | 97、3 |
| トリアジメホン | 10 | -28 | 0.9991 | 10 ~ 150 | 110、5 | 93、8 | 91、6 | 86、7 |
| トリアゾホス | 10 | -11 | 0.9997 | 10 ~ 150 | 116、10 | 102、8 | 103、11 | 100、11 |
| トリチコナゾール | 10 | -53 | 0.9990 | 10 ~ 150 | 90、14 | 89、7 | 92、3 | 94、3 |
| ゼアラレノン | 250 | -50 | 0.9659 | 100 ~ 5,000 | 該当なし | 99、13 | 97、14 | 98、10 |

^a 成分のスパイクレベル：グループ 1: 10、20、50、70 ng/g。グループ 2: 2、5、10、20 ng/g。グループ 3: 100、250、500、1,000 ng/g。

該当なし= 不明

結論

Agilent Ultivo LC/MS/MS が、オリーブ中の農薬とマイコトキシンの測定において優れた性能を発揮することが実証され、高い正確性、堅牢性、感度を示しました。一般に、5 g ではなく 10 g のサンプルを用いて抽出すると、メソッド感度と許容できるマトリクス効果の点で有利であることがわかりました。

今回の分析メソッドでは、良好な真度と精度を達成しました。バリデーションにおいては、77 種類の化合物（71 種類の農薬と 6 種類のマイコトキシン）を正しくバリデーションしました。このメソッドをオリーブの分析に適用することにより、マイコトキシンに対して FAO およびブラジルの ANVISA が要求している MRL を達成できます。今回の実験により、このメソッドがオリーブ中の農薬とマイコキシンの同時抽出および測定に適していることが実証されており、スクリーニングまたはモニタリングプログラム向けのルーチン分析に導入することが推奨できます。

参考文献

1. Bucciantini, M. *et al.* Olive Polyphenols: Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *Antioxidants* **2021**, *10*(7), 1044. Available at <https://doi.org/10.3390/antiox10071044>
2. Hakme, E. *et al.* Analysis of Pesticide Residues in Olive Oil and Other Vegetable Oils. *Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *100*, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.12.016>
3. Agripoulou, S.; Stamatelopoulou E.; Varkazas, T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods* **2020**, *9*(2), 137. <https://doi.org/10.3390/foods9020137>
4. Shavakhi, F.; Rahmani, A.; Piravi-Vanak, Z. (2022) A Global Systematic Review and Meta-Analysis on Prevalence of the Aflatoxin B1 Contamination in Olive Oil. *JFST* **2023**, *60*, 1255–1264. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05362-y>
5. Amvrazi, E. G.; Albanis, T. A. Multiclass Pesticide Determination in Olives and Their Processing Factors in Olive Oil: Comparison of Different Olive Oil Extraction Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5700–5709. Available at: <https://doi.org/10.1021/jf703783u>
6. European Commission DG-SANTE, Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed, SANTE/11312/2021.
7. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. *Official Journal of the European Union L* **2006**, *364*, 5–24. FAO. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20160401&from=CS>
8. RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 07, DE 18 DE FEVEREIRO DE 2011. ANVISA Available at: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-7-de-18-de-fevereiro-de-2011.pdf/view>

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。

DE60177871

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, May 11, 2023

5994-6101JAJP