

# Agilent サンプリーク QuEChERS EN キットを使用した LC/MS/MS 検出による 緑茶中の残留農薬の分析

## アプリケーションノート

食品安全性

### 著者

Chen-Hao Zhai  
Agilent technologies Co., Ltd.  
412 Yinglun Road  
Shanghai, 200131  
China

### 概要

このアプリケーションノートでは、緑茶中のさまざまな系統の農薬を代表する 12 種類の残留農薬の抽出とクリーンアップを行う高速 (Quick)、簡単 (Easy)、低価格 (Cheap)、効果的 (Effective)、堅牢 (Rugged)、そして安全 (Safe) な QuEChERS EN サンプル前処理アプローチについて説明します。オリジナルの EN 法には、緩衝液/アセトニトリル系での初期抽出、塩の添加による抽出/分配ステップ、分散固相抽出 (分散 SPE) を使用したクリーンアップステップが含まれます。緑茶抽出物に含まれる対象農薬の存在は、正イオンマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで動作する、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析計 (LC-ESI-MS/MS) と組み合わせた液体クロマトグラフィーで定量しました。すべての対象化合物の回収率と再現性について、このメソッドのバリデーションを行いました。このアプリケーションで示した、緑茶に含まれる農薬についての 5 ng/g の定量下限 (LOQ) は、最大残留限界 (MRL) よりも大幅に低い値でした。回収率テストのスパイクレベルは 10、50、および 250 ng/g でした。ほとんどの農薬の平均回収率の範囲は 87~108 % (平均で 93.5 %) であり、RSD は 10 % 未満 (平均で 5.2 %) でした。



Agilent Technologies

## はじめに

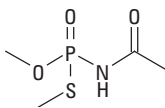
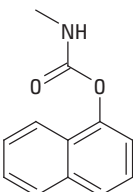
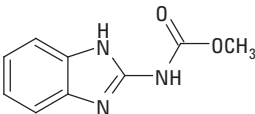
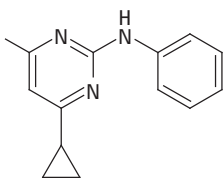
EN QuEChERS メソッドは、特に欧州において食品中の農薬分析で広く使用されています [1-2]。このメソッドでは、アセトニトリル抽出を使用し、次に、分配を引き起こすために無水硫酸マグネシウム ( $MgSO_4$ )、NaCl、および緩衝作用を持つクエン酸塩を使用したサンプルからの塩析を行います。クリーンアップでは、一級/二級アミンの両方をもつ充填剤 (PSA) 使用した分散固相抽出 (分散 SPE) を採用して、サンプルマトリックスから有機酸を除去し、無水硫酸マグネシウムを使用して、抽出物中の残留水を除去します。食品マトリックスに応じて、色素およびステロールを除去するためのグラファイトカーボンブラック (GCB) や、脂質およびろうを除去するための C18 など、その他の充填剤をこのステップに追加することができます。

緑茶は高濃度のクロロフィルが含まれるため、色素含有量の多いサンプルと見なされます。したがって、このアプリケーションには色素含有量が多い物質向けの EN 分散 SPE キットを選択しました。このキットでは、1 mL のサンプルボリュームに対して 25 mg の PSA と 150 mg の  $MgSO_4$  を使用します。ACN 抽出液 1 mL あたり 7.5 mg の GCB を追加してあります。GCB は色素やステロールなどの平面分子を

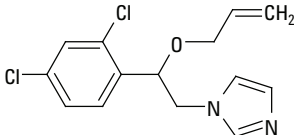
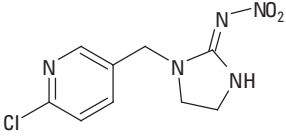
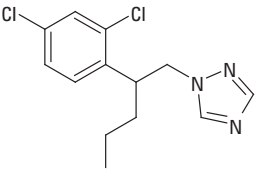
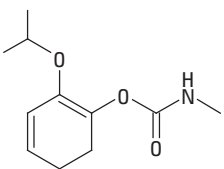
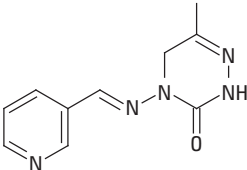
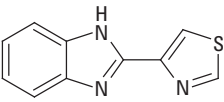
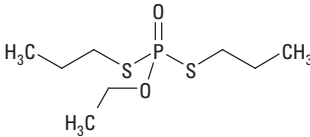
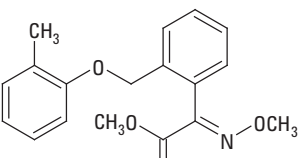
吸着するため、緑茶など色素が含まれるマトリックスのクリーンアップに非常に有効です。クリーンアップの効率は使用する GCB の量に依存します。使用する GCB を増やすほど、吸着される平面分子が増えるため、クリーンなサンプルマトリックスが得られます。AOAC メソッドでは比較的多くの GCB を使用しますが (ACN 抽出液 1 mL あたり 50 mg の GCB)、EN メソッドで使用する GCB は非常に少なく抑えられています (「色素を含む」製品には ACN 抽出液 1 mL あたり 2.5 mg の GCB、「色素含有量の多い」製品には ACN 抽出液 1 mL あたり 7.5 mg の GCB)。GCB は平面構造を持つ農薬の抽出に影響を与えます。AOAC メソッドの方が最終的なサンプルマトリックスがクリーンになりますが、平面構造の農薬は大幅に失われます。これに対し、EN メソッドでは平面構造の農薬はほとんど、あるいはまったく失われませんが、サンプルマトリックスはより複雑になります。

このテストでは、12 種類の農薬を使用して、Agilent サンプリーク EN バッファー付き抽出キット (部品番号 5982-5650) と色素含有量の多い果物および野菜用のサンプリーク QuEChERS EN 分散 SPE キット (部品番号 5982-5356) の性能を評価しました。このメソッドのバリデーションは、回収率と再現性について行いました。表 1 に、緑茶に添加したこれらの農薬の化学的情報と規制上の情報を示します。

表 1. 農薬の化学的情報と規制上の情報 [3-5]

名称	系統	Log P	pKa	構造	リンゴ中での MRL (ng/g)*
アセフェート	有機リン酸塩	-0.89	8.35		20
カルバリル	カルバメート	2.36	10.4		50
カルベンダジム	ベンズイミダゾール	1.48	4.2		100
シプロジニル	アニリノピリミジン	4	4.44		500

(続く)

名称	系統	Log P	pKa	構造	リンゴ中での MRL (ng/g)*
イマザリル	イミダゾール	3.82	6.53		20
イミダクロプリド	ネオニコチノイド	0.57	NA		1000
ペンコナゾール	トリアゾール	3.72	1.51		50
プロボスキル	カルバメート	0.14	NA		2000
ピメトロジン	ピリジン	-0.19	4.06		600
チアベンダゾール	ベンズイミダゾール	2.39	4.73 12.00		50
エトプロホス	有機リン酸塩	2.99	NA		5
クレソキシムメチル	ストロビルリン	3.4	NA		50

## 実験方法

### 試薬

すべての試薬と溶媒は HPLC または分析グレードのものです。メタノール (MeOH) とアセトニトリル (ACN) は Honeywell (米国、ミシガン州、マスキーゴン) から購入しました。ギ酸 (FA) は Fluka (ドイツ、スラインハイム) から購入しました。農業標準物質は Sigma-Aldrich (米国、ミズーリ州、セントルイス) から購入しました。内部標準 (リン酸トリフェニル、TPP) は Agilent Technologies Inc. (米国、デラウェア州、ウィルミントン) から入手しました。

### 標準溶液

標準および内部標準 (IS) 原液 (カルベンダジムの 0.5 mg/mL を除き 2.0 mg/mL) を、MeOH、0.1 % FA 含有 ACN 溶液、および DMSO でそれぞれ調製し、-20 °C で保存しました。0.2、1、および 10 µg/mL の 3 段階の QC スパイク溶液は、ACN/水 (1:1) (0.1 % FA 含有) で毎日調製しました。ACN/水 (1:1) (0.1 % FA 含有) に溶解した TPP の 2 µg/mL 溶液を IS スパイク溶液として調製しました。

### 装置および材料

Agilent 1200 シリーズ HPLC (Agilent Technologies Inc.、米国、カリフォルニア州)

エレクトロスプレーイオン化を使用した Agilent 6410 トリプル四重極 MS システム (Agilent Technologies Inc.、米国、カリフォルニア州)

Agilent サンプリーク QuEChERS EN バッファー付き抽出キット (部品番号 5982-5650) および色素含有量の多い果物および野菜用のサンプリーク QuEChERS EN 分散 SPE キット (部品番号 5982-5356) (Agilent Technologies Inc.、米国、デラウェア州)

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 Technologies Inc.、米国、デラウェア州)

エッペンドルフマイクロ遠心分離機 (Brinkmann Instruments、米国、ニューヨーク州、ウエストベリー)

Flying Pigeon 遠心分離機 (Anting Science Instrument、中国、上海)

### サンプル前処理

#### サンプル粉砕

有機、無農薬栽培の緑茶を Teavana Corp から購入しました。この緑茶を清浄なビニール袋に入れ、-20 °C で一晩冷凍しました。この袋を時折揉みほぐし、茶葉を分散させました。翌日に、必要な量の冷凍茶葉だけを取り出し、十分にかき混ぜました。可能であれば、粉砕時にドライアイスを加えました。サンプルを完全に粉砕し、均質化しました。最終的なサンプルに茶葉の破片が一切見えないことを確認しました。

### 機器の条件 HPLC の条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、 2.1 x 100 mm、2.7 µm、 (部品番号 695775-902)
流量	0.4 mL/min
カラム温度	30 °C
注入ボリューム	10 µL
移動相	A : 5 mM FA 水溶液 B : 5 mM FA ACN 溶液
グラジエント	時間 (分) %B
	0 5
	1 5
	3 50
	7 90
	8 90
	8.2 5
	9 5
ポストラン	2 分間
総サイクルタイム	11 分間

#### MS 条件

##### ポジティブモード

ガス温度	350 °C
ガス流量	10 L/min
ネブライザ	40 psi
キャピラリ	3500 V

分析に関連するその他の条件を表 2 に示します。

### 抽出/分配

2 g (±0.1g) の均質化したサンプルを 50 mL の遠心分離チューブに入れました。QC サンプルに 100 µL の相当する QC スパイク溶液を添加しました。100 µL の IS スパイク溶液 (10 µg/mL の TPP) を、対照ブランクを除くすべてのサンプルに添加し、50 ng/g 濃度になるように調製しました。チューブにキャップを付け、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌しました。ディスペンサを使用して、8 mL の水をそれぞれのチューブに加えました。チューブにキャップを付け、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌しました。50 mL チューブ用セラミックホモジナイザ (部品番号 5982-9313) を各チューブに 2 個入れました。ディスペンサを使用して、10 mL の ACN をそれぞれのチューブに加えました。チューブにキャップを付け、1 分間手で振り混ぜました。4 g の無水 MgSO<sub>4</sub>、1 g の NaCl、1 g のクエン酸三ナトリウム、0.5 g のクエン酸二ナトリウム 1.5 水和物から成る Agilent サンプリーク QuEChERS EN 抽出塩パックをそれぞれのチューブに直接加えました。溶媒がサンプル全体とよく接触し、結晶凝集体が十分に粉砕されるように、チューブを密閉して、手で 20 秒間強く振り混ぜました。サンプルチューブを 4000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

表 2. LC/MS/MS による 12 種類の農薬の分析に使用した機器取り込みデータ

対象化合物	MRM チャンネル (m/z)	フラグメンタ (V)	CE (V)	RT (min)
アセフェート	1) 184.0 > 143.0	60	3	1.66
	2) 184.0 > 95.1		21	
ピメトロジン	1) 218.1 > 105.1	125	21	1.95
	2) 218.1 > 78.1		50	
カルベンダジム	1) 192.1 > 160.1	110	16	3.25
	2) 192.1 > 132.1		32	
チアベンダゾール	1) 202.0 > 175.1	145	26	3.37
	2) 202.0 > 131.1		38	
イミダクロプリド	1) 256.1 > 209.1	125	11	4.02
	2) 256.1 > 175.1		17	
イマザリル	1) 297.1 > 159.0	110	23	4.40
	2) 297.1 > 69.1		17	
プロボスキル	1) 210.2 > 111.1	70	11	4.81
	2) 210.2 > 93.1		23	
カルバリル	1) 202.0 > 145.0	50	5	4.98
	2) 202.0 > 127.1		30	
シプロジニル	1) 226.1 > 93.1	125	40	5.84
	2) 226.1 > 108.1		33	
エトプロホス	1) 243.1 > 130.9	125	19	5.98
	2) 243.1 > 173.0		11	
ペンコナゾール	1) 284.0 > 70.1	120	15	6.20
	2) 284.0 > 159.0		37	
クレソキシムメチル	1) 314.1 > 222.1	90	11	6.62
	2) 314.1 > 235.1		11	
TPP (IS)	1) 327.1 > 77.1	160	49	6.80
	2) 327.1 > 152.1		49	

1) 定量イオン

2) 定性イオン

### 分散 SPE クリーンアップ

上部 ACN 層から 6 mL を Agilent サンプリーク QuEChERS EN 分散 SPE 15 mL チューブ (部品番号 5982-5356) に移しました。15 mL チューブには 150 mg の PSA、900 mg の無水 MgSO<sub>4</sub>、45 mg の GCB が入っています。チューブをキャップで密閉し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌しました。このチューブを、標準的な遠心条件である 4000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液のうち 1 mL を 10 mL チューブに移し、窒素気相下で 40 °C 未満で乾燥させました。得られた残留物を ACN/水 (1/9) を使用して溶解し、1 mL の一定量にしました。次に、残留物を 0.45 μm のメンブレンフィルタ (部品番号 5185-5836) でろ過し、LC/MS/MS で分析しました。

### 結果と考察

推奨に従い、色素含有量が多い製品用の EN 分散 SPE キットをこのテストの緑茶に使用しました。EN メソッドにより処理した最終的なサンプルは、この時点でも緑色に見えましたが、LC/MS/MS の高度な選択性により、マトリックスブランクの MRM クロマトグラムには対象化合物に対する干渉ピークは見られませんでした。図 1 および 2 に、マトリックスブランク (IS をスパイク) と、EN 分散 SPE メソッドによって処理された 50 ng/g の添加済み緑茶抽出物の LC/MS/MS クロマトグラムを示します。

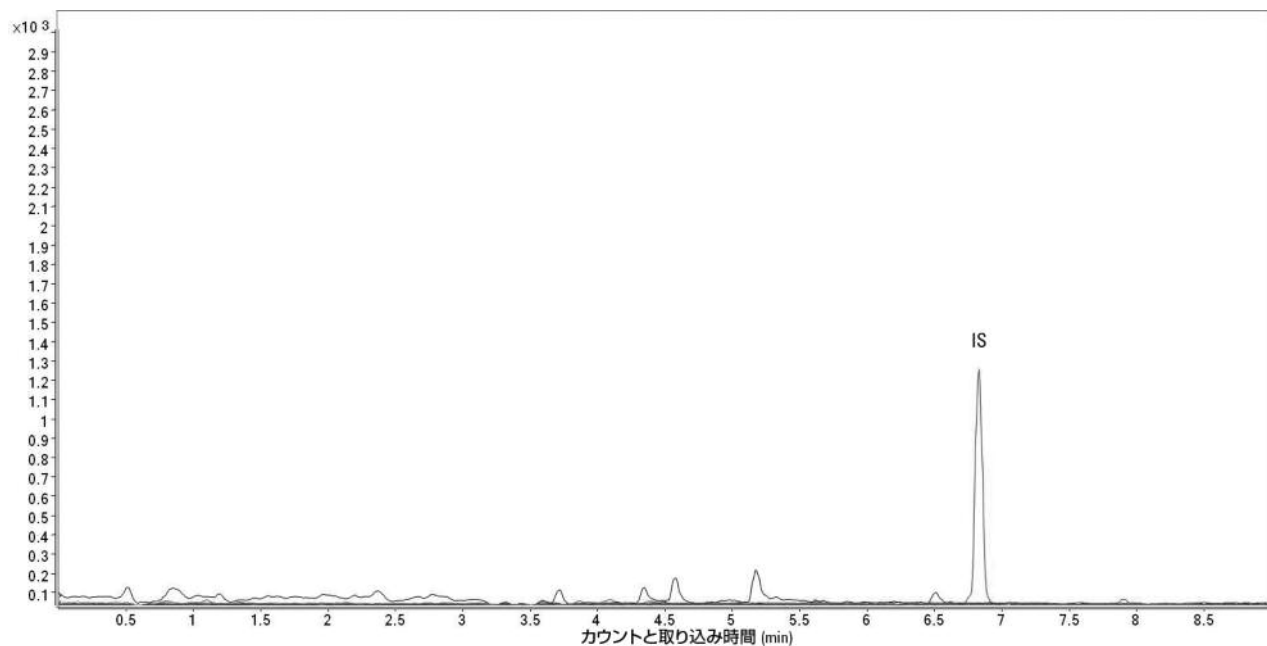


図 1. 緑茶マトリクスブランクの MRM クロマトグラム。ピークの特定 : IS : TPP

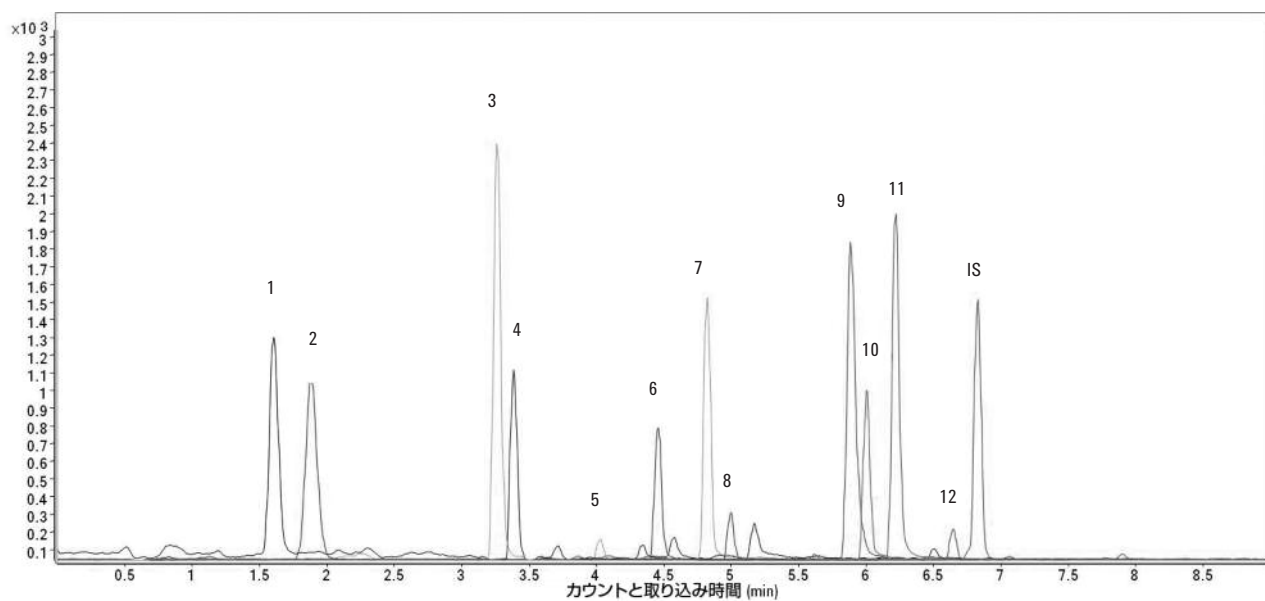


図 2. EN メソッドにより処理された 50 ng/g の添加サンプルの MRM クロマトグラム。ピークの同定 : 1. アセフェート、2. ピメトロジン、3. カルベンダジム、4. チアベンダゾール、5. イミダクロプリド、6. イマザリル、7. プロボスキル、8. カルバリル、9. シプロジニル、10. エトプロホス、11. ベンコナゾール、12. クレソキシムメチル、IS : TPP

### 直線性と定量下限 (LOQ)

テストを行ったすべての農薬の検量線の直線範囲は 5~500 ng/g でした。マトリックスブランクにスパイクして作成した検量線を 5、10、50、250、および 500 ng/g のレベルで作成し、内部標準として 50 ng/g の TPP を使用しました。対象化合物の相対的な濃度 (対象化合物の濃度 / IS の濃度) に対して対象化合物の相対的なレスポンス (対象化合物のピーク面積 / IS のピーク面積) をプロットすることで検量線を作成し

表 3. 緑茶抽出物に含まれる農薬の直線性

名称	帰方程式	R <sup>2</sup>
アセフェート	Y = 2.0260x + 0.0347	0.9995
ピメトロジン	Y = 2.3741x - 0.0141	0.9999
カルベンダジム	Y = 2.9630x + 0.1685	0.9991
チアベンダゾール	Y = 1.5021x - 0.0034	0.9998
イミダクロプリド	Y = 0.0625x - 0.0002	0.9998
イマザリル	Y = 0.9445x + 0.0190	0.9997
プロボスキル	Y = 1.8301x + 0.0362	0.9998
カルバリル	Y = 0.3677x - 0.0014	0.9999
シプロジニル	Y = 3.0000x + 0.0809	0.9991
エトプロホス	Y = 1.2764x + 0.0425	0.9986
ベンコナゾール	Y = 2.7559x + 0.0259	0.9999
クレソキシムメチル	Y = 0.1976x + 0.0119	0.9969

ました。すべての農薬について確立された 5 ng/g の定量下限 LOQ (5 ng/g) は、果物および野菜に含まれるこれらの農薬の MRL よりも低い値です。表 3 に線形回帰方程式と相関係数 (R<sup>2</sup>) を示します。

### 回収率および再現性

10、50、および 250 ng/g のレベルで粉碎したサンプルに農薬標準物質をスパイクすることで、回収率と再現性を評価しました。これらの QC サンプルは、マトリックススパイク検量線を基準に定量しました。各レベルで分析を 6 回繰り返して行いました。回収率および再現性 (RSD として表す) データを表 4 と図 3 に示します。この結果から、11 種類の農薬で優れた回収率と精度が得られたことがわかります。ピメトロジンの回収率は低くなりましたが、高い精度が得られました。ピメトロジンは、pH 5~5.5 における抽出手順の pH の影響を受けやすい、pH 感度の高い農薬です。ピメトロジンと同様に平面構造を持つ農薬のカルベンダジム、チアベンダゾール、プロジニルは、分散 SPE ステップで使用する少量の GCB の存在下で回収率が失われます。

表 4. QuEChERS を使用した添加済み緑茶中の農薬の回収率と再現性

対象化合物	10 ng/g 添加 QC		50 ng/g 添加 QC		250 ng/g 添加 QC	
	回収率	RSD (n=6)	回収率	RSD (n=6)	回収率	RSD (n=6)
アセフェート	80.5 %	5.4 %	91.7 %	2.9 %	88.9 %	8.2 %
ピメトロジン	43.1 %	3.0 %	42.2 %	3.4 %	43.4 %	9.8 %
カルベンダジム	114.6 %	11.6 %	97.6 %	2.0 %	105.0 %	6.2 %
チアベンダゾール	98.1 %	6.9 %	90.4 %	2.4 %	81.7 %	5.8 %
イミダクロプリド	104.3 %	11.7 %	108.6 %	2.5 %	93.9 %	7.9 %
イマザリル	97.5 %	4.4 %	87.8 %	5.6 %	92.4 %	4.6 %
プロボスキル	98.1 %	2.4 %	110.2 %	1.7 %	107.8 %	3.9 %
カルバリル	89.7 %	11.4 %	104.9 %	3.3 %	108.1 %	5.2 %
シプロジニル	84.9 %	2.1 %	92.5 %	3.7 %	93.9 %	5.5 %
エトプロホス	103.4 %	3.1 %	111.2 %	3.2 %	104.9 %	5.7 %
ベンコナゾール	108.7 %	2.9 %	94.3 %	4.5 %	89.8 %	3.3 %
クレソキシムメチル	105.7 %	12.4 %	96.4 %	2.5 %	99.2 %	5.5 %

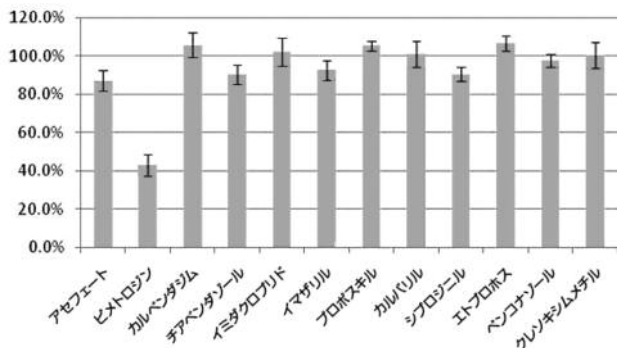


図 3. 緑茶に含まれる 12 種類の農薬の回収率および精度の結果

## 結論

Agilent サンプルーク QuEChERS EN バッファ付き抽出キットと、色素含有量が多い果物および野菜用の分散 SPE キットは、緑茶に含まれる代表的な農薬の簡単、高速、効果的な精製メソッドを提供します。分散 SPE で使用される少量の GCB は平面構造を持つ農薬の抽出に影響を与えません。マトリックスにスパイクした標準物質に基づく回収率と再現性は、緑茶中の多系統、多成分残留農薬測定に対応するものです。

## 参考文献

1. European Committee for Standardization/Technical Committee CEN/TC 275 (2007), Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS method. European Committee for Standardization, Brussels.
2. P. Paya, M. Anastassiades; "Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection", Anal Bioanal Chem., 2007, 389, 1697-1714.

3. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/index.htm>

4. <http://www.m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>

5. <http://www.mrlidatabase.com/?selectvetdrug=0>

## 詳細情報

アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2010

Printed in Japan

September 3, 2010

5990-6400JAJP



**Agilent Technologies**