

Agilent BondElut QuEChERS と LC/MS/MS を用いた 鶏肉中残留農薬の分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Chen-Hao (Andy) Zhai
Agilent Technologies (Shanghai) Co. Ltd.

概要

このアプリケーションノートでは、QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) AOAC サンプル前処理法を用いた、鶏肉中の各種農薬を代表する 12 種類の残留農薬の抽出および精製について説明します。このオリジナルの AOAC メソッドでは、水/アセトニトリル系での初期バッファ抽出、塩類添加による抽出/分離ステップ、分散固相抽出 (分散 SPE) による精製ステップを用いています。その後、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) モードの液体クロマトグラフィ/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC/ESI/MS/MS) により、鶏肉抽出液中のターゲット農薬の有無を測定しました。添加回収実験の添加量は、10~50 ng/g です。平均回収率は 76 %~107 % で、RSD は 10 % を下回りました。



Agilent Technologies

はじめに

AOAC QuEChERS メソッドは、食品中農薬の分析に広く用いられています [1,2]。このメソッドでは、アセトニトリル抽出に続いて、無水硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) によるサンプルからの水の塩析、酢酸塩の緩衝作用による分画の誘導がおこなわれます。精製には、その他の食品用 Agilent 分散 SPE キットを選択しました。サンプル量 8 mL 用のこのキットには、 $MgSO_4$ 900 mg が含まれています。また、ACN 抽出液 1 mL につき、C18 150 mg が添加されます。この研究では、12 種類の農薬を用いて、Agilent Bond Elut AOAC バッファ抽出キットとその他の食品メソッド用 Bond Elut QuEChERS 分散 SPE キットの性能を評価しました。回収率と再現性という点でメソッドの有効性が確認されました。表 1 に、鶏肉中農薬の化学情報および規制情報を示しています。

実験手法

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 社 (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。ギ酸 (FA) を Fluka 社 (Sleinheim、ドイツ) から入手しました。農薬標準を Sigma-Aldrich 社 (セントルイス、ミズーリ州、米国) 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, Inc. (ウィルミントン、デラウェア州、米国) から入手しました。

標準および内部標準 (IS) 原液 (すべて 2.0 mg/mL、ただしカルベンダジムのみ 0.5 mg/mL) を、それぞれ MeOH、0.1 % FA 含有 ACN、または DMSO を用いて作成し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。濃度 0.5 および 2.5 $\mu\text{g/mL}$ の 2 つの QC 添加溶液を、0.1 % FA 含有 ACN:水=1:1 を用いて毎日作成しました。IS 添加溶液として、0.1 % FA 含有 ACN:水=1:1 を用いて、2.5 $\mu\text{g/mL}$ の TPP 溶液を作成しました。

装置と材料

- Agilent 1200 Infinity シリーズ
- 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 (p/n 5982-5755CH)
- Agilent Bond Elut QuEChERS 分散 SPE キット、その他の食品メソッド用 (p/n 5982-4956CH)
- エッペンドルフ微小遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Flying Pigeon Centrifuge (Anting Science Instrument、上海、中国)

HPLC 条件

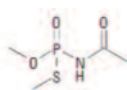
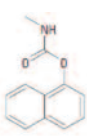
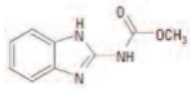
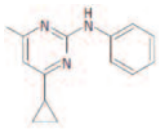
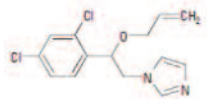
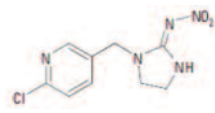
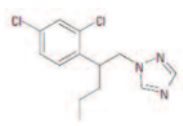
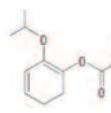
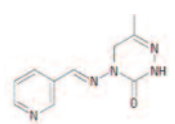
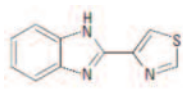
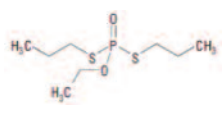
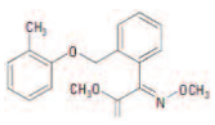
カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、 $2.1 \times 100\text{ mm}$ 、 $2.7\text{ }\mu\text{m}$ (p/n 695775-902)
移動相:	A:0.1 % FA 水溶液 B:0.1 % ギ酸 ACN 溶液
注入量:	5 μL
流量:	0.4 mL/min
グラジエント:	時間 (分) %B 0 5 1 5 3 50 7 90 8 90 8.2 5 9 5
温度:	$30\text{ }^{\circ}\text{C}$
ポストラン:	2 分
合計サイクルタイム:	11 分

MS 条件

ガス温度:	$350\text{ }^{\circ}\text{C}$
ガス流量:	10 L/min
ネブライザ:	40 psi
キャピラリ:	3,500 V

農薬はポジティブモードでモニタリングしました。分析に関するその他の条件を表 2 に示しています。

表 1. 農薬の化学情報と規制情報 [3-5]

化合物名:	分類	Log P	pKa	構造	MRL (ng/g)
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
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		1,000
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		2,000
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	2.99	NA		5
クレソキシムメチル	ストロビルリン	3.4	NA		50

サンプル前処理

市販の鶏肉を購入しました。肉を小さく切り、清潔なビニール袋に入れ、-20 °C で一晩凍らせました。翌日、必要な量の冷凍肉を取り出し、よく混ぜ合わせました。サンプルを粉碎して、均質な状態にしました。最終サンプル中に粉碎されていない鶏肉の断片が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 遠心管に入れました。QC サンプルに 100 µL の QC 添加溶液を添加しました。IS 添加溶液 (100 µL) を、対照用ブランクを除くすべてのサンプルに添加し、サンプル中濃度を 50 ng/g としました。遠心管にふたをし、1 分間ボルテックスしました。ディスペンサーを用いて、水 10 mL を各遠心管に加えました。遠心管にふたをし、1 分間ボルテックスしました。ディスペンサーを用いて、ACN (0.1 % 酢酸含有) 15 mL を各遠心管に加えました。遠心管にふたをし、1 分間手で振とうしました。無水 MgSO₄ 6 g と酢酸ナトリウム 1.5 g を含む Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出塩キットを遠心管に直接加えました。遠心管を密閉し、20 秒間手でよく振とうし、溶媒をサンプル全体と十分に混和させ、結晶質の塊を十分に溶かしました。その後、遠心管を 4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

表 2. 12 種類の農薬の LC/MS/MS 分析に用いた機器採取データ

化合物	MRM チャンネル (<i>m/z</i>)	フラグメント (<i>V</i>)	CE (<i>V</i>)
ピメトロジン	1) 218.1 > 105	130	20
	2) 218.1 > 78.1		50
アセフェート	1) 184.0 > 143	65	3
	2) 184.0 > 95		20
カルベンダジム	1) 192.1 > 160.1	110	15
	2) 192.1 > 132.1		30
チアベンダゾール	1) 202.0 > 175.1	160	25
	2) 202.0 > 131.1		35
イミダクロプリド	1) 256.1 > 209	140	10
	2) 256.1 > 175		15
イマザリル	1) 297.1 > 158.9	150	20
	2) 297.1 > 200.9		15
プロボスキル	1) 210.2 > 111	70	10
	2) 210.2 > 93		25
カルバリル	1) 202.0 > 145	70	15
	2) 202.0 > 127		40
シプロジニル	1) 226.1 > 93	150	37
	2) 226.1 > 77		52
エトプロホス	1) 243.1 > 130.9	115	15
	2) 243.1 > 96.9		35
ペンコナゾール	1) 284.0 > 70	125	10
	2) 284.0 > 158.9		30
クレソキシムメチル	1) 314.1 > 222	70	3
	2) 314.1 > 116		5
TPP (IS)	1) 327.1 > 77	170	40
	2) 327.1 > 152		45

- 1) 定量イオン
- 2) 定性イオン

分散 SPE 精製

上澄みの ACN 層 8 mL を Bond Elut QuEChERS AOAC 分散 SPE 15 mL チューブに移しました。チューブには無水 $MgSO_4$ 900 mg と C18 150 mg が入っています。チューブにしっかりとふたをし、1 分間ボルテックスしました。その後、遠心分離機を用いて、チューブを 4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 2 mL をチューブに移し、40 °C 未満の窒素で乾燥させました。得られた残留物を ACN:水 (1:9) 1 mL に再溶解しました。その後、残留物を 0.2 μm Agilent プレミアムシリンジフィルタ (p/n 5190-5106) でろ過し、LC/MS/MS で分析しました。

結果と考察

推奨事項に従って、この研究の鶏肉の抽出には、その他の食品メソッド用 AOAC 分散 SPE キットを使用しました。LC/MS/MS の優れた選択性のため、マトリックスブランクの MRM クロマトグラムでは、ターゲット農薬に干渉するピークはいっさい見られませんでした。図 1 と 2 は、マトリックスブランク (IS 添加) および分散 SPE メソッドで処理した 10 ng/g 添加鶏肉抽出液の LC/MS/MS クロマトグラムを示しています。

回収率と再現性

粉末状サンプルに濃度 10 および 50 ng/g で農薬標準を添加し、回収率と再現性を検証しました。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 3 に示しています。12 種類の農薬について、優れた回収率と再現性が得られていることがわかります。

表 3 回収率と再現性 (RSD として表示)

化合物	濃度 10 ng/g で標準添加		濃度 50 ng/g で標準添加	
	回収率 (%)	RSD (n = 6)	回収率 (%)	RSD (n = 6)
ピメトロジン	76.5	3.8 %	80.2	6.9 %
アセフェート	82.1	10.2 %	86.7	4.5 %
カルベンダジム	95.6	8.3 %	93.7	2.5 %
チアベンダゾール	99.7	5.4 %	98.2	3.2 %
イミダクロプリド	92.3	4.7 %	106.7	2.8 %
イマザリル	85.3	5.5 %	82.5	1.1 %
プロボスキル	88.6	3.7 %	90.7	4.4 %
カルバリル	79.8	5.6 %	93.8	3.0 %
シプロジニル	88.5	1.9 %	105.7	2.2 %
エトプロホス	101.2	3.4 %	82.9	4.8 %
ペンコナゾール	87.9	10.3 %	86.6	2.3 %
クレソキシムメチル	99.3	8.9 %	89.4	2.0 %

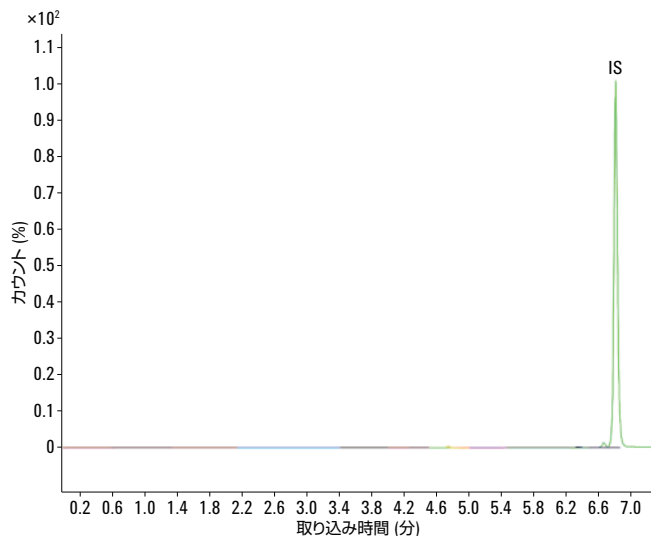


図 1. 鶏肉マトリックスブランクの MRM クロマトグラム
IS = TPP

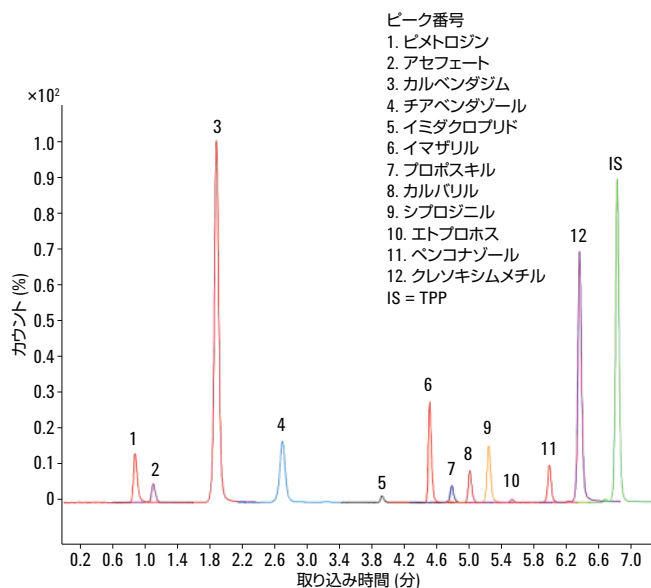


図 2. QuEChERS メソッドにより処理された 10 ng/g 添加鶏肉サンプルの MRM クロマトグラム

結論

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC バッファ抽出キットとその他の食品メソッド用分散 SPE キットを使えば、鶏肉中の代表的な農薬について、簡単で高速、かつ効率の良い精製が実現します。マトリックス添加標準を用いて評価した回収率と再現性は、鶏肉中の複数農薬の分析における許容範囲内でした。鶏肉中の不純物とマトリックス効果によるターゲット化合物定量の干渉は見られませんでした。この研究で用いた農薬は幅広い種類および特性を代表するものであることから、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その他の農薬についても優れた選択肢になると考えられます。

参考文献

1. M. Anastassiades, S.J. Lehotay *J. AOAC Int.* 86, 412 (2003).
2. S. J. Lehotay, K. Mastovská, A. R. Lightfield *J. AOAC Int.* 88, 615 (2005).
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.mrldatabase.com/?selectvetdrug=0>

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。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) 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。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

December 11, 2013

5991-3191JAJP



Agilent Technologies