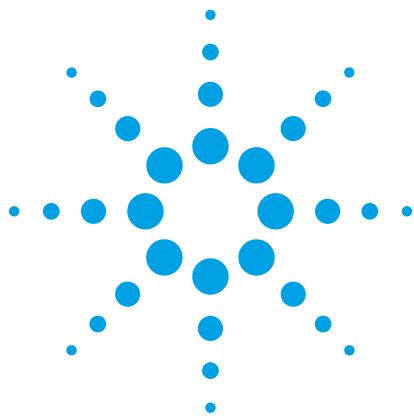




GC/MS/MS を用いた オリーブサンプル中の 多成分残留農薬分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

A. Moreno López, L. Moreno López, and
J.L.Pineda Lucas
Laboratorio Químico Microbiológico S.A.
Sevilla, Spain
Joan Stevens
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、オリーブ中の 27 種類の残留農薬を測定するための分析メソッドについて説明します。オリーブは脂質の含有率が 80~85 % と高く、農薬の回収率やクロマトグラフィーシステムに悪影響を及ぼします。そのため、修正版 QuEChERS メソッドを使用した、ガスクロマトグラフィー/トリプル四重極 (GC/MS/MS) マルチブルリアクションモニタリングメソッドによる抽出および分析を採用しました。回収率、繰り返し精度、再現性という点でオリーブに対するメソッドの有効性が確認されました。これにより、本メソッドでは 70~120 % の妥当な定量的回収率を、SANCO/ 12571 [1] で推奨されている、RSD 20 % 未満で得られることが示されました。定量下限は農薬の最大残留限界規制値以下にすることができました。

はじめに

残留農薬分析は人間や動物の健康、輸出入貿易、規制制御において必要不可欠です。農業では様々な種類の農薬が使用されており、これらの農薬のほとんどに対しては、GC/MS または LC/MS/MS を使用した分析による食品中の最大残留レベル (MRL) などの規制ガイドラインが設定されています [2]。

質量分析と組み合わせたガスクロマトグラフィー (GC/MS) を使用したメソッドは、選択イオンモニタリング (SIM) に基づいており、非常に高感度である一方で、同定の確率やノンターゲット/レトロスペクティブ分析の機能が犠牲になっています。GC で分析可能な食品サンプル中の農薬の GC/MS/MS による測定は、この 10 年の間に登場した有用な



Agilent Technologies

アプローチで、高い選択性と感度を実現しながらクロマトグラフィーにおける多くの干渉を最小化または排除することができます [3]。GC/MS/MS の感度と選択性が向上したにもかかわらず、共溶出マトリックス成分によるマトリックス効果が生じ、結果に悪影響を及ぼします。最適化されたサンプル前処理メソッドによりこれらの効果を最小限に抑えることができます。

材料とメソッド

オリーブからの 27 種類の農薬抽出には、修正版 EN 抽出メソッドを使用しました。極性非プロトン性溶媒 (アセトニトリル) に対して無極性および極性の非プロトン性溶媒の混合物 (酢酸エチル:シクロヘキサン:アセトン) を導入した、EN 15662 [4] に記載されている溶媒改良メソッドを使用し、オリーブ由来の高脂質マトリックスから農薬を抽出しました。無極性および極性の非プロトン性溶媒の混合物は、極性非プロトン性溶媒の ACN を単独で使用する場合に比べ、抽出できる化合物の極性範囲が広がります。農薬は、有機塩素系、有機リン酸系、ピレスロイド系を使用しました。

消耗品と機器

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット (p/n 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS 分散キット、EN メソッド、15 mL (p/n 5982-5156)
- Agilent SPE 充てん剤バルク、C18 エンドキャップ付き (p/n 5982-8082)
- Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート GC カラム、30 m x 0.25 mm (p/n 19091S-433UI)
- Agilent 7890A GC
- Agilent 7000A トリプル四重極 GC/MS システム
- Agilent 7693 ALS インジェクタ

溶媒と農薬標準

- 酢酸エチル、残留分析用、Baker
- シクロヘキサン、残留分析用、Sharlau
- アセトン、残留分析用、Baker
- 混合溶媒: 酢酸エチル: シクロヘキサン: アセトン (1:1:4)
- 農薬標準、Dr. Ehrenstorfer

GC 条件

キャリア:	定圧、22.0 psi
オープン温度:	開始時 70 °C (2 分)、25 °C/min で 70~150 °C (0 分)、3 °C/min で 150~200 °C (0 分)、8 °C/min で 200~280 °C (10 分)
インジェクタ温度:	250 °C
セプタムパージ:	3 mL/min
スプリットベントの	
パージ流量:	0.75 分で 100 mL/min
注入量:	スプリットレス、1.0 µL
RTL 化合物:	クロルピリフォスメチル

MS 条件

イオン源:	EPC
イオン源温度:	280 °C
コリジョンガス:	He クエンチガス 2.35 mL/min、N ₂ コリジョンガス 1.5 mL/min
トランスファライン温度:	280 °C
MS 四重極 1、2 温度:	どちらも 150 °C
MS1/MS2 分離能:	ワイド/ワイド
MRM 設定:	表 1 参照

表 1. 27 種類の農薬に対するリテンションタイムと MRM パラメータ

農薬	RT (クロルピリホスメチルにロック)
クロルプロファム	11.05
ヘプテノホス	9.737
ピリミホスメチル	18.307
ヘキサクロロベンゼン	12.377
ホノホス	13.889
シマジン	12.909
テルブホス	13.796
テルブチラジン	13.810
ダイアジノン	14.466
ピリミカルブ	15.677
クロルピリフォスメチル	16.59
クロロプロピレート	25.419
パラチオンメチル	16.594
ビフェントリン	28.839
フェントロチオン	18.072
パラチオン	19.275
クロルタルジメチル	19.433
クロルフェンビンホス	21.557
ペンジメタリン	20.991
αエンドスルファン	22.637
プロシミドン	21.962
βエンドスルファン	25.3158
硫酸エンドスルファン	26.76
アクリナトリン	30.724
アルドリノ	18.528
クロルピリホス	19.234
4,4'-ジクロロベンゾフェノン(ジコホール)	19.201

表 2 にタイムセグメントを示します。MS1 および MS2 の分離能は終始ワイド/ワイドを維持していました。ドウェルタイムは 10 ms でした。

表 2. タイムセグメント

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	コリジョン エネルギー
タイムセグメント 2			
クロルプロファミ	213	171	5
クロルプロファミ	213	127	5
ヘプテノホス	124	89	20
ヘプテノホス	124	63	35
タイムセグメント 3			
ヘキサクロロベンゼン	284	249	20
ヘキサクロロベンゼン	284	214	35
タイムセグメント 4			
ホノホス	246	109	15
ホノホス	246	81	30
シマジン	201	186	5
シマジン	201	173	5
テルブホス	231	175	10
テルブホス	231	129	25
テルブチラジン	214	132	10
テルブチラジン	214	104	20
タイムセグメント 5			
ダイアジノン	179	137	20
ダイアジノン	179	121	40
ホノホス	246	109	15
ホノホス	246	81	30
テルブホス	231	175	10
テルブホス	231	129	25
テルブチラジン	214	132	10
テルブチラジン	214	104	20
タイムセグメント 6			
ピリミカルブ	238	166	10
ピリミカルブ	166	96	15
ターバシル	161	144	10
ターバシル	161	88	20
タイムセグメント 7			
クロルピリフォスメチル	286	271	20
クロルピリフォスメチル	286	93	25
メチルパラチオン	263	109	15
メチルパラチオン	263	79	30

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	コリジョン エネルギー
タイムセグメント 8			
4,4'-ジクロロベンゾフェノン	139	111	15
4,4'-ジクロロベンゾフェノン	139	75	35
アルドリリン	263	193	30
アルドリリン	263	191	30
クロルピリホス	197	169	15
クロルピリホス	197	107	40
フェニトロチオン	277	125	15
フェニトロチオン	277	109	20
パラチオン	291	109	10
パラチオン	291	81	25
ピリミホスメチル	305	290	10
ピリミホスメチル	305	180	5
タイムセグメント 9			
クロルタールジメチル	301	223	25
クロルタールジメチル	299	221	25
タイムセグメント 10			
クロルフェンビンホス	267	159	15
クロルフェンビンホス	267	81	30
ペンジメタリン	252	162	10
ペンジメタリン	252	161	20
タイムセグメント 11			
エンドスルファン (α 異性体)	241	206	10
エンドスルファン (α 異性体)	241	170	20
プロシミドン	283	255	10
プロシミドン	283	96	10
タイムセグメント 13			
エンドスルファン (β 異性体)	241	206	15
エンドスルファン (β 異性体)	195	159	5
タイムセグメント 14			
エンドスルファン (β 異性体)	241	206	15
エンドスルファン (β 異性体)	195	159	5
クロロプロビレート	251	139	15
クロロプロビレート	251	111	35
タイムセグメント 15			
硫酸エンドスルファン	272	237	20
硫酸エンドスルファン	272	117	40
タイムセグメント 16			
ビフェントリン	181	166	20
ビフェントリン	181	165	25
タイムセグメント 17			
アクリナトリン	289	93	5
アクリナトリン	208	181	5

サンプル前処理

オリーブは地元の木から採取しました。オリーブは薄く切り、サンプルの一部 (約 1 g) を分析に使用しました。残りは冷凍保存しました。オリーブに種がある場合は取り除き、最終サンプル中に存在する種の割合を概算で求めました。これは LMR 計算における法的要件です。サンプルの代表的な部分 (2~3 個の実を丸ごと) を用いて、下記のように種の割合を評価しました。最初に、種の含まれている代表サンプルを計量します。次に、サンプルから種を取り除き、それを計量します。最後に、式 1 を使用して種の占める割合を計算します。

$$\% H = \frac{\text{種の重量}}{\text{サンプルの重量}} \times 100 \quad \text{式 1}$$

ここで:

% H = 種の割合

手順

1. 粉碎したサンプル 10.0 g ± 0.1 g を計量し、50 mL 遠心管に入れます。
2. 酢酸エチル:シクロヘキサン:アセトン (1:1:4) の混合溶媒 10 mL を添加し、遠心管にキャップをして最低 1 分間振とうします。
3. Bond Elut QuEChERS 抽出塩パッケージ (p/n 5982-5650) をサンプルの遠心管に加え、1 分間振とうします。
4. 遠心管を 4,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
5. C18EC (p/n 5982-8082) 300 mg をさらに追加した 15 mL Bond Elut 分散キット (p/n 5982-5156) に上澄みの有機層 6 mL を移します。
6. 最低 1 分間振とうした後、4,000 rpm で 5 分間遠心分離します。
7. 抽出した上澄みの有機層 1~2 mL をサンプルバイアルに移し、密閉します。

結果と考察

HP-5ms ウルトライナート GC カラムでターゲット農薬のすべてが分離され、検出されました。GC/MS/MS の優れた選択性により、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 は修正版 EN QuEChERS 抽出メソッドにより処理された 20 µg/kg の濃縮オリーブ抽出物の GC/MS/MS クロマトグラムを示しています。図 2 はオリーブやオリーブオイルの分析において問題となる、テルブチラジンやクロルピリホスなどの農薬の卓越した定量分析結果を示しています。

計算

検量線からバイアル中の農薬の濃度が得られた後、式 2 を用いてサンプル濃度を mg/kg 単位で算出することができました。

$$C_{\text{Pesticide}} (\text{mg/kg}) = C_{\text{Pesticide}} (\mu\text{g/L}) \times \frac{10}{W} \times 1e-3 \times [1 - (\frac{\% H}{100})] \quad \text{式 2}$$

ここで:

$C_{\text{Pesticide}}$ = 検量線から得られた濃度 (µg/L)

W = テストに使用されたサンプルの g 単位での開始時重量 (10.0 g)

% H = 種の占める割合 (必要な場合)

最終結果は SI 単位で表され、結果は µg/kg 単位で得られています。

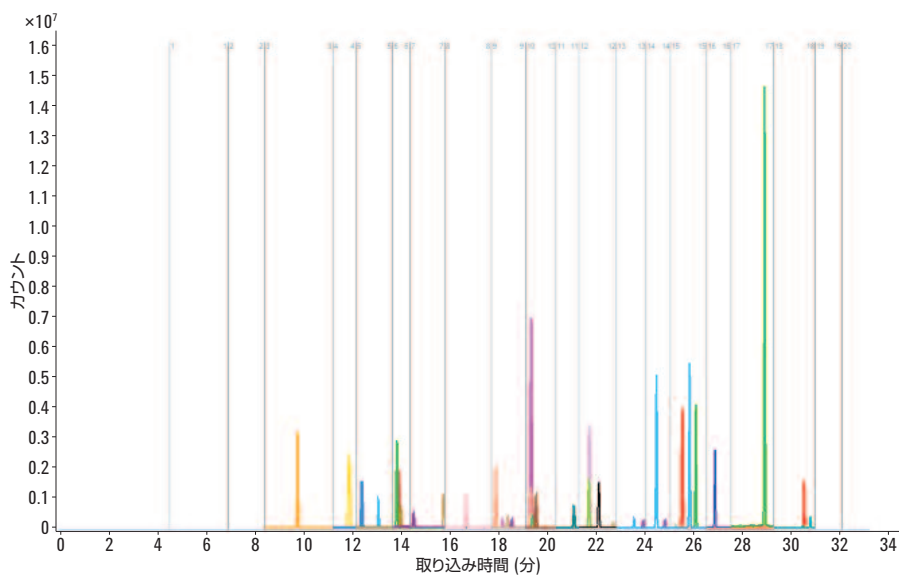


図 1. 20 µg/kg でオリーブ中に添加した 27 種類の農薬の GC/MS/MS を用いて得られた MRM トランジションの重ね表示

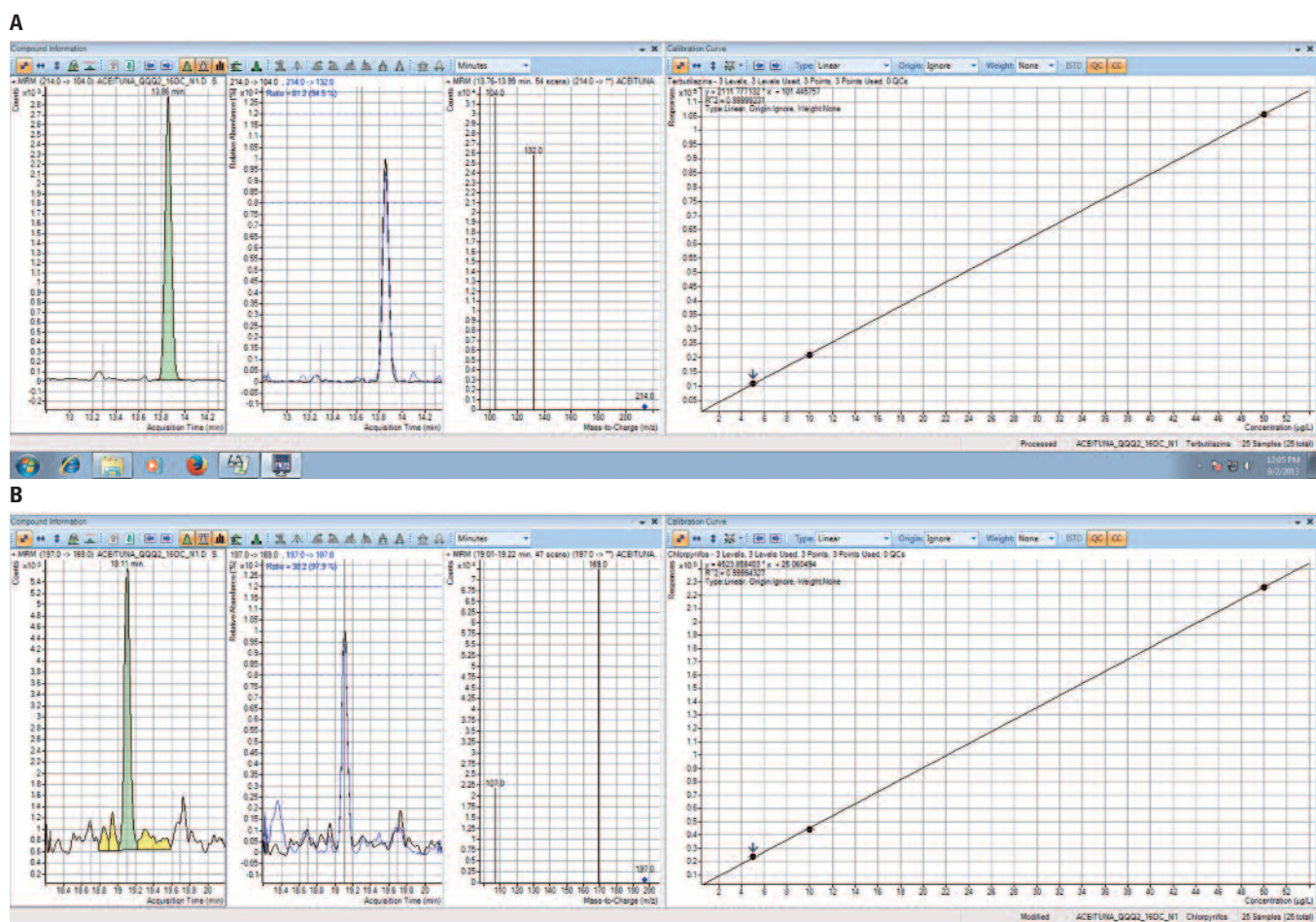


図 2. テルブチラジン A) 5 µg/kg の MRM クロマトグラム、スペクトルおよび検量線、 $R^2 = 0.9999$ B) クロルピリホス 5 µg/kg の MRM クロマトグラム、スペクトルおよび検量線、 $R^2 = 0.9999$

直線性と定量下限 (LOQ)

テストを行った全農薬に対する直線性のあるキャリブレーション範囲は 5~60 µg/kg でした。スパイクしたマトリックスブランクを使用した検量線を 5、10、20、60 µg/kg で作成しました。60 µg/kg は定量上限の 120 % 以下でした。検量線は分析物の相対レスポンスをプロットして作成しました。全農薬に対して設けられている 10 µg/kg の定量下限は、果物および野菜中のこれらの農薬の MRL 以下になっています。全化合物の相関係数 (R^2) は 0.9999 を上回りました。

回収率と再現性

粉砕したオリーブサンプルに濃度 5、10 および 20 µg/kg で農薬標準品を添加し、EN QuEChERS 抽出メソッドおよび溶媒改良精製メソッドを用いて前処理を行い、回収率と再現性を検証しました。これらの QC サンプルは、マトリックススパイク検量線に対して定量しました。各濃度について、分析を 5 回繰り返しました。回収率と再現性 (RSD) のデータを表 3 に示しています。27 種類の農薬について優れた回収率と精度が得られていることがわかります。

表 3. Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出メソッドおよび脂質と蠟を含む果物・野菜用溶媒改良分散 SPE キットを用いたオリーブ中の農薬の回収率 %, (RSD%), 再現性

化合物	L1	L2	L3
4,4'-ジクロロベンゾフェノン	93.94 (7.32)	92.95 (7.62)	106.43 (6.28)
アクリナトリン	101.92 (6.66)	95.13 (14.01)	105.25 (2.00)
アルドリノ	90.46 (12.86)	90.36 (9.60)	100.00 (10.52)
ビフェントリン	96.50 (9.12)	95.88 (7.87)	104.29 (8.01)
クロルピリホス	93.15 (4.43)	86.07 (14.21)	108.10 (5.53)
クロルタールジメチル	98.78 (5.78)	96.05 (7.47)	99.96 (16.41)
クロルフェンビンホス	93.10 (6.04)	89.01 (11.80)	106.86 (6.38)
クロロプロピレート	91.24 (7.46)	86.68 (7.88)	108.70 (5.41)
クロルピリフォスメチル	100.40 (11.72)	92.70 (8.63)	110.22 (3.23)
クロルプロファム	98.38 (7.30)	91.00 (15.89)	105.07 (6.86)
ダイアジノン	94.11 (10.24)	94.68 (14.24)	108.81 (5.98)
エンドスルファン (α 異性体)	89.13 (16.31)	93.97 (11.88)	105.55 (5.64)
エンドスルファン β	83.90 (21.05)	93.06 (10.03)	98.25 (4.41)
硫酸エンドスルファン	94.67 (4.76)	93.48 (7.74)	109.58 (4.75)
フェニトロチオン	91.48 (8.74)	86.33 (17.91)	109.38 (10.91)
ホノホス	89.55 (5.21)	91.06 (9.75)	104.63 (7.52)
ヘプテノホス	97.24 (4.02)	93.55 (17.02)	101.78 (12.40)
ヘキサクロロベンゼン	95.25 (3.52)	87.10 (8.51)	105.62 (7.34)
パラチオンメチル	94.00 (15.54)	85.27 (10.50)	104.57 (7.81)
パラチオン	86.26 (11.20)	81.57 (10.98)	94.98 (10.91)
ペンジメタリン	90.25 (12.40)	81.78 (7.91)	96.00 (4.64)
ピリミカルブ	84.52 (5.09)	76.15 (5.43)	89.66 (10.16)
ピリミホスメチル	93.02 (7.29)	85.34 (13.69)	106.92 (5.54)
プロシミドン	90.75 (7.97)	85.04 (3.41)	98.88 (7.29)
シマジノ	94.12 (4.59)	90.17 (11.80)	105.81 (8.75)
テルブホス	105.06 (8.45)	98.92 (9.06)	112.62 (6.92)
テルブチラジン	97.31 (9.04)	91.66 (7.59)	105.34 (9.99)

レベル	キャリブレーションポイント (µg/L)	定量下限 (µg/kg)
L1	5.0 (70 % LQ 以上)	10.0
L2	10	
L3	20	
L4	60 (定量上限の 120 % 以下)	

結論

Agilent Bond Elut QuEChERS EN バッファ抽出キットおよび改良混合溶媒を用いた脂質と蠟を含む果物・野菜用分散 SPE キットにより、オリーブ中の代表的な農薬に対するシンプルで高速かつ効果的な精製メソッドが実現しました。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、オリーブ中の複数農薬の測定における許容範囲内でした。オリーブ中の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。農薬の LOQ は食品中の MRL 規制値以下でした。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 EN 抽出キットおよび改良混合溶媒を用いた分散 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. Anon. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571_2013. European Commission (2013).
2. L. Alder, *et al. Mass Spectrom. Rev.* **25**, 838 (2006).
3. F. Hernández, *et al. Anal. Methods* **5**, 5875 (2003).
4. Anon. Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method. EN 15662. European Standard.

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。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト 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., 2014

Printed in Japan

June 18, 2014

5991-4800JAJP



Agilent Technologies