

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC キットを用いた LC-MS/MS 検出による 米中残留農薬の分析

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Andy 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、AOAC QuEChERS 法による サンプル前処理を用いて、米に含まれる代表的な 12 種類の残留農薬を抽出および精製するアプローチを紹介します。ここで採用したオリジナルの AOAC メソッドは、緩衝液/アセトニトリルシステムでの初期抽出、塩の添加による抽出/分画ステップ、分散固相抽出 (分散 SPE) による精製ステップで構成されます。エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィ (LC-ESI-MS/MS) をポジティブイオンマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで使用し、米抽出液におけるターゲット農薬の存在の有無を測定しました。すべての分析対象農薬について、回収率と再現性の点からメソッドの有効性を確認しました。このアプリケーションで得られた 5 ng/g という農薬の定量下限 (LOQ) は、残留基準値 (MRL) を大きく下回ります。回収実験の添加濃度は 10、50、250 ng/g としました。平均回収率は 76~108 % (平均 97.8 %) で、RSD は 10 % を下回りました (平均 4.7 %)。



Agilent Technologies

緒言

AOAC QuEChERS 法は、食品残留農薬の分析に広く用いられています [1-2]。この方法では、アセトニトリル抽出に続き、無水硫酸マグネシウム ($MgSO_4$)、緩衝剤の酢酸塩を用いてサンプルから水分を塩析し、分画を誘導します。精製ステップでは、第 1 級・2 級アミン (PSA) 充填剤によるサンプルマトリックスからの有機酸の除去と、無水 $MgSO_4$ による抽出液中の残留水分の除去を組み合わせた分散固相抽出 (分散 SPE) が用いられます。このステップでは、それぞれの食品マトリックスに応じて、色素やステロールを除去するグラファイトカーボンブラック (GCB) や、脂質と蠟質を除去する C18 など、その他の充填剤が添加されることもあります。

このアプリケーションでは、脂質と蠟質の含まれる食品用の AOAC 分散 SPE キットを選択しました。このキットはアセトニトリル抽出液 1 mL 当たり、PSA 50 mg、 $MgSO_4$ 150 mg、C18 50 mg を含んでいます。本研究では、12 種類の農薬を用いて、Agilent Bond Elut AOAC バッファ抽出キット (部品番号 5982-5755) と、脂質および蠟質の含まれる果実および野菜用の Bond Elut QuEChERS AOAC 分散 SPE キット (部品番号 5982-5158) の性能を評価しました。方法は回収率と再現性で評価しました。表 1 に、本研究で用いた米中農薬の化学的性質および残留規制情報をまとめられています。

実験手法

試薬と化合物

すべての試薬と溶媒は、HPLC または分析グレードのものを使用しました。メタノール (MeOH) とアセトニトリル (ACN) を Honeywell (米国ミシガン州、マスキーゴン) から入手しました。ギ酸 (FA) を Fluka (ドイツ、Sleinheim) から入手しました。農薬標準品を 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) を Agilent Technologies (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 (すべての農薬で 2.0 mg/mL、ただしカルベンダジムは 0.5 mg/mL) を、MeOH、0.1 % FA を含む ACN、または DMSO を用いて作成し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。0.1 % FA を含む ACN/水 (1:1) を用いて、濃度 0.2、1、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 種類の QC 添加溶液を毎日作成しました。IS 添加溶液として、0.1 % FA を含む ACN/水 (1:1) を用いて 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の TPP 溶液を作成しました。

装置と材料

Agilent 1200 シリーズ HPLC

Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム、
エレクトロスプレーイオン源搭載

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC バッファ抽出キット
(部品番号 5982-5755)、脂質および蠟質の含まれる果実および
野菜用の Bond Elut QuEChERS AOAC 分散 SPE キット (部品番号
5982-5158)

Agilent セラミックホモジナイザー、
50 mL チューブ (部品番号 5982-9313)

エッペンドルフ遠沈管
(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)

HPLC 条件

カラム	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 100 mm、 2.7 μm (部品番号 695775-902)	
流速	0.4 mL/min	
カラム温度	30 $^{\circ}\text{C}$	
注入量	5 μL	
移動相	A : 0.1 % FA を含む水 B : 0.1 % FA を含む ACN	
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	
総サイクル時間	11 分	
MS 条件	ポジティブモード	
ガス温度	350 $^{\circ}\text{C}$	
ガス流速	10 L/min	
ネプライザ	40 psi	
キャピラリ	3500 V	

分析に関連するその他の条件は、表 2 にまとめています。

表 1. 農薬の化学的性質および残留規制情報 [3-5]

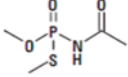
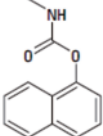
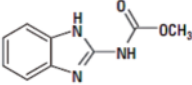
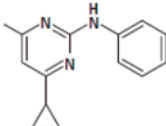
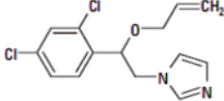
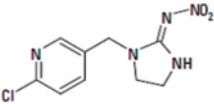
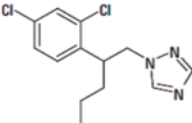
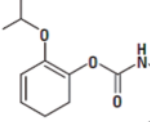
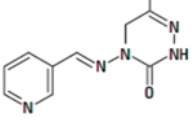
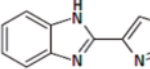
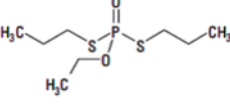
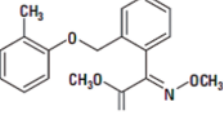
農薬名	種類	Log P	pKa	MRL (ng/g)	構造
アセフェート	有機リン	-0.89	8.35	20	
カルバリル	カルバメート	2.36	10.4	50	
カルベンダジム	ベンゾイミダゾール	1.48	4.2	100	
シプロジニル	アニリノピリミジン	4	4.44	500	
イマザリル	イミダゾール	3.82	6.53	20	
イミダクロプリド	ネオニコチノイド	0.57	NA	1000	
ベンコナゾール	トリアゾール	3.72	1.51	50	
プロボキスル	カルバメート	0.14	NA	2000	
ピメトロジン	ピリジン	-0.19	4.06	600	
チアベンダゾール	ベンゾイミダゾール	2.39	4.73 12.00	50	
エトプロホス	有機リン	2.99	NA	5	
クレソキシムメチル	ストロビルリン	3.4	NA	50	

表 2. 12 種類の農薬 分析に用いた LC-MS/MS 条件

農薬	チャンネル	MRM (m/z)	フラグメンター 電圧 (V)	CE (V)	RT (分)
ビメトロジン	1)	218.1>105	130	20	1.44
	2)	218.1>78.1		50	
アセフェート	1)	184.0>143	65	3	1.59
	2)	184.0>95		20	
カルベンダジム	1)	192.1>160.1	110	15	3.19
	2)	192.1>132.1		30	
チアベンダゾール	1)	202.0>175.1	160	25	3.32
	2)	202.0>131.1		35	
イミダクロプリド	1)	256.1>209	140	10	4.01
	2)	256.1>175		15	
イマザリル	1)	297.1>158.9	150	20	4.43
	2)	297.1>200.9		15	
プロボキスル	1)	210.2>111	70	10	4.81
	2)	210.2>93		25	
カルバリル	1)	202.0>145	70	15	4.99
	2)	202.0>127		40	
シプロジニル	1)	226.1>93	150	37	5.55
	2)	226.1>77		52	
エトプロホス	1)	243.1>130.9	115	15	6.00
	2)	243.1>96.9		35	
ベンコナゾール	1)	284.0>70	125	10	6.22
	2)	284.0>158.9		30	
クレンキシムメチル	1)	314.1>222	70	3	6.66
	2)	314.1>116		5	
TPP (IS)	1)	327.1>77	170	40	6.85
	2)	327.1>152		45	

1) 定量イオン

2) 確認イオン

サンプル前処理

サンプル粉碎

農薬の含まれない有機栽培米を地元のマーケットで購入しました。米を清潔なビニール袋に入れ、-20 °C で一晩冷凍しました。袋をとるとき揉み、米粒が互いにつかないようにしました。翌日、冷凍した米から必要な量だけを採取し、よくかき混ぜました。サンプルを均質にするために、サンプルを完全に粉碎しました。可能な場合は、粉碎中にドライアイスを加えました。最終サンプルで、目に見える大きさの米粒が存在しないことを確認しました。

抽出/分画

均質化したサンプル 5 g (±0.1 g) を 50 mL 遠沈管に入れました。QC サンプルには適合する QC 添加溶液 100 µL を添加しました。対照用ブランクを除くすべてのサンプルに IS 添加溶液 50 µL (10 µg/mL の TPP) を加え、サンプル中濃度を 100 ng/g としました。遠沈管に蓋をして、1 分間ボルテックスミキサーで混合しました。

ディスペンサーを用いて、各遠沈管に水 10 mL を加えました。遠沈管に蓋をして、1 分間ボルテックスミキサーで混合しました。50 mL チューブ用の 2 つのセラミックホモジナイザー (部品番号 5982-9313) を各遠沈管に加えました。ディスペンサーを用いて、ACN (0.1 % FA) 15 mL を各遠沈管に添加しました。遠沈管に蓋をして、1 分間、手で振りましました。無水 MgSO₄ 6 g、酢酸ナトリウム 1.5 g を含む Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出塩パックを、各遠沈管に直接加えました。遠沈管をしっかりと密閉したのち、溶媒とサンプル全体が接触し、塩類結晶の塊が十分に分散するように、20 秒間、手でよく振りましました。サンプルの入った遠沈管を 4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

分散 SPE 精製

ACN 上澄み層 8 mL を Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 分散 SPE 15 mL チューブ (部品番号 5982-5158) に移しました。15 mL チューブには、PSA 400 mg、無水 MgSO₄ 1,200 mg、C18 400 mg が入っています。チューブにしっかりと蓋をして、1 分間ボルテックスミキサーで混合しました。標準的な遠心分離機を用いて、4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 1 mL を 10 mL チューブに移し、40 °C 以下の窒素流で乾燥させました。これにより得られた残留物を、ACN/水 (1/9) に溶解し、1 mL になるように定溶しました。その後、0.45-µm ろ過膜 (部品番号 5185-5836) で残留物をろ過し、LC-MS/MS で分析しました。

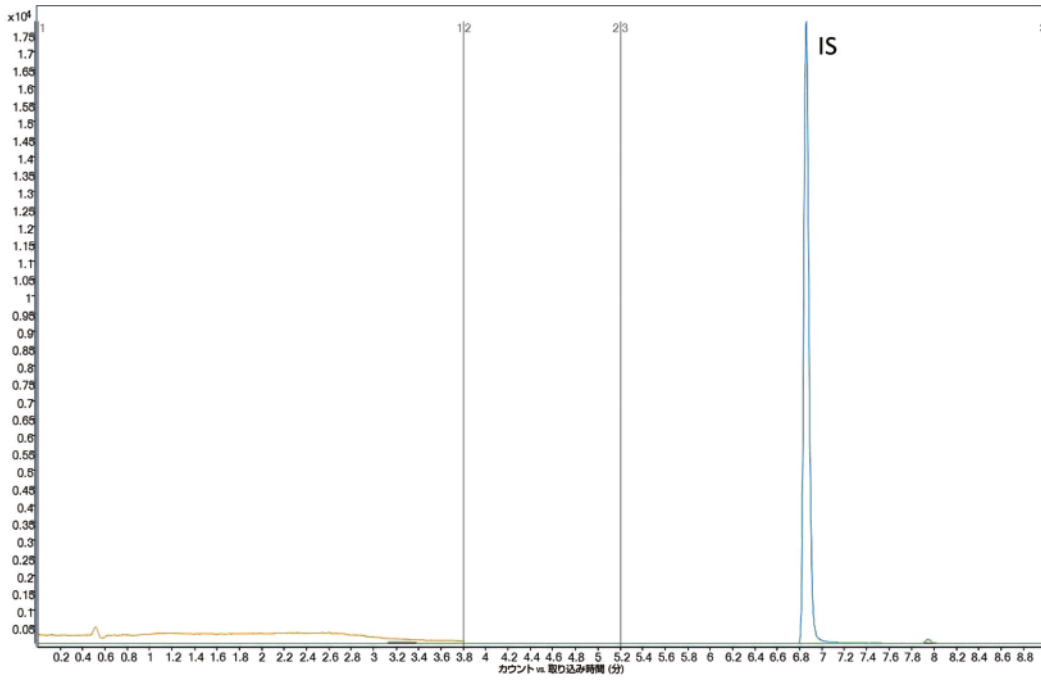


図 1. 米マトリックスブランクの MRM クロマトグラム

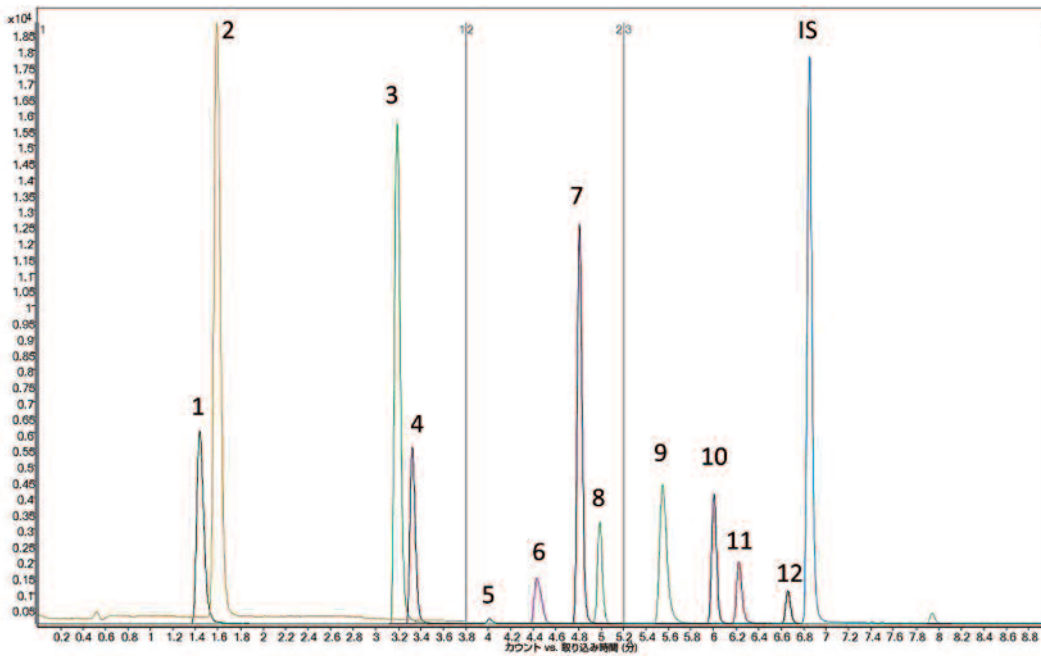


図 2. AOAC メソッドにより処理した米に 10 ng/g 添加したサンプルの MRM クロマトグラム。ピーク番号 : 1. ピメトロジン、
2. アセフェート、3. カルベンダジム、4. チアベンダゾール、5. イミダクロプリド、6. イマザリル、7. プロボキスル、
8. カルバリル、9. シプロジニル、10. エトプロホス、11. ベンコナゾール、12. クレゾキシムメチル、IS : TPP

結果と考察

推奨事項に従い、本研究では、脂質および蠟質の含まれる食品用の AOAC 分散 SPE キットを米の精製に使用しました。LC-MS/MS の優れた選択性のおかげで、マトリックスブランクの MRM クロマトグラムでは、ターゲット化合物に対する干渉ピークは観察されませんでした。図 1 と 2 に、マトリックスブランク (IS 添加) の LC-MS/MS クロマトグラムと、AOAC 分散 SPE メソッドで処理した 10 ng/g 添加米抽出液のクロマトグラムを示します。

表 3. 米抽出液に含まれる農薬の直線性

農薬	回帰方程式	R ²
ピメトロジン	$Y = 1.0525x + 0.3331$	0.997
アセフェート	$Y = 1.2109x + 0.0897$	0.998
カルベンダジム	$Y = 1.9011x + 0.2080$	0.998
チアベンダゾール	$Y = 0.8764x + 0.1622$	0.999
イミダクロプリド	$Y = 0.0778x + 0.0135$	0.991
イマザリル	$Y = 0.3765x + 0.0552$	0.997
プロボキスル	$Y = 1.8122x + 0.6237$	0.993
カルバリル	$Y = 0.5832x + 0.0042$	0.999
シプロジニル	$Y = 1.0002x + 0.3903$	0.998
エトプロホス	$Y = 0.4793x + 0.0783$	0.992
ペンコナゾール	$Y = 1.3872x + 0.0117$	0.996
クレソキシムメチル	$Y = 0.3921x + 0.0058$	0.996

直線性と定量下限 (LOQ)

分析したすべての農薬で、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農薬を添加し、5、10、50、250、500 ng/g の濃度で検量線を作成しました。内部標準として、50 ng/g の TPP を使用しました。検量線の作成にあたっては、分析対象農薬の相対濃度 (分析対象物の濃度/IS の濃度) に対して、分析対象農薬の相対レスポンス (分析対象物のピーク面積/IS のピーク面積) をプロットしました。すべての農薬で、定量下限 (LOQ) は 5 ng/g でした。この値は、果実および野菜に含まれる農薬の MRL を下回っています。表 3 に、直線回帰方程式と相関係数 (R²) を示します。

表 4. QuEChERS を用いた米添加農薬の回収率と再現性

農薬	10 ng/g 添加		50 ng/g 添加		250 ng/g 添加	
	回収率	RSD*	回収率	RSD*	回収率	RSD*
ピメトロジン	80.3 %	4.5 %	76.3 %	3.8 %	90.1 %	4.2 %
アセフェート	85.0 %	2.3 %	92.8 %	3.2 %	96.3 %	1.9 %
カルベンダジム	102.3 %	8.3 %	99.0 %	2.0 %	108.2 %	5.8 %
チアベンダゾール	94.6 %	5.4 %	89.4 %	4.7 %	83.9 %	6.1 %
イミダクロプリド	100.5 %	10.2 %	105.4 %	2.8 %	91.7 %	8.2 %
イマザリル	99.2 %	4.4 %	92.6 %	5.5 %	93.8 %	5.3 %
プロボキスル	96.7 %	3.7 %	103.6 %	1.1 %	108.2 %	2.7 %
カルバリル	88.0 %	5.6 %	100.7 %	3.0 %	108.1 %	3.9 %
シプロジニル	90.3 %	1.9 %	92.5 %	8.9 %	92.4 %	5.1 %
エトプロホス	104.1 %	3.4 %	105.8 %	4.8 %	110.5 %	6.1 %
ペンコナゾール	103.9 %	2.2 %	93.9 %	6.9 %	90.5 %	3.0 %
クレソキシムメチル	107.5 %	10.3 %	94.7 %	2.5 %	100.6 %	2.7 %

*RSD (n=6)

回収率と再現性

粉砕サンプルに 10、50、250 ng/g の濃度で農薬標準品を添加し、回収率と再現性を評価しました。マトリックス添加検量線に照らして、これらの QC サンプルを定量しました。各濃度について、分析を 6 回繰り返しました。回収率と再現性 (RSD として表示) のデータを表 4 と図 3 に示します。これらの結果から、12 種類の農薬で優れた回収率と精度が得られることがわかります。

結論

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC バッファ抽出キットと、脂質および蠟質を含む果実および野菜用の分散 SPE キットを使えば、米に含まれる代表的な農薬の精製において、簡単で高速、かつ効果的なメソッドが実現します。マトリックス添加標準をもとに測定した回収率と再現性は、米に含まれる複数種類の残留農薬測定における許容範囲内でした。ターゲット化合物の定量では、米の不純物やマトリックスの影響による干渉は生じませんでした。各農薬の LOQ は、米の規定 MRL を下回りました。本研究で用いた農薬が、幅広い種類や特性を持つ代表的なものであることを考えると、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出および分散 SPE キットは、同様の食品マトリックスに含まれる他の農薬の分析においても、優れた選択肢であるといえます。

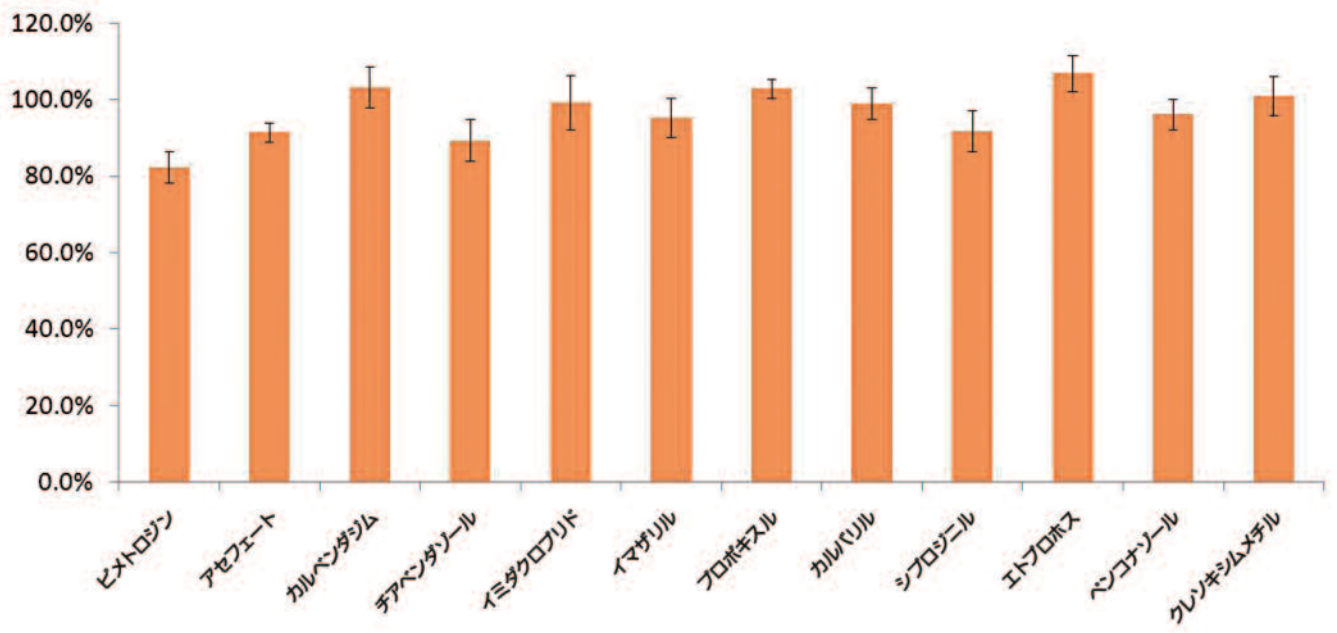


図 3. 米に含まれる 12 種類の農薬の回収率と精度

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 2003, 86, 412- 431.
2. S. J. Lehotay, et al, "Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables," J. AOAC Int., 2005, 88, 615-629.
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.mrlatabase.com/?selectvetdrug=0>

詳細情報

本資料のデータは、代表的な結果を示したものです。アジレントの製品および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) をご覧ください。

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., 2011
Printed in Japan
May 11, 2011
5990-8034.JA.JP



Agilent Technologies