

## 黒コショウ中の 510 種の農薬の分析

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 を用いた分析

### 著者

Aimei Zou, Limian Zhao,  
Auni Wong, Ruben Garnica,  
and Chee Sian Gan  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

本アプリケーションノートでは、黒コショウ中の 510 種の農薬について信頼性の高い定量が行えるよう最適化された高度なサンプル前処理法について解説します。ワークフローは、先に開発したダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) 法を用いて、Agilent 1290 Infinity II LC システムと Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS とを組み合わせ実証しました。

黒コショウサンプルの前処理法には、Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットを使用し、続くシーケンシャルパススルークリーンアップには、Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigment Dry (EMR-GPD) および Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigment Fresh (EMR-GPF) の各カートリッジを使用しました。ワークフロー性能は、0.25 ~ 100 µg/L のマトリックス適合キャリブレーション標準を用いて、メソッドの感度、検量線の直線性、プレスパイク QC の回収率と精度に基づき、SANTE/11312/2021 に準じて評価し、検証しました。マトリックス効果 (ME) は、510 種のターゲット物質のイオン抑制と MS レスポンスの向上の観点から評価しました。85 % を超える分析対象物で、50 または 100 µg/L の検出限界 (LOD) の検量線範囲で  $R^2 \geq 0.99$  を得る直線性を示し、75 % の分析物で、RSD  $\leq 20$  % の場合に 40 ~ 120 % の回収率を達成しました。新たに開発したサンプル前処理メソッドにより、マトリックス効果が著しく低減すると同時に抽出効率が大幅に向上し、ワークフロー全体の簡素化も可能になりました。

## はじめに

黒コショウの主な生産・輸出国は、ベトナム、インドネシア、インド、マレーシア、スリランカおよびブラジルです。黒コショウの植え付けや保管、生産時には、黒コショウの収穫と品質の確保のため、病虫害防除に農薬が広く使用されています。このように農薬が広く用いられていることで、食の安全性や環境への影響が懸念されています。このため、欧州連合（EU）や国際食品規格委員会（CAC）といった世界中の規制機関は、黒コショウ中の農薬について最大残留限界（MRL）を設けています。

SANTE ガイドラインで扱いが難しい農産物または特有の農産物と見なされる黒コショウは広く認知される、難易度の高いマトリックスです<sup>1</sup>。このサンプルのマトリックス干渉は、従来のサンプル前処理法では取り除くのが極めて困難です。既存のサンプル前処理メソッドでは、高い希釈倍率によって ME を低減するか、よりクリーンな抽出物を得るために広範なサンプルクリーンアップを行います。こういった従来の方法の場合、望む結果を得るために検出感度を犠牲にすることが少なくありません。

本研究では、QuEChERS EN 抽出後に Captiva EMR-GPD および EMR-GPF パススルークリーンアップを用いるサンプル前処理改良メソッドを開発しました。Captiva EMR-GPD、EMR-GPF の各カートリッジはいずれも、新たに開発された Agilent Carbon S 吸着剤をはじめ、最適化された混合吸着剤が充填された、Captiva EMR の拡張製品です。Carbon S 吸着剤は、炭素含有量が最適化されたポア構造の高度なハイブリッド炭素材です。この吸着剤なら、乾燥したマトリックスや生のマトリックスなど、植物由来のサンプルマトリックスに対して、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が可能で  
す。Captiva EMR-GPD は一般的な色素のある乾燥したマトリックス向けに設計されたものです。一方、Captiva EMR-GPF は、一般的な色素のある生のマトリックス向けです。従来の QuEChERS 抽出後、黒コショウマトリックスクリーンアップに 2 種類の Captiva EMR カートリッジを連続して使用しました。複雑な黒コショウマトリックスのマトリックスクリーニングを改善するため、2 種類の Captiva EMR カートリッジを使用しました。

サンプル前処理手順、LC/MS/MS 検出メソッド、ターゲット捕捉、データ分析ステップについては、アジレントでご提供しています<sup>2</sup>。

## 実験方法

### 試薬および調製

Agilent LC/MS グレードのアセトニトリル（ACN）（部品番号 5191-4496）およびメタノール（MeOH）（部品番号 5191-4497）、超高純度 Milli-Q 水を使用しました。LC/MS グレードのギ酸、酢酸およびアンモニウムギ酸は Sigma-Aldrich から購入しました。

### 標準および溶液の調製

本研究に使用したカスタムの 10 種の混合農薬標準液はアジレント製です。標準液の詳細は表 1 に示すとおりです<sup>3</sup>。

510 種のターゲット物質から成る、1,000 µg/L 濃度の中間標準混合液は、標準原液を ACN に溶解して調製し、残りの実験に使用しました。

対応するマトリックス適合キャリブレーション標準の反応と比較することで ME を評価するため、希釈していない標準液を ACN で調製しました<sup>1</sup>。中間標準液 1,000 µg/L を ACN で適切に希釈して、0.25、0.5、1、2、5、10、25、50 および 100 µg/L の 9 つの異なる濃度のキャリブレーション標準液を作成しました。

**注記：**キャリブレーション標準液は新たに調製し、すぐに使用しない場合は、冷蔵庫で 4 °C で保管する必要があります。

### サンプル前処理

粉末の乾燥黒コショウは地元の食料品店で購入し、それ以上処理することなく実験作業に使用しました。

表 1. Agilent プレミックス農薬標準

部品番号	部品の説明	分析対象物濃度	マトリックス	バイアル数	分析対象物数
5190-0551	LC/MS 農薬包括的テスト混合物	100 µg/mL	アセトニトリル	8	254
CUS-00000635	カスタム農薬テスト混合物 1	100 µg/mL	アセトニトリル	1	27
CUS-00000636	カスタム農薬テスト混合物 2	100 µg/mL	アセトニトリル	1	26
CUS-00000637	カスタム農薬テスト混合物 3	100 µg/mL	アセトニトリル	1	27
CUS-00000638	カスタム農薬テスト混合物 4	100 µg/mL	アセトニトリル	1	28
CUS-00000639	カスタム農薬テスト混合物 5	100 µg/mL	アセトニトリル	1	25
CUS-00000641	カスタム農薬テスト混合物 6	100 µg/mL	アセトニトリル	1	26
CUS-00000640	カスタム農薬テスト混合物 7	100 µg/mL	アセトニトリル	1	28
CUS-00000642	カスタム農薬テスト混合物 8	100 µg/mL	アセトニトリル	1	29
CUS-00000643	カスタム農薬テスト混合物 9	100 µg/mL	アセトニトリル	1	30
CUS-00004663	カスタム農薬テスト混合物 10	100 µg/mL	アセトニトリル	1	25

サンプル前処理には、以下の製品および機器を使用しました。

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット (部品番号 5982-5650CH)
- Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigmented Dry (EMR-GPD) カートリッジ (部品番号 5610-2091)
- Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-General Pigmented Fresh (EMR-GPF) カートリッジ (部品番号 5610-2090)
- ジェノグラインダー (SPEX、メアチェン、ニュージャージー州、米国)
- 遠心分離機 5804 R (Eppendorf、ハンブルク、ドイツ)
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、プレインフィールド、ニュージャージー州、米国)
- 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)

0.5 ± 0.01 g の分量の粉末の黒コショウを 50 mL の遠心分離チューブに入れました。適切な量の中間農薬標準液 (1,000 µg/L) を黒コショウマトリックスに添加して品質管理 (QC) 添加サンプル (プレスパイク QC) を作成しました。マトリックスブランク (MB) を、無添加の黒コショウサンプルで調製しました。次に、プレスパイク QC サンプルを密栓してボルテックスし、さらに 15 ~ 20 分平衡化して、サンプルマトリックスに分析対象物を浸透させました。水 10 mL をすべてのサンプルに添加しました。低水分品 (乾燥サンプル) の抽出効率を向上させるため、サンプルを 10 ~ 15 分間ボルテックスしました<sup>1</sup>。1 % 酢酸 ACN 溶液 10 mL をチューブに添加し、さらに、QuEChERS EN 抽出塩を添加してセラミック製ホモジナイザーを使用しました。チューブを密栓し、ジェノグラインダーを使用して 1,500 rpm で 5 分間激しく振とうさ

せました。次に、すべてのサンプルを、4,000 rpm で 5 分間遠心分離機にかけました。上清 2.5 mL を 15 mL チューブに移し、1 % ギ酸水溶液 250 µL と混合しました。混合液を全体的に十分に均質化してから Captiva EMR-GPD カートリッジに投入し、ラベルの付いた回収管が下部にある Agilent PPM-48 プロセッサにセットしました。1 滴下あたり 3 ~ 5 秒の流量に制御できるよう、低圧 (1 ~ 3 psi) をかけました。サンプルすべてがカートリッジを通過してカートリッジ内に液体が残っていない状態になったら、高圧 (最大 10 psi) をかけ、EMR-GPD カートリッジを 2 分間完全に乾燥させました。次に、すべての溶出液を Captiva EMR-GPF カートリッジに移し、自然落下溶出による第 2 段階のクリーンナップを行いました。自然落下による滴下がなくなったら、カートリッジを 10 psi の圧力で完全に乾燥させました。溶出液を十分に混合し、LC/MS/MS 分析の準備を整えました。サンプル前処理ワークフロー全体で、22 倍の希釈倍率を用いました。図 1 に、サンプル前処理ワークフローの全体像を示します。

## マトリックス適合キャリブレーション標準の調製

マトリックス適合キャリブレーション標準は、中間標準液を MB にポストスパイクして調製しました。マトリックス適合キャリブレーションの各濃度の調製は、溶媒標準溶液の作成と同じですが、ACN 溶媒ブランクではなく、MB を使用する点が異なります。

## 装置構成

クロマトグラフ分離は、Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition Eclipse Plus C18 カラム (部品番号 959759-902) を使用して Agilent 1290 Infinity II LC で行い、検出は、Agilent Jet Stream (AJS) エレクトロスプレーイオン源搭載の Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS で dMRM モードで行いました。LC/TQ オートチューンを、ユニットモードとワイドモードで実施しました。すべてのデータは、Agilent LC/MS データ取り込みソフトウェア (バージョン 10.1 以上) で取り込み、Agilent Quantitative Analysis for QQQ ソフトウェア (バージョン 10.2 以上) で処理しました。

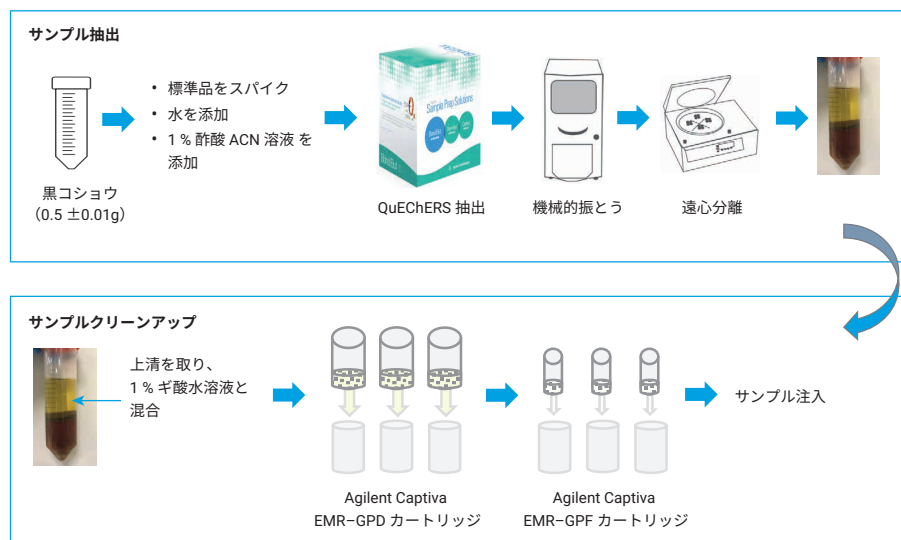


図 1. Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットによる抽出後、Captiva EMR-GPD と Captiva EMR-GPF シーケンシャルパススルークリーンアップを行う黒コショウサンプル前処理ワークフロー

本ワークフローで使用した LC システム条件および TQ パラメータは、先の研究で参照いただけます<sup>4,5</sup>。

## 結果と考察

### 黒コショウサンプルの前処理とマトリックスクリーンアップの効率性

ターゲット回収率に大きな影響を及ぼすことなく、マトリックスの除去で高い選択性と効率性が得られる Captiva EMR パスルークリーンアップ法は、効率的で手早く行え、信頼性にも優れたサンプルクリーンアップ手法です。特に、マルチクラスの多成分残留分析に最適で、全体として十分なターゲット透過率と満足いくマトリックス清浄度が得られます。従来の dSPE クリーンアップに比べ、パスルークリーンアップでは、dSPE チューブの蓋の取り付けや取り外し、ポルテックスや遠心分離が不要になるなど、ワークフローステップの簡素化が図れます。

新しい Captiva EMR カートリッジには、最適化された調合法に基づいて他の充填剤を混合した最新の Carbon S 充填剤が充填されているため、乾燥マトリックスや生のマトリックスなど、植物由来のサンプルマトリックスに対して、選択的かつ効率的なマトリックスパスルークリーンアップが可能です<sup>6,7</sup>。

黒コショウのマトリックスの著しい複雑性とマトリックスクリーンアップの課題とを考慮し、膨大な量の研究作業を行って、マトリックスクリーンアップを改善でき、許容可能なターゲットの定量結果も得られるシンプルかつ堅牢なサンプル前処理法を開発しました。このメソッドの性能は、黒コショウのマトリックス除去、ターゲット回収率および再現性に基づいて評価しました。クリーンアップ効率の比較には、主としてマトリックスの乾燥残留物の重量を活用しました<sup>8</sup>。メソッドの開発にあたっては、約 100 種の農薬を網羅した、より限定的な代表ターゲットリストを使用しました。Captiva

EMR-GPD によるシーケンシャルパスルークリーンアップおよび EMR-GPF カートリッジによって、非常に高いマトリックス除去効率に加え、ターゲット回収率も全体的に極めて高く、失敗率は著しく低下しました。

図 2 に、(A) 可視化した乾燥残留物と重量、(B) GC/MS フルスキャンバックグラウンドテストによる、黒コショウのマトリックス除去の評価を示しています。図 3 では LC/TQ によるトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示し、黒コショウマトリックスの清浄度を比較してい

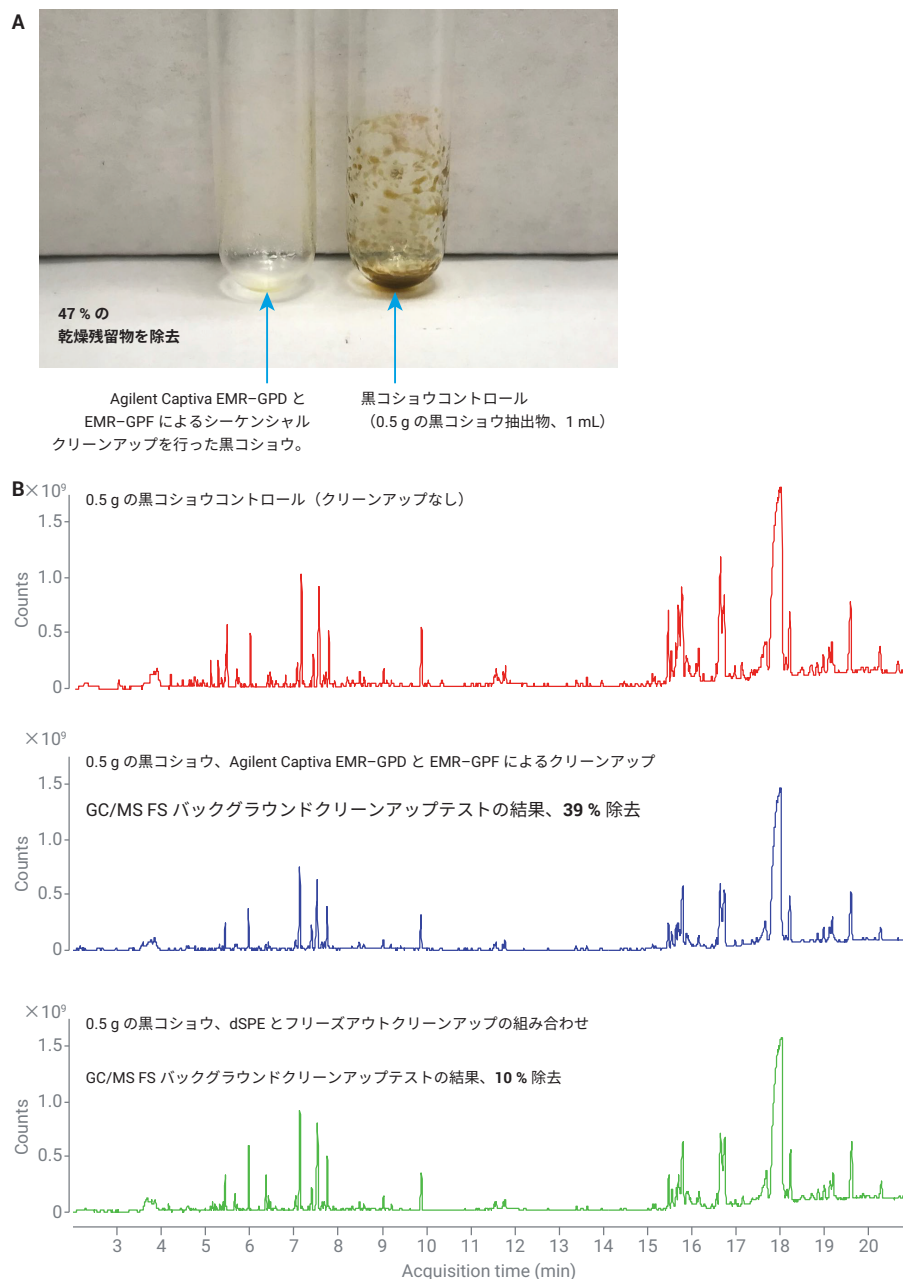


図 2. Agilent Captiva EMR-GPD と Captiva EMR-GPF によるシーケンシャルクリーンアップによる、黒コショウマトリックスクリーンアップの評価。(A) マトリックス乾燥残留物の重量テストでは、乾燥残留物の 47% を除去したことが示されています。(B) GC/MS フルスキャンバックグラウンドテストでは、サンプルのバックグラウンド干渉またはノイズの 39% を除去したことが示されています。

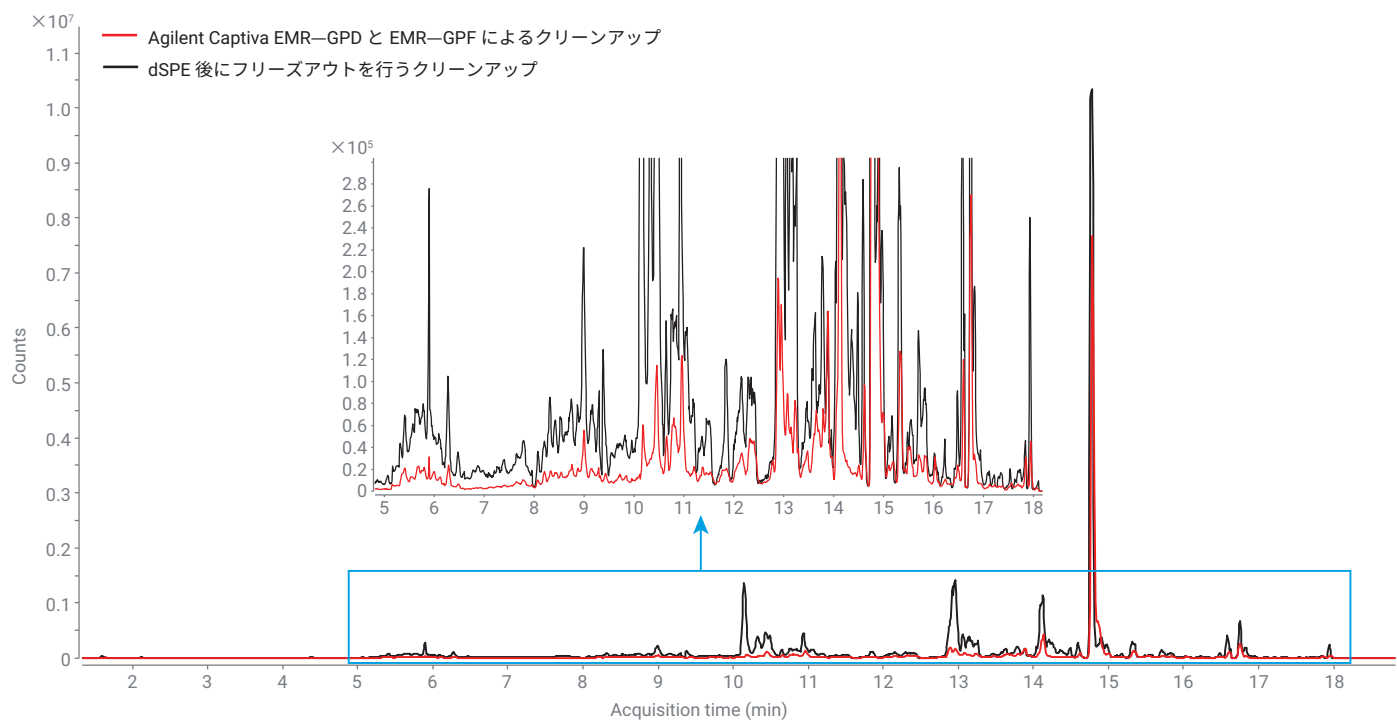


図 3. dSPE 後にフリーズアウトクリーンアップを行う方法と比較した、Agilent Captiva EMR-GPD と EMR-GPF によるシーケンシャルパススルークリーンアップを行う LC/TQ による黒コショウマトリックスブランクの TIC クロマトグラム

ます。この比較には、Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップ (EMR-GPD および EMR-GPF) で調製したサンプル、従来の dSPE とフリーズアウトクリーンアップ<sup>9</sup> を組み合わせて調製したサンプル、クリーンアップを行わない黒コショウ粗抽出物が含まれます。これらのマトリックス清浄度評価のすべての結果から、Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップによって、最も清浄度の高いマトリックス抽出物が得られ、黒コショウマトリックスのバックグラウンドも最も低いことが明らかになっています。

### マトリックス効果 (ME) の評価

本研究では、次の 2 つの方法でクリーンアップした黒コショウ中の 510 種の残留農薬を評価しました：a) dSPE とフリーズアウトクリーンアップの組み合わせ<sup>9</sup>、b) 新たな Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップ。SANTE プロトコルに準じた ME 評価は、対応する溶媒標準溶液の反応に対する、黒コショウのマトリックス適合標準液のターゲット反応の比によって求めました<sup>1</sup>。表 2 に、異なる 2 つの前処理メソッドによる ME データを

示しています。全体として、510 種の化合物の 85 % で、ME は、Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップ後の黒コショウ中で 40 ~ 120 % の範囲に収まっています。これは、新たな Captiva EMR カートリッジのクリーンアップ効率が極めて優れていること、また、その定量もマトリックス適合キャリブレーションによって効果的に補えることを示しています。

表 2. dSPE とフリーズアウトクリーンアップを組み合わせた方法と比較した、Agilent Captiva EMR-GPD と EMR-GPF の各カートリッジによるシーケンシャルクリーンアップを行った ME データ

マトリックス	抽出メソッド	全 510 ターゲット	
		有意でない ME 80 ~ 120 % のターゲット数	ME 40 ~ 120 % のターゲット数
黒コショウ	A) QuEChERS 抽出 + dSPE とフリーズアウトクリーンアップの組み合わせ	16 (3%)	136 (26%)
	B) QuEChERS 抽出 + Captiva EMR-GPD 後に EMR-GPF	120 (24%)	435 (85%)

図 4 に、QuEChERS EN 抽出後に Captiva EMR シーケンシャルパススルークリーンアップを行って調製した黒コショウ抽出物中の 10 µg/L の濃度のすべてのターゲットの代表的な MRM クロマトグラムを示しています。鋭い対称ピークと感度の高い反応は、マトリックスクリーンアップ効率が高いこと、また、新たな Captiva EMR カートリッジの使用によって、500 種を超えるターゲットの ME が向上したことを示しています。

### ワークフロー全体の性能の検証

ワークフロー性能は、検量線の直線性、メソッドの感度、回収率および SANTE ガイドラインに準じた精度に基づいて検証しました<sup>1</sup>。バッチ内分析およびバッチ間分析を行って、メソッドの反復性と再現性を評価しました。各バッチには、溶媒ブランク、マトリックス適合キャリブレーション標準、マトリックスブランク、プレス

パイク QC および ポストスパイク QC が含まれます。プレスパイク QC の 3 つのテクニカルレプリケートは、バッチごとに調製しました。

### 1) 検量線の直線性

全ターゲットの検量線の直線性は、マトリックス適合標準液を用いて 0.25 ~ 100 µg/L のダイナミックレンジで評価しました。全体として、LOD から 50 または 100 µg/L の範囲で、510 種のターゲットの 85 % で、検量線の直線性要件である  $R^2 \geq 0.99$  を満たしています。また、直線性の精度も、全レベルでスパイク濃度と比較した逆算濃度の精度の偏差に基づいて評価しました。例に示すように、キャリブレーションレベル 6 (10 µg/L) では、510 種のうち 90 % を上回る化合物で、逆算精度が黒コショウ抽出物中の 100 ± 20 % の許容範囲に収まっています。

### 2) メソッドの感度

メソッドの感度は、LOD または定量限界 (LOQ) に基づいて評価しました。本研究では、最低濃度の標準溶液を用いて、S/N 比  $\geq 3$ 、70 ~ 130 % の範囲に収まる精度を考慮して、メソッドの LOD を設定しました<sup>1</sup>。黒コショウ抽出物中の 510 種のターゲットの 97 % で、メソッドの LOD は  $\leq 10$  µg/L で得ています。さらに、510 種のターゲットのうち 67 % で LOD  $\leq 0.25$  µg/L、81 % で LOD  $\leq 1$  µg/L を示しています。黒コショウ抽出物中のこの LOD 結果は、6470B LC/MS/MS の感度の高さと新たに開発したサンプル前処理メソッドによるマトリックスの極めて高い清浄度を示しています。カルベンダジム、カルボフランおよびトリアゾホスは、サンプルクリーンアップで容易に失われる可能性のある、典型的な平面化合物、アルカリ化合物または酸性化合物として同定されていま

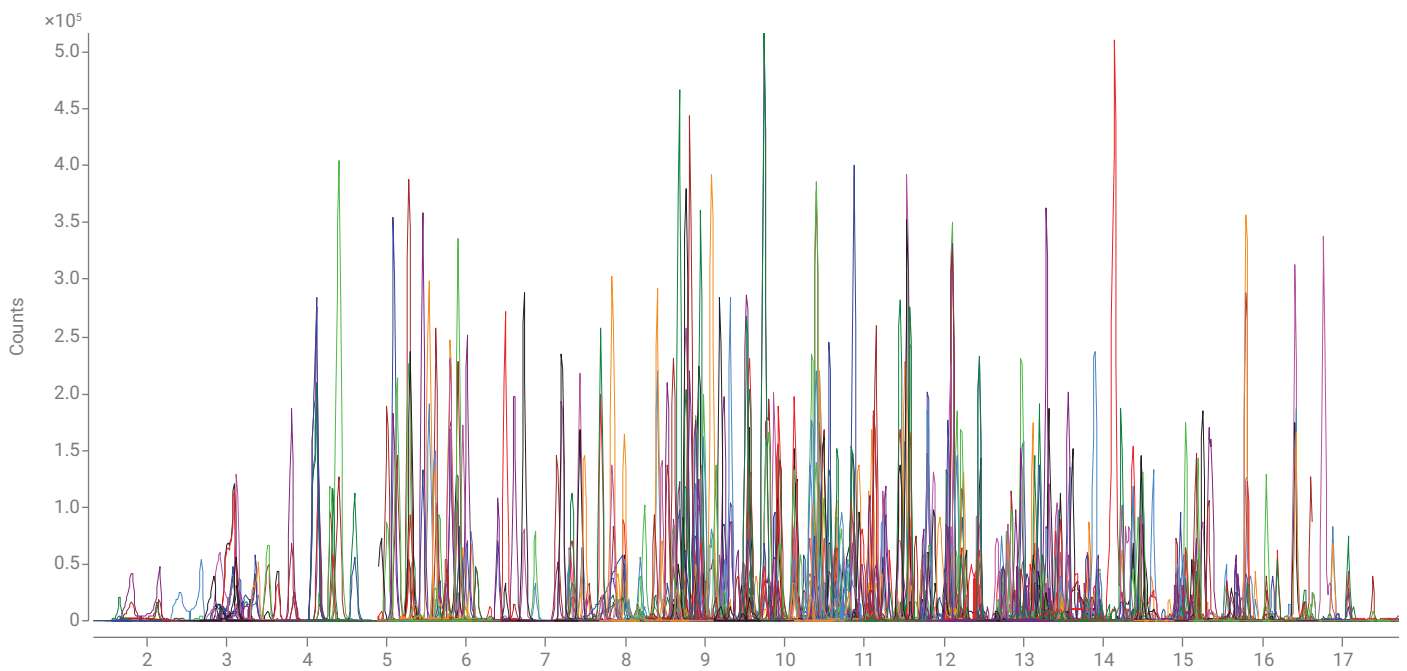


図 4. 黒コショウマトリックス抽出物中の 10 µg/L の濃度の 510 種の農業の典型的な MRM クロマトグラム

す。このため、黒コショウマトリックスにおけるメソッド性能を示すのに、この扱いの難しい3種類の化合物を選択しました。図5に、優れた直線性とワークフローの感度の高さを明らかにする、黒コショウ中の0.25～100 µg/Lの濃度のカルベダジム、カルボフランおよびトリアゾホスのLC/MS/MS MRM クロマトグラムの重ね表示を示しています。

SANTE ガイドラインに準じ、LOQ は、10 以上の S/N 比 が得られる最低濃度レベルでプレスパイクしたサンプルから得て、ターゲット同定に加え、黒コショウマトリックス中の分析対象物の回収率と精度についてのメソッド性能基準も考慮しています。表3では、本研究で測定した LOQ と、EU が設けた黒コショウマトリックス中の MRL とを比較しています<sup>10</sup>。

この結果から、この分析ワークフローの性能によって、規制要件を満たせるだけのメソッド感度を得られていることがわかります。

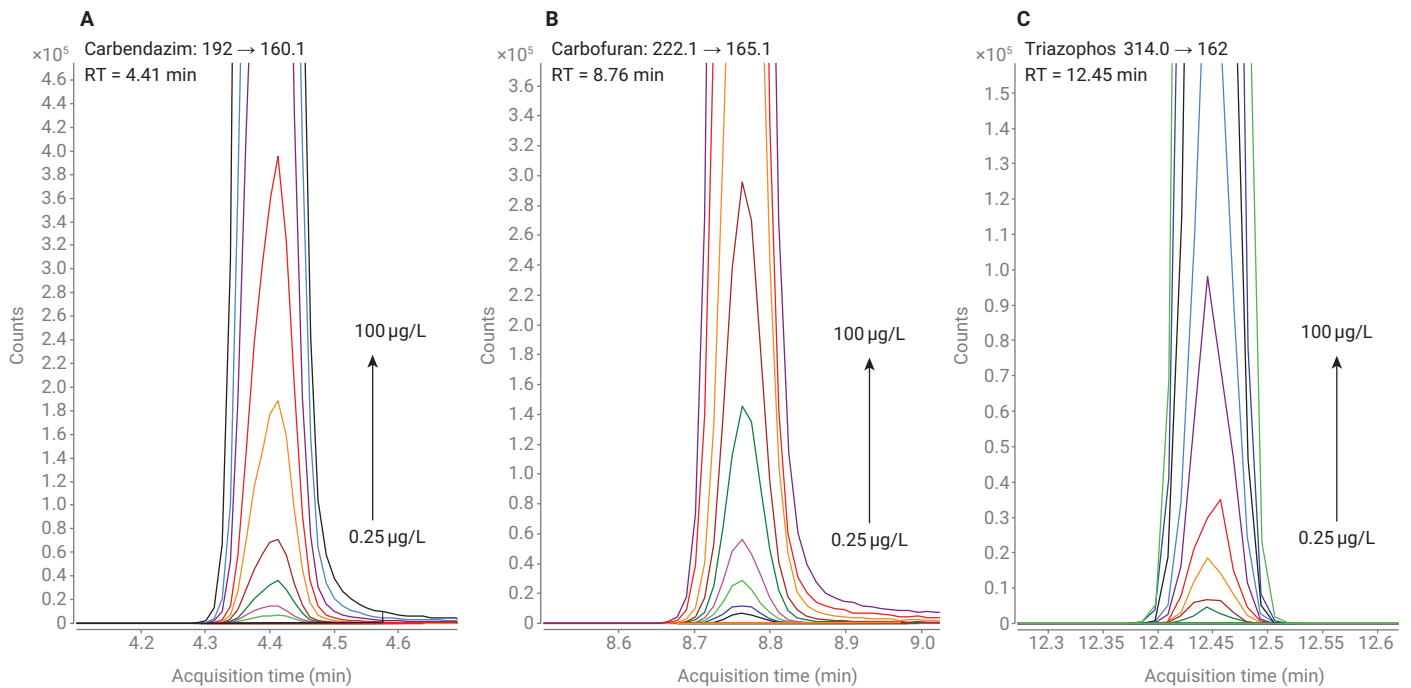


図5. 黒コショウ抽出物中の0.25～100 µg/Lの濃度の (A) カルベダジム、(B) カルボフラン、(C) トリアゾホスのMRM クロマトグラムの重ね表示

表3. EU が設けた黒コショウマトリックスの MRL と本アプリケーションノートで解説したワークフローに従って測定した、対応する LOQ との比較

農薬	EU 規定の MRL (µg/kg)	本研究の LOQ (µg/kg)
アセタミプリド	100	10
アトラジン	100	10
ブプロフェジン	50	10
カルベダジム	100	10
カルボフラン	50	10
クロチアニジン	50	10
シプロジニル	100	10
ジフェノコナゾール	300	10
エポキシコナゾール	100	25*
フロラスラム	50	10

農薬	EU 規定の MRL (µg/kg)	本研究の LOQ (µg/kg)
フルトリアホル	50	10
ヘキサコナゾール	50	10
イミダクロプリド	50	10
イソプロソロン	50	10
メタラキシル	50	10
メソミル	50	10
パクロプロトラゾール	50	10
ピリミカルブ	50	10
プロクロラズ	150	10
ピリダベン	50	10

農薬	EU 規定の MRL (µg/kg)	本研究の LOQ (µg/kg)
ピリメタニル	50	10
テブコナゾール	50	10
チアベンダゾール	50	10
チアメトキサム	50	10
トリアゾホス	70	10
トリシクラゾール	50	10

\* 黒コショウマトリックス中に正電荷が発生したため、LOQ が上昇。

図 6 に、10 µg/kg のプレスパイク QC (LOQ レベル) の 3 つの技術的反復のカルベンダジム、カルボフランおよびトリアゾホスの MRM クロマトグラムの重ね表示を示しています。サンプル前処理に用いた 22 倍の希釈倍率を考慮すると、これは、黒コショウ抽出物中の最大濃度 0.45 µg/L に相当します。図 6 に示すように、RSD<sub>r</sub> < 3 % の場合に、扱いが難しい、LOQ レベルの 3 種類の化合物で高い反応が得られたことから、メソッドの感度と再現性が優れていることが示されました。

### 3) メソッドの回収率

ターゲットの回収率は、サンプル前処理メソッドの性能と食品マトリックス中の残留農薬測定の実度の重要な指標です。コショウマトリックス中の農薬に対して設けられた最低 MRL が 50 µg/kg であることを考慮し、本研究では、10 µg/kg 濃度のプレスパイク QC を用いてターゲット回収率を評価しました。回収率は、プレスパイク QC 中の濃度期待値 (n = 3) に対する、マトリックス適合検量線から算出した分析対象物の濃度の比に基づいて得ています。平均回収率は、SANTE ガイドライン

のメソッド性能合格基準に準じ、整合性がある (RSD<sub>r</sub> ≤ 20 %) 場合には 30 % を下回らず、140 % を超えないことが条件です。本研究では、RSD<sub>r</sub> ≤ 20 % の場合の許容可能な回収率範囲をさらに厳しい 40 ~ 120 % としました。図 7 に、黒コショウマトリックス中の 510 種のターゲットの回収率分布を示しています。全体として、開発したワークフローを用いた場合に、510 種のうち 382 種の化合物で上記の基準を満たしました。また、510 種のターゲットのうち 358 種 (70 %) で、黒コショウ中 10 µg/kg の濃度で回収率 70 ~ 120 % を示しました。この回収率結果によって、開発したサンプル前処理メソッドで、黒コショウ中のほとんどのターゲット農薬について、許容可能な分析対象物の回収率が得られることが裏付けられました。この結果は、新たに開発したサンプル前処理メソッドが、複雑なマトリックス中の多数の農薬の分析に適していることを示しています。

不合格の農薬の許容不可となった回収率は、主としてターゲットの正電荷の発生と黒コショウ中のマトリックス干渉に関連していました。残留農薬の正電荷の発生は、黒コショウマトリックスではごく一般的で、完全にクリーンなマトリックスブランクを見つけるのは困難です。結果として、特定の農薬の正電荷の発生は、ターゲット定量のマトリックス適合検量線の精度に大きな影響を及ぼしました。こういった化合物には、ジウロン、DEET、エポキシコナゾール、フルオメツロン、クインチオホスなどがあります。また、未確認のマトリックスバックグラウンドによって引き起こされるマトリックス干渉は、正確なピーク積分を難しくする一因でもあります<sup>1</sup>。アキラジン、ジニコナゾール、メプロニル、ニコチン、テルブリンといったターゲットは、重大なマトリックス干渉を引き起こすことが確認されており、一貫性のあるターゲット定量を難しくしています。

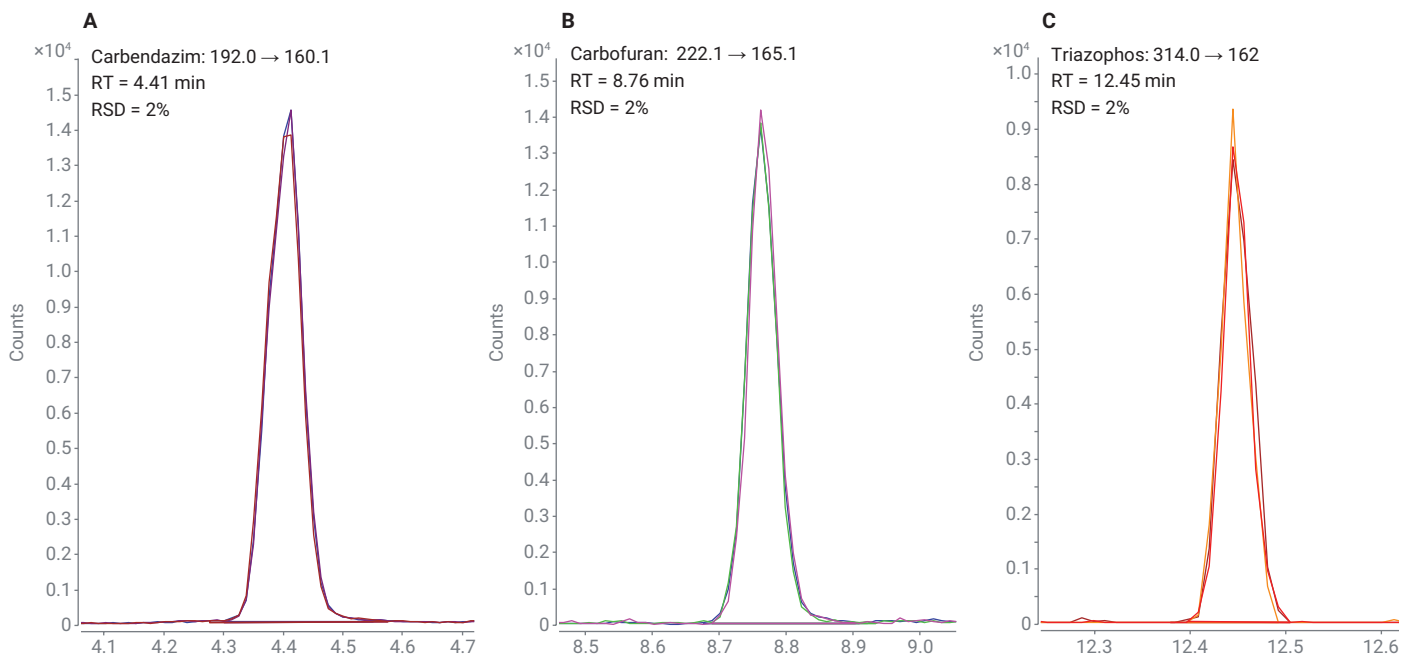


図 6. バッチ内の黒コショウマトリックス中の 10 µg/kg の濃度のプレスパイク QC の 3 回のテクニカルレプリケートにおける (A) カルベンダジム、(B) カルボフラン、(C) トリアゾホスの MRM クロマトグラムの重ね表示



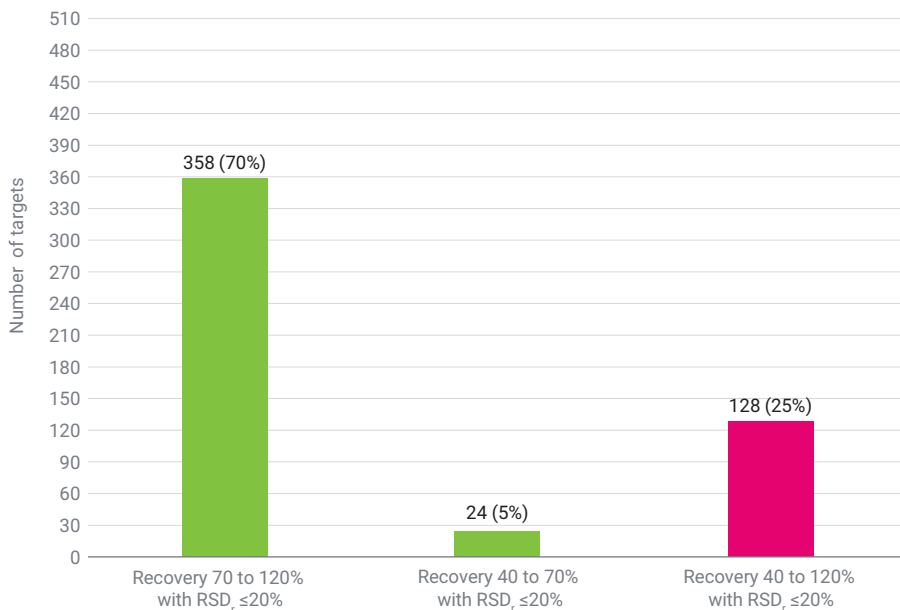


図 7. 黒コショウ中の 510 種のターゲットすべてのプレスパイク QC の回収率の分布

#### 4) メソッドの精度

メソッドの精度は、10 µg/kg 濃度のプレスパイク QC の反復に基づいて、バッチ内回収率の反復性とバッチ間回収率の再現性によって評価しました。RSD (%) は、バッチ内プレスパイク QC の 3 回の反復の回収率に基づいて算出しました。全体として、黒コショウ中の 80 % のターゲットで、このサンプル前処理メソッドの一貫した性能を示す、RSD<sub>r</sub> ≤ 20 % が得られました。

RSD<sub>ir</sub> % は、別々の日に異なるロットのサンプルマトリックスを用いてラボの科学者 2 人が調製したそれぞれのバッチのプレスパイク QC の 6 回の繰り返し分析の回収率に基づいて算出しました。510 種のターゲットのうち 78 % で、黒コショウ中で RSD<sub>ir</sub> ≤ 20 % を示しました。図8に、黒コショウ中の 10 µg/kg の濃度のプレスパイク QC の 6 回の反復における 3 種の代表的ターゲット (カルベンダジム、カルボフランおよびトリアゾホス) のバッチ間回収

率値を示しています。この結果から、開発した分析ワークフローによって、日々のルーチン分析で一貫した定量結果が得られることが示されました。

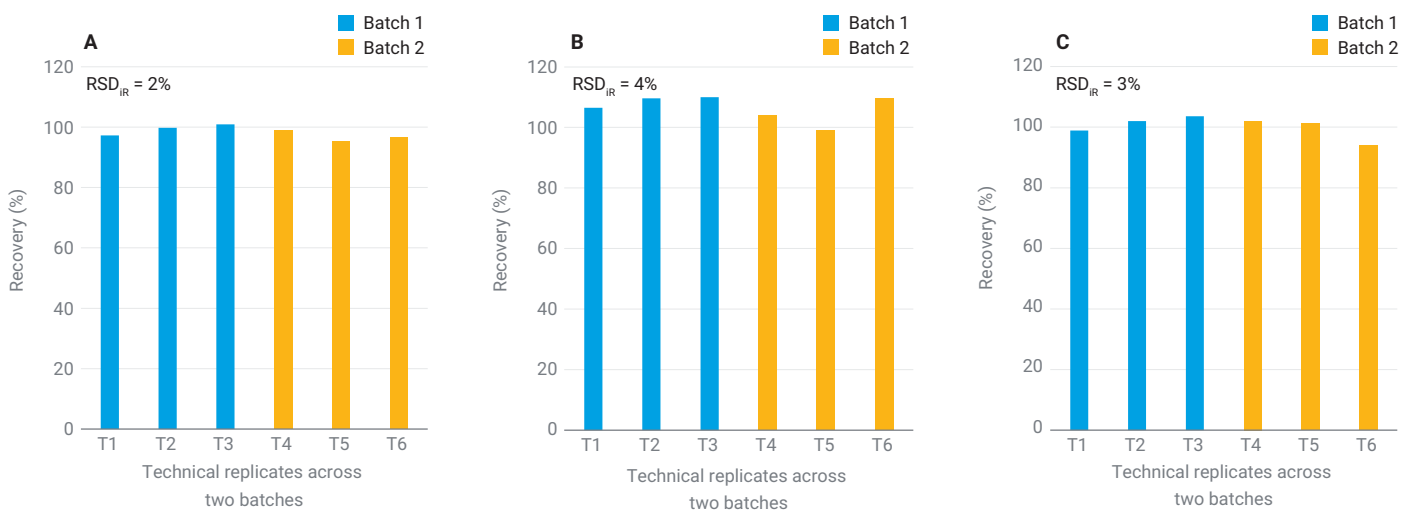


図 8. 2 つのバッチの 10 µg/kg 濃度のプレスパイク QC の 6 回のテクニカルレプリケートにおける (A) カルベンダジム、(B) カルボフラン、(C) トリアゾホスの回収率値

## 結論

サンプル前処理、クロマトグラフィーによる分離、MS 検出といった、本アプリケーションノートで解説した一連のワークフローにより、黒コショウマトリックス中の 510 種の残留農薬の選択的かつ高感度の定量分析が可能です。

Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットによる抽出後、Agilent Captiva EMR-GPD と EMR-GPF の各カートリッジを使用したシーケンシャルパススルークリーンアップによる簡素化したサンプル前処理プロトコルなら、効率的に黒コショウマトリックスを除去できると同時にマトリックス効果を低減し、黒コショウ中のマトリックス干渉をこれまで以上に排除できます。このメソッドにより、75 % の農薬で、許容可能な定量結果が得られました。これらの結果から、従来のサンプル前処理法に勝る方法であることがわかります。より清浄度の高い抽出サンプルが得られることで、LC カラムや MS イオン源の汚染やキャリアオーバーを防ぐこともできるため、メンテナンス頻度を減らせ、ワークフロー全体の長期的堅牢性も向上します。

メソッドの LOD は、黒コショウ中の 81 % のターゲットで 1 ng/mL 未満で、97 % のターゲットで 10 ng/mL で達成しています。LOQ は、EU 農薬データベースで規定されている、黒コショウマトリックス中の化合物の MRL 要件を満たしており、日々残留農薬分析を行うラボに優れた結果をもたらします。バッチ内分

析およびバッチ間分析によってワークフローの再現性を評価し、黒コショウ中の 500 種を超える残留農薬の定量で高い再現性と信頼性の高い分析性能が明らかになりました。これはまた、高濃度色素や脂肪分を含む他の複雑な乾燥食品のマトリックスに拡張できる可能性をも示唆しています。

## 参考文献

1. SANTE/11312/2021: Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.
2. Quantitative Analysis of Multiresidue Pesticides in Food Matrices Using Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System – Method Protocol, **2022**.
3. [www.agilent.com/chem/standards](http://www.agilent.com/chem/standards)
4. Zou, A. et al. Comprehensive LC/MS/MS Workflow of Pesticide Residues in Food Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System, Agilent Technologies application note, publication number 5994-2370EN, **2020**.
5. Zou, A. et al. Analysis of 510 Pesticide Residues in Honey and Onion on an Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System, Agilent Technologies application note, publication number 5994-3573EN, **2021**.

6. Zhao, L.; Wei, T.-C. 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**.
7. 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**.
8. Zhao, L.; Lucas, D. Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS によるアボカド中の農薬残留物の分析, Agilent Technologies application note, publication number 5991-6098JAJP, **2015**.
9. EURL-FV (2017-M21) Evaluation of Different Extraction.
10. EU Pesticides Database (v.2.2), **2022**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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。

DE87036491

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, April 28, 2022

5994-4768JAJP