

# AOAC 色素用 dSPE と Carbon S クリーンアップおよび LC/MS/MS による ホウレンソウ中の残留農薬の分析

## 著者

Christopher Ferlin and  
Limian Zhao  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

本アプリケーションノートでは、LC/MS/MS による有機生ホウレンソウ中の 26 種の残留農薬分析に Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 色素のある野菜・果実用分散固相抽出 (dSPE) キットと Carbon S クリーンアップを組み合わせる方法について解説します。分析化合物は、一般的に使用されるさまざまなクラスの農薬から代表的なものを選択しました。Carbon S を用いるこの AOAC 色素用 dSPE キットの場合、グラファイトカーボンブラック (GCB) を用いる従来の AOAC 色素用 dSPE キットに比べ、分析対象物の回収率が向上し、同等の色素除去能力も得られます。Carbon S を用いる AOAC 色素用 dSPE キットの 2 つの形式 (2 および 15 mL) によって、平均回収率 >80 %、ターゲットの RSD <20 %、ホウレンソウ色素マトリックスの色素除去 >95 % と、一貫した性能が得られることが裏付けられました。

## はじめに

生の果実や野菜には、緑色野菜のクロロフィルやルテインのように、天然色素が非常に多く含まれる場合があります。こういった色素は、有機溶媒によって容易に抽出可能です。色素性共抽出物の除去を十分に行わずに LC/MS/MS や GC/MS/MS といった機器に色素を多く含むサンプル抽出物の直接注入を行った場合、複数のマトリックス効果を招く恐れがあります。こういった効果には、LC/MS/MS でのマトリックスイオン抑制、GC/MS/MS でのマトリックス干渉、検出流路や MS イオン源へのマトリックス蓄積などがあります。このため、機器による分析に先立って効率的なクリーンアップを行って、色素性共抽出物を除去することが重要です。

通常、QuEChERS 分散 SPE キットでは、望まない色素マトリックス干渉を除去するためのクリーンアップステップとして、GCB を使用しています。GCB は色素除去で効率性に優れている一方で、特定の農薬、特に平面化合物の回収率を低下させる場合もあります。Agilent 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。この改良型吸着剤は、植物由来のサンプルマトリックスから、GCB 吸着剤と同等またはそれ以上の色素を除去できるとともに、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ることができます。

本研究では、26 種類の代表的な農薬を用いて、生のホウレンソウ粗抽出物のマトリックススクリーンアップステップとして Carbon S (Carbon S を使用する AP-dSPE) を使用する Agilent Bond Elut AOAC 色素用 dSPE キットとその対照として、GCB (GCB を使用する AP-dSPE) を使用する Agilent Bond ELut AOAC 色素用 dSPE とを比較し、その性能を評価しました。農薬は、さまざまな農薬クラスから一般的に分析される代表的なものを選択しました。効果的なクリーンアップ手順を行わないと農薬分析が非常に困難になると考えられる、高濃度のクロロフィルマトリックスを代表するマトリックスとしてホウレンソウを選択しました。

## 実験方法

### 材料および試薬

農薬標準と内部標準 (IS) にはいずれも、Agilent Technologies の標準混合原液 (部品番号 5190-0551) または Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) の個別の標準原液または粉末を使用しました。LC/MS グレードのアセトニトリル (ACN) および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 から購入しました。

### 溶液および標準試料

混合標準スパイク溶液 (26 種類の農薬) および IS スパイク溶液は、10 µg/mL 濃度の ACN 溶液に調製し、フリーザーに -20°C で保管しました。標準スパイク溶液は、使用前に室温で十分に解凍したうえで超音波処理し、使用後はフリーザーに戻しました。

1% 酢酸含有 ACN 抽出溶媒は、10 mL の氷酢酸を 990 mL の ACN に添加して調製し、室温で保管しました。

### 実験器具と材料

本研究は、Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)、Agilent 1260 Infinity II バイアルサンプリング (G7129C) および Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A) で構成される Agilent 1260 Infinity II LC システムを使って行いました。LC システムを、Agilent Jet Stream Electrospray イオン源搭載の Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS システム (G6465B) に接続しました。データの取り込みと分析には、Agilent MassHunter Workstation 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機器は以下のとおりです。Sorvall ST 16R 遠心分離機 (Thermo Scientific Inc.、マサチューセッツ州、米国)、ピペット (Eppendorf、ニューヨーク州、米国)、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キット (部品番号 5982-5755)、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 色素のある野菜・果実用 dSPE キット 2 mL (Carbon S) (部品番号 5610-2062)、Agilent Bond Elut QuEChERS 色素のある・果実用 dSPE キット 15 mL (Carbon S) (部品番号 5610-2064)、Agilent セラミックホモジナイザー (50 mL) (部品番号 5982-9313)。

### 分析条件

表 1 に LC/MS/MS 条件を、表 2 にはターゲットの dMRM パラメータを一覧で示しています。図 1 に、QuEChERS AOAC 抽出後、Carbon S クリーンアップを用いる AP-dSPE を行って調製した 100 ng/g 濃度レベルのホウレンソウ農薬混合物添加サンプル中のターゲット農薬の典型的な MRM クロマトグラムを示しています。

表 1. LC/MS/MS メソッド条件

HPLC 条件			
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 カラム、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 959758-902)		
ガードカラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 と UHPLC ガード、2.1 × 5 mm、1.8 μm (部品番号 821725-901)		
カラム温度	35 °C		
注入量	2 μL		
移動相	A) 10 mM NH <sub>4</sub> OAc、0.5 mM NH <sub>4</sub> F バッファー、0.125 % 酢酸水溶液 B) 10 mM NH <sub>4</sub> OAc、0.5 mM NH <sub>4</sub> F バッファー、0.125 % 酢酸溶液 (ACN/H <sub>2</sub> O 95:5)		
ニードル洗浄	ACN/MeOH/IPA/ H <sub>2</sub> O 1:1:1:1		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)
	0.00	15	0.3
	6.00	95	0.3
	8.00	100	0.3
	10.00	100	0.3
	10.01	15	0.3
13.00	停止		
ポストラン	2分		
合計サイクルタイム	15分		

MS 条件	
モード	ポジティブモード
ガス温度	120 °C
ガス流量	12.0 L/min
ネブライザ	40 psi
キャピラリー	4,500 V (ポジティブおよびネガティブ)

表 2. ターゲット農薬の dMRM パラメータ

分析対象物	MRM チャンネル (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	RT (分)
メタミドホス	1) 142 & 125	90	13	1.16
	2) 142 & 94		13	
アセフェート	1) 184 & 142.9	65	9	1.25
	2) 184 & 49		21	
ピメトロジン	1) 218.1 & 104.9	115	21	1.25
	2) 218.1 & 78		53	
オメトエート	1) 214 & 183	100	9	1.36
	2) 214 & 124.9		21	
プロパモカルブ	1) 189.2 & 102	72	4	1.52
	2) 189.2 & 74		26	
カルベンダジム	1) 192.1 & 132	115	33	2.60
	2) 192.1 & 159.9		17	
チアベンダゾール	1) 202 & 131	145	37	3.14
	2) 202 & 175.1		29	
エチリモール	1) 210.2 & 140.1	96	17	4.38
	2) 210.2 & 70.1		34	
イミダクロプリド	1) 256.1 & 209.1	105	13	4.46
	2) 256.1 & 175.1		21	
ジメトエート	1) 230 & 199	85	5	4.61
	2) 230 & 124.9		25	
フルメツラム	1) 326.1 & 129	72	26	4.98
	2) 326.1 & 109.1		62	
フェノプロカルブ	1) 208.1 & 115.9	74	2	5.36
	2) 208.1 & 89		14	
チジアズロン	1) 221 & 51.1	72	80	5.48
	2) 221 & 102.1		14	
イマザリル	1) 297.1 & 159	140	21	5.87
	2) 297.1 & 41.2		37	

分析対象物	MRM チャンネル (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	RT (分)
プロボスキル	1) 210.1 & 110.9	75	13	6.00
	2) 210.1 & 168		5	
アミドスルフロン	1) 370.1 & 218	104	25	6.09
	2) 370.1 & 260.9		10	
カルバリル	1) 202.1 & 145.1	70	9	6.23
	2) 202.1 & 126.9		33	
ホルクロルフェヌロン	1) 248.1 & 129	72	13	6.26
	2) 248.1 & 93.1		42	
アトラジン-d <sub>5</sub> (IS)	1) 220.13 & 69	76	70	6.38
	2) 220.13 & 178.9		18	
スピロキサミン	1) 298.3 & 144.1	76	21	6.50
	2) 298.3 & 58.1		54	
クロラントラニプロール	1) 482 & 284	72	33	6.89
	2) 482 & 177.1		70	
ベンコナゾール	1) 284.1 & 159	130	37	7.73
	2) 284.1 & 70.1		17	
シプロジニル	1) 226.1 & 92.9	165	41	7.94
	2) 226.1 & 77		53	
ピラクロストロピン	1) 388.1 & 193.9	72	12	8.40
	2) 388.1 & 133.1		38	
ニコスルフロン	1) 411.1 & 209.1	72	10	9.07
	2) 411.1 & 143.9		18	
プロキナジド	1) 373 & 331	72	13	9.92
	2) 373 & 145		62	
スピロジクロフェン	1) 411.1 & 42.9	72	64	10.05
	2) 411.1 & 70.9		14	

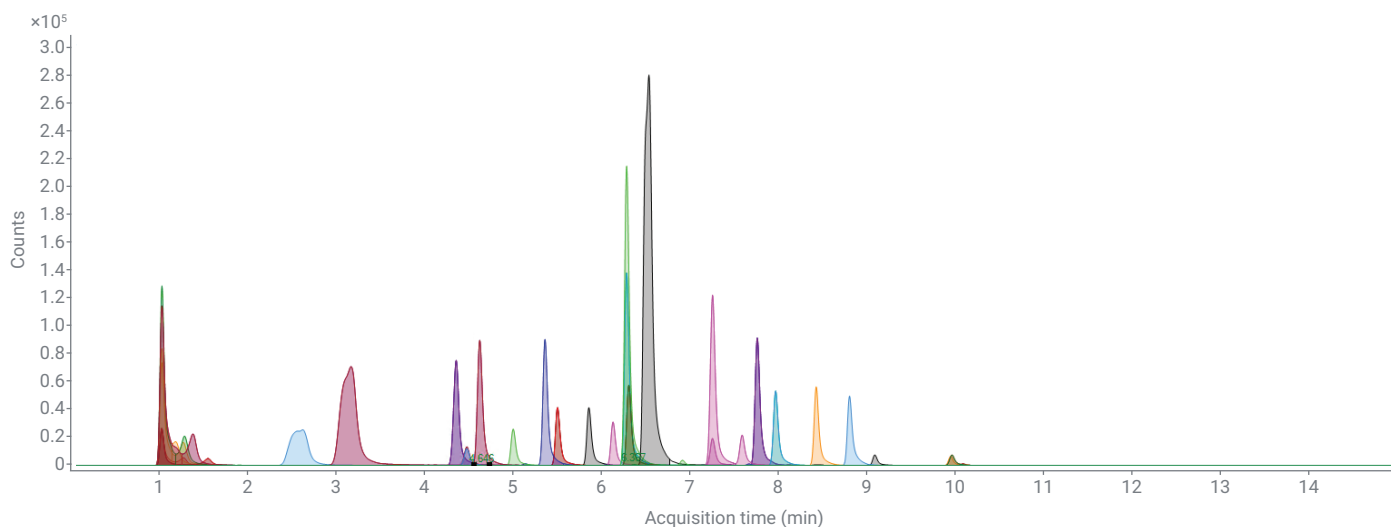


図 1. IS とともに 100 ng/g の 26 種のターゲット農薬を添加したホウレンソウ抽出サンプルの LC/MS/MS MRM クロマトグラム。サンプルは、QuEChERS AOAC 抽出キットで抽出後、Carbon S クリーンアップを使用する AP-dSPE キットを使用して調製しました。溶出順に基づくピーク同定については、表 2 をご覧ください。

### サンプル前処理

生の有機ホウレンソウは、地元の食品店で購入しました。サンプルを  $-20^{\circ}\text{C}$  で一晩凍らせてから、グラインダーで均質化しました。次に、細かく挽いたマトリックスサンプルを 15 g 計量し、50 mL 遠心分離チューブに入れ、抽出まで  $-20^{\circ}\text{C}$  でフリーザーに保管しました。計量したスプリングミックスサンプル (15 g) を解凍し、QuEChERS AOAC メソッドにしたがって抽出しました。Carbon S 2 mL チューブ AP-dSPE については、1 mL の粗抽出物をピペットで移しました。Carbon S 15 mL チューブ AP-dSPE については、8 mL の粗抽出物を移しました。GCB を用いる AP-dSPE については、同じ量の同じ粗抽出物を 2 mL チューブまたは 15 mL チューブに移しました。すべてのチューブをしっかりと密栓して 2~3 分ボルテックスした後、遠心分離機にかけました。次に、サンプルの上清を 5 倍の水で希釈し、ACN 20 に対して水 80 の最終サンプルを産生しました。希釈サンプルを LC/MS/MS 分析用に注入しました。希釈サンプル前処理手順を図 2 に示します。

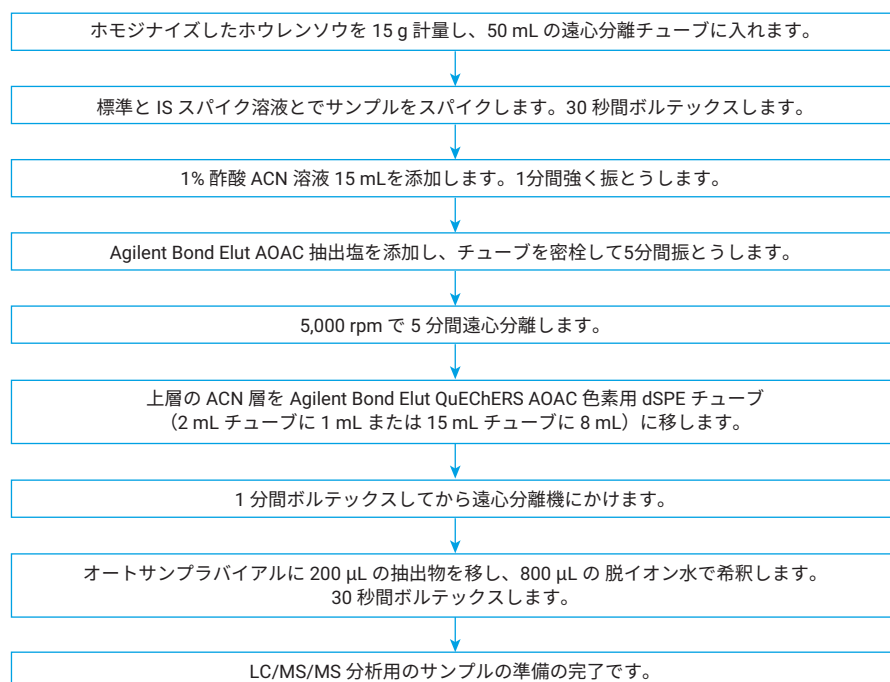


図 2. QuEChERS AOAC 抽出キットによる抽出後、AP-dSPE クリーンアップを行う、生のホウレンソウサンプルのサンプル前処理手順

## 結果と考察

### Carbon S を用いる AP-dSPE と GCB を用いる AP-dSPE

ターゲット回収率と再現性について、Carbon S を使用した Bond Elut AP-dSPE と GCB を使用した類似の AP-dSPE とを比較しました。同じサンプル抽出物からの粗抽出物量を考慮し、2 mL dSPE チューブを使用して比較研究を行いました。サンプルを 6 回繰り返し分析で前処理しました。各サンプルは 10 ng/g のターゲットと 100 ng/g の IS (アトラジン-d<sub>5</sub>) でプレスパイクしました。図 3 に、ホウレンソウマトリックス中の 26 種のターゲットの回収率と RSD (%) を示しています。

Carbon S を用いる AP-dSPE の平均回収率の方が概して高く (72%)、各分析対象物の回収率は 40 ~ 97% でした。一方、GCB を用いる AP-dSPE は平均回収率が低く (64%)、各分析対象物の回収率は 9 ~ 106% でした。回収率の大幅な改善は、ピメトロジン、カルベンダジム、チアベンダゾール、チジアズロン、ホルクロルフェニユロン、シプロジニル、プロキナジドといった典型的な平面構造の農薬で得られました (図 3)。ただし、いくつかの平面構造の分析対象物では、改善したとはいえ、依然回収率が低いことは注目に値します。パススルークリーンアップ形式を用いた場合にはるかに優れた回収率を達成していることから、これは、dSPE クリーンアップの形式に関係しています<sup>1</sup>。非平面構造の農薬については回収率に差はなく、顕著な差があるのは 2 ~ 3 の農薬に限られます。

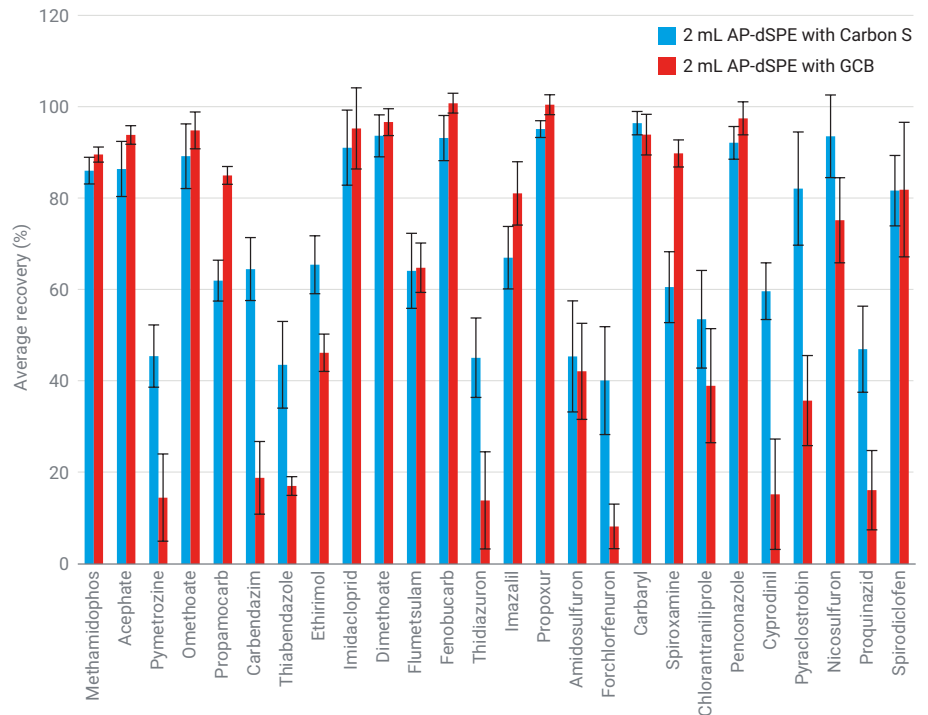


図 3. ホウレンソウ中の 26 種の代表的農薬の分析についての、Carbon S を用いる Agilent Bond Elut AP-dSPE と GCB を用いる AP-dSPE との比較

## Carbon S を用いる AP-dSPE の 2 mL と 15 mL

Carbon S を用いる AP-dSPE の 2 つの形式 (2 mL と 15 mL) については、性能の一貫性についてさらに調査を行いました。2 mL キットを使用した場合のターゲットの平均回収率は 80 %、15 mL キットを使用した場合のターゲットの平均回収率は 81 % で、RSD は平均で <15 % でした。いずれの場合も、平均変動率は RSD 15 % 未満で、許容範囲内でした。Carbon S の含有比は、いずれの形式でも同じでした。図 4 に、2 つの異なる dSPE キットを使用した場合の一貫した回収率を農薬別に示しています。

## 色素除去

Carbon S を用いる Agilent Bond Elut AP-dSPE は色素を多く含むマトリックス除去向けに開発され、ホウレンソウ中のマトリックス色素の除去について評価済みです。図 5 に、Carbon S を用いる AP-dSPE と対照の GCB を用いる AP-dSPE のマトリックス色素除去を、サンプルの色の視覚的な比較と 450 nm 領域で LC-UV によって得た UV 吸収とで示しています。これらの結果から、Carbon S を用いる AP-dSPE はホウレンソウマトリックスから 96 % のクロロフィル色素を除去したことが裏付けられました。これは、GCB を用いる AP-dSPE で得られる 98 % の色素除去率と同等の結果です。

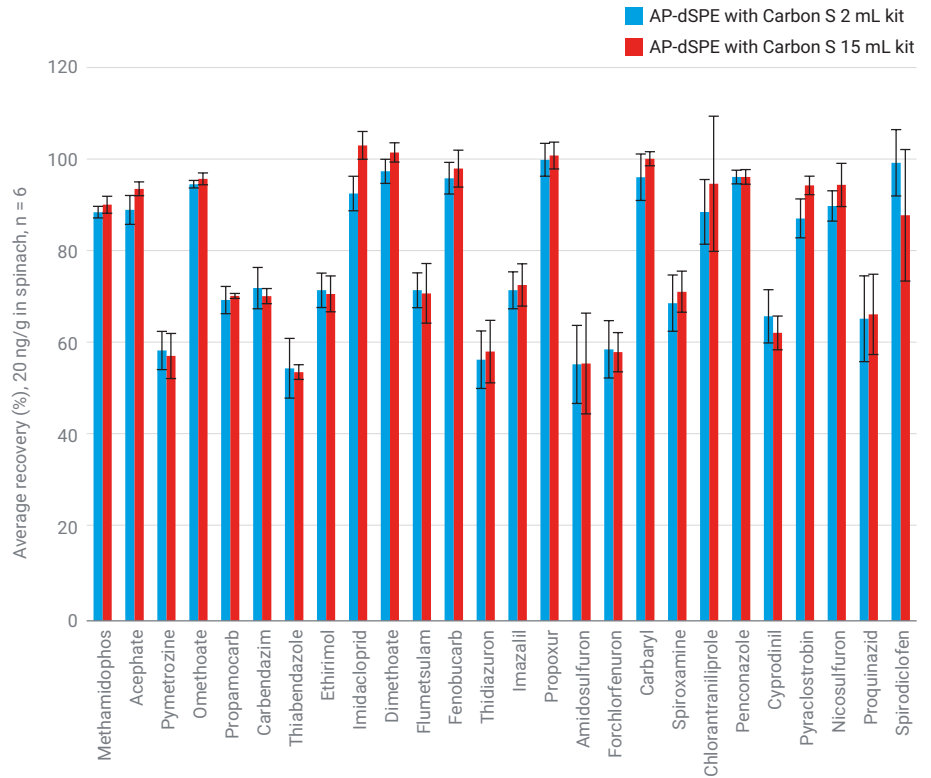


図 4. Carbon S を用いる AP-dSPE の 2 mL キットと 15 mL キットを使用した場合のホウレンソウ中の農薬分析の一貫した性能

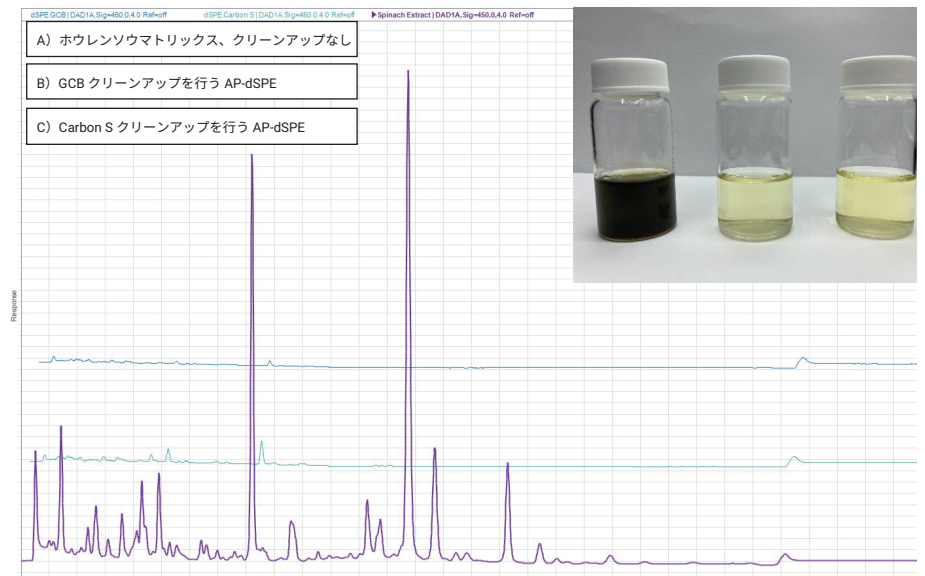


図 5. Carbon S を用いる Agilent Bond Elut AP-dSPE と GCB を用いる AP-dSPE を使用した場合のマトリックス色素除去の比較。クロマトグラムは、450 nm 領域で LC-UV で得ました。

## メソッドの検証

メソッドは、4回の繰り返し分析で、ホウレンソウ中 10 ng/g と 100 ng/g の 2 種類のスパイク濃度のホウレンソウで検証しました。アトラジン-D<sub>5</sub> を IS として使用し、各 QC サンプルに対して 100 ng/g でスパイクしました。9つの標準液は、ホウレンソウ中 5 ~ 2,500 ng/g の濃度で、Carbon S を用いる 15 mL Bond Elut AP-dSPE で調製したマトリックスブランクで調製しました。7 種類以上のキャリブレーション濃度を用いて、各化合物の検量線を生成しました。各検量線には、直線回帰と 1/x<sup>2</sup> 重み付けを用いています。ターゲットの検量線の直線性は、図 3 に示すように、ほとんどのターゲットで相関係数 (R<sup>2</sup>) >0.99 を得ていることで示されています。

ターゲットの精度は、非平面構造の分析対象物で 43 ~ 110 %、平面構造の農薬で 35 ~ 69 % でした (表 3)。GCB の代わりに Carbon S 吸着剤を用いることで大幅に改善したとはいえ、平面構造のターゲットで精度が低い結果となったのは、dSPE クリーンアップによる低回収率に関係しています。形式と方法の改善によって、影響を受けやすい農薬で優れた定量結果を得られる可能性があります<sup>1</sup>。すべての分析対象物で、RSD は <16 % となり、多くのターゲットで一桁の RSD となりました。dSPE キットで GCB の代わりに Carbon S 吸着剤を用いる場合に、再現性の向上というもう一つのメリットが得られました。

この結果は、Carbon S を用いる Bond Elut AP-dSPE によってホウレンソウ中の農薬分析のためのメソッドの精度と再現性が向上することを示すとともに、GCB を用いる既存の AP-dSPE にそのまま置き換えられることも示しています。

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](mailto: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。

DE96164012

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, May 5, 2022

5994-4769JAJP

表 3. Carbon S を用いる AP-dSPE を使用した場合の、ホウレンソウ中の 2 つのスパイク濃度の検量線範囲と精度

分析対象物	キャリブレーション範囲 (ng/g)	R <sup>2</sup>	10 ng/g 精度 (%)	RSD (n = 4)	100 ng/g 精度 (%)	RSD (n = 4)
メタミドホス	5 ~ 1,250	0.9920	87.2	2.5	97.7	6.1
アセフェート	5 ~ 1,250	0.9927	88.0	2.4	93.0	6.1
ピメトロジン	5 ~ 1,250	0.9956	62.3	4.5	40.2	6.2
オメトエート	5 ~ 500	0.9962	95.4	2.6	100.6	6.3
プロパモカルブ	5 ~ 500	0.9942	71.6	3.1	69.6	7.0
カルベンダジム	5 ~ 500	0.9920	68.6	3.5	54.7	6.8
チアベンダゾール	5 ~ 500	0.9907	49.2	4.3	45.0	5.5
エチリモール	5 ~ 1,250	0.9882	70.6	2.8	64.7	6.8
イミダクロプリド	5 ~ 1,250	0.9885	100.7	6.1	107.0	5.3
ジメトエート	5 ~ 2,500	0.9840	97.8	2.3	99.2	6.6
フルメツラム	5 ~ 1,250	0.9891	71.1	5.2	65.3	7.0
フェノピカルブ	5 ~ 1,250	0.9850	106.6	1.1	110.5	6.1
チジアズロン	5 ~ 1,250	0.9933	53.9	3.5	45.3	4.4
イマザリル	5 ~ 2,000	0.9901	75.5	4.7	83.2	4.4
プロボスキル	5 ~ 1,250	0.9904	104.4	2.1	110.1	6.6
アミドスルフロン	5 ~ 2,000	0.9952	87.6	6.9	67.9	8.0
ホルクロルフェメロン	5 ~ 2,000	0.9989	41.8	4.9	35.1	7.4
カルバリル	5 ~ 2,500	0.9979	97.1	4.8	108.6	5.6
スピロキサミン	5 ~ 1,250	0.9894	69.3	4.1	62.8	5.7
クロラントラニリプロール	5 ~ 1,250	0.9947	94.8	4.1	69.5	8.5
ペンコナゾール	5 ~ 2,000	0.9985	94.1	1.9	105.9	6.1
シプロジニル	5 ~ 500	0.9948	59.9	5.6	51.3	7.9
ピラクlostロビン	5 ~ 500	0.9982	81.1	6.3	70.0	5.7
ニコスルフロン	5 ~ 500	0.9977	82.5	4.7	87.7	6.2
プロキナジド	5 ~ 2,000	0.9960	43.1	6.2	33.2	7.4
スピロジクロフェン	5 ~ 2,000	0.9881	107.5	10.6	90.5	6.2

## 結論

Carbon S を用いる Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 色素のある野菜・果実用 dSPE キットを用いた場合、従来の GCB を用いる Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 色素のある野菜・果実用 dSPE キットに比べ、同等の高濃度のクロロフィルマトリックス色素を除去でき、平面構造の農薬の回収率も改善できることが証明されました。このため、GCB を用いる既存の AP-dSPE キットにそのまま置き換えられると考えられます。Carbon S を用いる AP-dSPE の 2 mL と 15 mL のいずれの形式でも、一貫したターゲットの定量結果と色素除去が得られることが裏付けられました。

## 参考文献

1. Zhao, L.; Wei, T. Capitva EMR-HCF パススルークリーンアップと LC/MS/MS を用いた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, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4765JAJP, **2022**.