

Enhanced Matrix Removal (EMR) を 使用したサケの PAH 分析

アプリケーションノート

食品試験・農業・環境

著者

Derick Lucas and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

要約

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、分解されにくい、縮合したベンゼン環で構成されています。これは、環境への蓄積や、煙により、水生生物に移行します。複雑な高脂質食品マトリックスでの PAH 分析は、共抽出したマトリックスが、分析流路内で干渉、マトリックス効果、および蓄積という形で正確な定量を妨げるため、困難を伴う場合があります。Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品で、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) で使用することにより、分析対象物の回収率に影響を与えずに、選択性の高いマトリックス除去を実現できます。この実験では、サケの PAH 分析における、このサンプル前処理法の効率性について説明します。このメソッドは、15 の PAH 化合物すべてのあらゆるレベルにおいて、優れた真度 (84~115 %) と精度 (RSD = 0.5~4.4 %) を実現しているため、高脂質サンプルにおいて、高速、堅牢、かつ効率的な分析が実施できます。

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、環境内のいたるところに存在する混入異物であり、石油由来の場合と燃焼由来の場合があります。これは、2 つ以上の縮合ベンゼン環に配置された水素と炭素から構成されており、置換基を 1 つ以上の環に付加できます [1]。PAH が問題となるのは、環境内に持続的に存在して、毒性、変異原性、および発がん性があることが知られていますが、その一部が哺乳類に影響を与えるためです [2]。魚介類の汚染は、水源内に蓄積した石油成分、および PAH を煙内に燃焼生成物として生成する加熱プロセスから発生することがあります [3, 4]。これらの理由により、分析者が、問題とするレベルで混入異物の PAH を検出するには、堅牢で効率的なメソッドを使用することが重要になります。



Agilent Technologies

低レベルの PAH を検出するには、堅牢性の高い効率的なサンプル前処理法と GC/MS を組み合わせて使用します。一般的な前処理プロトコルには、ソックスレー抽出 [5]、超音波抽出 [6]、および加圧溶媒抽出 [7] があります。前処理法は、固相抽出 [8]、ゲル浸透クロマトグラフィー [9] などのクリーンアップ手順と組み合わせることができます。これらの時間と手間がかかる手法に伴う課題を解決するために、QuEChERS 法 (Quick, Easy, Effective, Rugged, and Safe) [10、11] をベースにしたプロトコルも同時に実施することにより、適切な結果が得られます [12、13、14]。複雑な食品サンプル、特に高脂質のサンプルにとっては、サンプル前処理法がますます重要になってきています。これは、共抽出したマトリックスが、分析流路内で干渉、マトリックス効果、および蓄積という形で、分析に有害な影響を与えるためです。

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) は、新しい充填剤であり、対象とする分析物を誤って除去することなく、サンプル抽出物から主要な脂質類を選択的に除去します。脂質種の除去は、特に QuEChERS などの手法で重要になります。この手法は、ターゲット化合物から大量のマトリックスを共抽出します。従来では、分散固相抽出 (dSPE) 手順の間に、C18 および PSA の官能基の付いた充填剤を使用して、高脂質のサンプルを処理していました。ただし、これらの充填剤は、サンプルの適切なクリーンアップに失敗することがあり、対象化合物との間に非選択的な相互作用が発生する場合があります。この実験では、単純で効率的なワークフローを使用して、サケ内の 15 の PAH に関するサンプル前処理法と分析結果について調査します。このワークフローは、EMR-Lipid により適切なクリーンアップを行うと同時に、GC/MS において優れた真度と再現性を実現しています。

実験方法

分析は、Agilent 7890 GC と Agilent 5977 MSD (マルチモード注入口 (MMI) を装備)、Agilent 7693 オートサンブラ、およびカラムバックフラッシュでのキャピラリー・フロー・テクノロジーという構成で実施しました。表 1 は装置パラメータを示しており、表 2 はこの実験で使用した消耗品とその他の機器を示しています。

表 1. PAH 分析で使用した Agilent GC/MS システムの装置条件

GC:	Agilent 7890B
オートサンブラ:	Agilent 7693 オートサンブラ、10.0 µL シリンジ (G4513-80220)
注入量:	0.5 µL
キャリアガス:	ヘリウム、定流量
ガスフィルタ:	ガスクリーンフィルタ GC/MS 1/8 インチ (部品番号 CP17974)
注入口:	MMI、ホットスプリットレス注入モード (320 °C)
スプリットメントへの	
パーズ流量:	0.75 分で 50 mL/min
流量:	2.0 mL/min
昇温プログラム:	70 °C (1 分保持)、25 °C/min で 70 ~ 195 °C (5 分保持)、7 °C/min で 195 ~ 315 °C
カラム:	Agilent J&W DB-5ms UI、20 m × 0.18 mm、0.18 µm (部品番号 121-5522UI)
リストリクタ:	不活性化シリカチューブ、0.65 m × 0.15 mm (部品番号 160-7625-5)
試験後のバックフラッシュ:	315 °C で 5 分、バックフラッシュ時 70 psi
補助圧力:	測定時 2 psi、バックフラッシュ時 70 psi
MSD:	Agilent 5977 MSD
モード:	SIM
トランスファライン温度:	340 °C
イオン源温度:	325 °C
四重極温度:	150 °C
溶媒待ち時間:	3.5 min

表 2. その他の消耗品と機器

バイアル:	茶色スクリュートップ、ガラス (部品番号 5190-7041)
バイアルキャップ:	PTFE、9 mm、スクリュューキャップ (部品番号 5182-0717)
バイアルインサート:	ガラス、150 µL、樹脂足付 (部品番号 5183-2088)
セブタム:	長寿命、ノンスティック、11 mm、50 個 (部品番号 5183-4761)
フェラル:	ベスベル/グラファイト、85:15、内径 0.4 mm (部品番号 5181-3323)、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (部品番号 G3188-27501)
注入口ライナ:	シングルテーパ、スプリットレス、ウルトラライナート (部品番号 5190-7041)
キャピラリー・フロー・テクノロジー (CFT):	UltiMetal Plus Ultimate ユニオン (部品番号 G3186-60580)、CFT キャピラリーフィッティング (部品番号 G2855-20530)
Bond Elut EMR—Lipid 分散キット (dSPE):	15 mL チューブで 1 g (部品番号 5982-1010)
Bond Elut for Enhanced Matrix Removal-Lipid 脱水キット:	15 mL チューブで 2 g (部品番号 5982-0101)

ジェノグラインダー (メアチエン、ニュージャージー州、米国)

Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)

エッペンドルフ微小遠心管 (Brinkmann Instruments、ウエストベリー、ニューヨーク州、米国)

Vortexer およびマルチチューブ Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

ボトルトップ型ディスベンサ (VWR、サウスブレインフィールド、ニュージャージー州、米国)

エッペンドルフピペット

サンプル前処理

均質化した重量 (5 g) のサケを 50 mL 遠心管に注入し、必要に応じて、標準物質および同位体標識された内部標準をスパイクしました。サンプルにアセトニトリル (ACN) (10 mL) を加え、振とう機で 2 分間混合しました。次に、遠心管を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上澄み液 (8 mL) を、1 g の EMR—Lipid 充填剤の入った 15 mL 遠心管に移しました。ただちにボルテックスミキサーで分散させ、さらに 60 秒間ボルテックスミキサーで追加攪拌しました。その後、5,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄み液はすべて、2.0 g の塩 (1:4 NaCl:MgSO₄) の入った 2 番目の 15 mL 脱水キットに静かに移し、分散させるために即座にボルテックスミキサーで攪拌した後、5,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄みの ACN 層を、GC/MS 分析用にサンプルバイアルに移しました (図 1)。

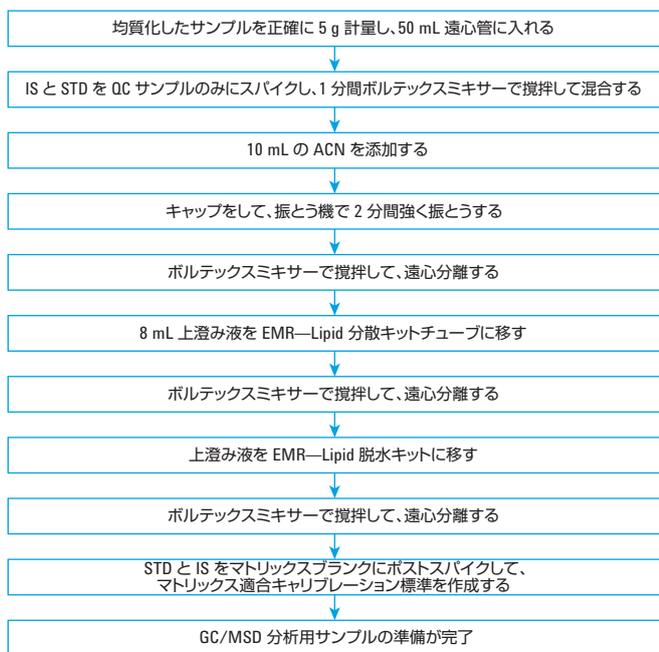


図 1. GC/MS による分析前の、Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid を使用した、サケの PAH に対するサンプル前処理のワークフロー

試薬および薬品

試薬および溶媒はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。ACN は、Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入し、水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して精製しました。PAH 標準および内部標準は、Ultra-Scientific (ノースキングスタウン、ロードアイランド州、米国) から溶液として購入しました。原液は、アセトン (100 µg/mL) で調製し、作業標準用に茶色バイアルで希釈しました。

検量線と定量

マトリックス適合検量線は、キャリブレーションの全範囲で、1、10、25、50、100、250、500、および 1,000 ng/g に対応して生成しました。サケのブランク測定は、サンプル前処理手順と 950 µL ブランク抽出物、25 µL 標準溶液、および 25 µL 原液内部標準で実施しました。内部標準は、サケにスパイクし、マトリックス適合キャリブレーション標準 100 ng/g でポストスパイクしました。全検量線は、すべての化合物に対して $R^2 > 0.999$ の優れた直線性を示しました。サケのサンプルは、6 回の繰り返し測定で抽出する前に、25、100、および 500 ng/g の各レベルでプレススパイクしました。ターゲット化合物の定量には、Agilent MassHunter ソフトウェアを使用しました。真度値は、内部標準を基準にしてスパイクされたサンプル応答を計算し、決定しました。絶対回収率値は、内部標準補正を行わずに、プレススパイクした対象化合物の検量線に対する応答を測定して、決定しました。

結果と考察

7890 GC と 5977 GC/MSD は、15 の PAH と 5 つの内部標準に対して、優れたパフォーマンスを実現し、高感度でも一貫した結果を示しました。図 2 は、Agilent DB-5ms UI カラムにより、サケ内で 25 ng/g のプレスパイクを実施した場合に、15 の PAH で実現した分離状態を示しています。クロマトグラムは、15 の PAH すべてにおいてベースライン分離を示しており、これは、PAH 異性体フェナントレン、アントラセン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、およびベンゾ[k]フルオランテンのピークを正確に計算するために重要になります。クロマトグラム内の一部に見られる少量の干渉は、対象ピークから簡単に分離できます。

25、100、および 500 ng/g の各スパイクレベルで、EMR-Lipid とともに最適化された手順を使用することにより、優れた真度と精度が実現されます。図 3 は、同位体標識された内部標準補正を使用することにより、すべての対象化合物のあらゆるレベルにおいて、真度が 84 ~ 115 % の範囲内にあることを示しており、この場合 RSD は 0.5 ~ 4.4 % の範囲内にあります (図 4)。真度データは、図 5 の回収率の範囲にグループ化されます。これは、大部分の化合物は、90 ~ 120 % の範囲内に収まっていますが、2 つの化合物については 90 % を少し下回っていることを示しています (インデノ[1,2,3-cd]ピレンとベンゾ[g,h,i]ピレン)。

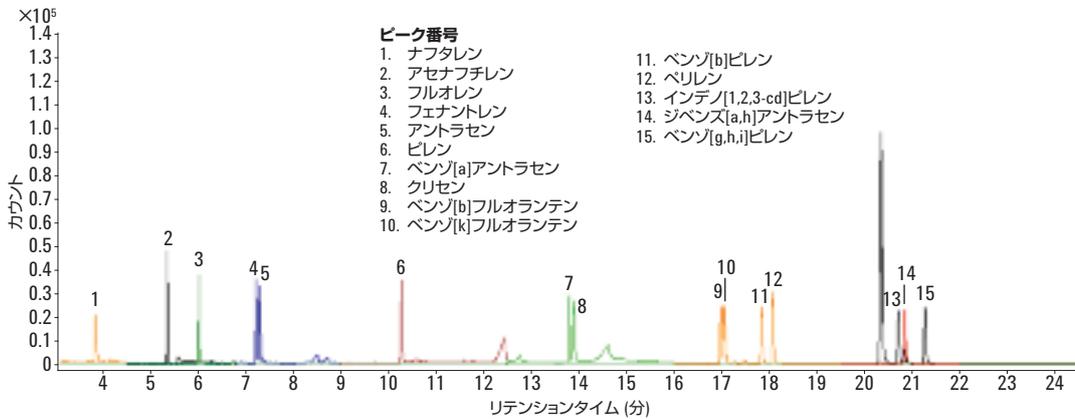


図 2. サケでの 25 ng/g プレスパイクから得られた 15 の PAH の GC/MS SIM クロマトグラム

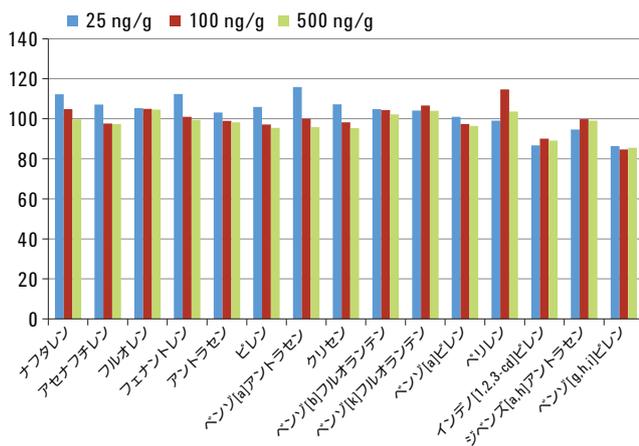


図 3. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける 15 の PAH の真度の結果

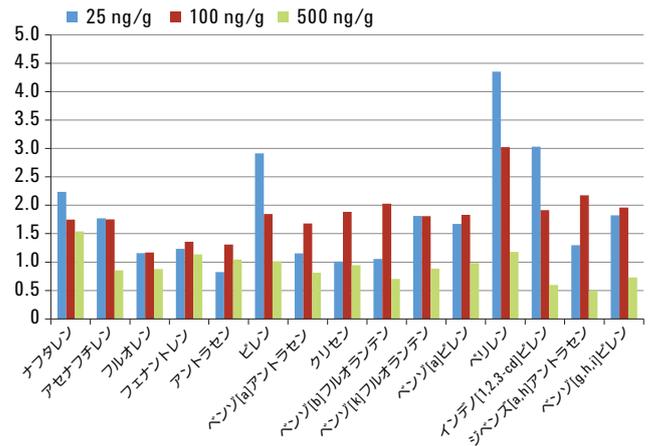


図 4. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける 15 の PAH の精度の結果

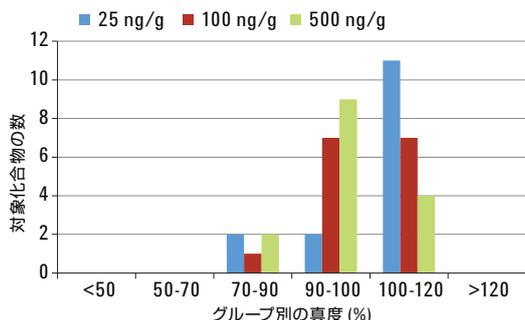


図 5. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける PAH のグループ化された真度の結果

絶対回収率は、内部標準を使用せずに、62~98 % の範囲内でした (表 3)。2 つの化合物、インデノ[1,2,3-cd]ピレンとベンゾ[g,h,i]ピレンについては、回収率が 70 % を少し下回っています。PAH 絶対回収率は、ACN 内の可溶性の低下が原因で、分子量が増加したときに減少します。ただし、大部分の回収率は高い値で、内部標準を使用して簡単に補正できます。表 4 に示すように、内部標準の絶対回収率も高い値です。ACN の可溶性には限界があるにもかかわらず、このメソッドでは、高脂質のサケのサンプルにおいて、優れた回収率と高い再現性を示す結果が得られました。

表 3. この実験で使用した、サケでの PAH とその真度、絶対回収率、および相対標準偏差 (RSD) (n = 6)

化合物	25 ng/g スパイク			100 ng/g スパイク			500 ng/g スパイク		
	真度	絶対回収率	%RSD	真度	絶対回収率	%RSD	真度	絶対回収率	%RSD
ナフタレン	112.2	86.7	2.2	104.8	89.7	1.7	99.7	85.8	1.5
アセナフチレン	107.1	90.1	1.8	97.6	89.9	1.8	97.3	90.6	0.9
フルオレン	105.3	94.6	1.2	105.0	94.2	1.2	104.6	96.2	0.9
フェナントレン	112.3	95.3	1.2	101.0	94.1	1.4	99.4	94.5	1.1
アントラセン	103.1	91.6	0.8	98.9	90.7	1.3	98.3	92.6	1.0
ピレン	105.8	97.6	2.9	97.1	88.9	1.8	95.4	89.7	1.0
ベンゾ[a]アントラセン	115.8	91.2	1.2	100.1	84.7	1.7	95.8	85.7	0.8
クリセレン	107.2	83.6	1.0	98.2	83.2	1.9	95.4	85.4	0.9
ベンゾ[b]フルオランテン	104.8	78.3	1.1	104.3	76.1	2.0	102.2	79.2	0.7
ベンゾ[k]フルオランテン	104.1	78.8	1.8	106.6	77.5	1.8	104.0	80.3	0.9
ベンゾ[a]ピレン	101.0	74.2	1.7	97.4	71.8	1.8	96.4	74.8	1.0
ペリレン	99.1	74.4	4.4	114.7	76.4	3.0	103.6	80.3	1.2
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	86.7	66.1	3.0	90.0	66.2	1.9	89.1	69.1	0.6
ジベンズ[a,h]アントラセン	94.7	73.9	1.3	99.7	72.2	2.2	99.0	76.2	0.5
ベンゾ[g,h,i]ピレン	86.4	64.7	1.8	84.7	62.3	2.0	85.6	66.3	0.7
平均	103.0	82.7	1.8	100.0	81.2	1.8	97.7	83.1	0.9

EMR-Lipid 分散固相抽出 (dSPE)

サケを代表サンプルとして選択したのは、他の魚介類と比較して脂質の含有量が高いことがその理由です。最適化された手順は、いくつかの方法において一般的な QuEChERS プロトコルからは逸脱しています。これらの方法では、ワークフローを簡素化し、EMR-Lipid dSPE クリーンアップ手順を利用しています。最初に、ACN により、サケを直接抽出しますが、余分な水や QuEChERS 抽出塩は使用しません。遠心分離後、上澄み液は ACN とサンプルからの少量の水で構成されています。この上澄み液を、dSPE マトリックス除去用に、EMR-Lipid 分散キットに移します。最後に、分散キットの上澄み液を、2.0 g NaCl/MgSO₄ (1:4) を含む脱水キットに移し、相分離を誘導します。次に、上澄みの ACN 層をバイアルに移し、分析を行います。

表 4. サケでの内部標準に対する絶対回収率と精度 (RSD (%)) (n = 6)

化合物	100 ng/g スパイク	
	絶対回収率	%RSD
ナフタレン-d8	87.8	1.0
アセナフチレン-d10	93.3	0.8
フェナントレン-d10	94.9	0.8
クリセレン-d12	87.1	1.0
ペリレン-d12	86.4	3.1
平均	89.9	1.3

EMR プロトコルでは一般的なことです。このアプローチでは、サンプルサイズを大きくして、クリーンアップを改良しました。その結果として、メソッドの全体的な感度が向上します。従来の EMR—Lipid プロトコルの場合、分散キットの充填剤を活性化させるために、水を添加します。一方、この最適化されたプロトコルの場合、水を添加することにより、PAH の可溶性が低下し、絶対回収率に悪影響を与えることがわかりました。したがって、抽出から生じた上澄み液を、水を添加せずに直接、EMR-Lipid チューブに移します。これにより、GC/MS SIM 分析での適切なクリーンアップが行われます。EMR-Lipid 分散キットおよび EMR-Lipid 脱水キットに上澄み液を添加した後、即座に混合を行うことにより固体が懸濁され、充填剤との間に最大の相互作用が発生し、凝集が回避されます。最適なマトリックス除去の場合、分散キットに水分を添加して、回収率を内部標準を使用して補正することにより、優れた真度と精度が実現されます。

結論

この実験では、高脂質のサケのサンプルで、低濃度から高濃度にわたる PAH を効率的に定量するための、高速で簡単なメソッドについて説明しています。ワークフローは、QuEChERS の場合と同様に簡単ですが、新しい EMR—Lipid dSPE 充填剤を使用して、脂質の共抽出物を最小限にし、回収率を最大限にすることにより、高レベルの精度を実現します。

サケなどのマトリックス内の脂質含有量は、大幅に異なる場合もありますが、Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid は、すべての脂質に使用できる充填剤であり、対象化合物とは相互作用が発生しません。脂質除去は、分散キットの手順の間に、EMR—Lipid で水を添加することにより、最大化されます。ただし、このケースでは、水を添加することにより、PAH の可溶性が低下するため、PAH サンプル前処理には適していません。今後の実験では、処理が困難なタイプのサンプルやアプリケーションに対して、引き続き EMR—Lipid を最適化し、現在および次世代のクロマトグラフと検出システムで対応可能な脂質含有量の範囲を拡大していく予定です。

表 5. GC/MS SIM メソッドにおける、ターゲット化合物、リテンションタイム、ターゲットイオン、および内部標準の名称

化合物	GC/MS (SIM)			
	RT	ターゲットイオン	ドウェル (ミリ秒)	内部標準
ナフタレン	3.89	128.0	20	ナフタレン-d8
アセナフチレン	5.37	152.0	20	アセナフチレン-d10
フルオレン	6.05	166.0	20	アセナフチレン-d10
フェナントレン	7.25	178.0	20	フェナントレン-d10
アントラセン	7.34	178.0	20	フェナントレン-d10
ピレン	10.31	202.0	20	フェナントレン-d10
ベンゾ[a]アントラセン	13.83	228.0	20	クリセン-d12
クリセン	13.93	228.0	20	クリセン-d12
ベンゾ[b]フルオランテン	16.99	252.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[k]フルオランテン	17.08	252.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[a]ピレン	17.85	252.0	20	ベリレン-d12
ベリレン	18.09	252.0	20	ベリレン-d12
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	20.72	276.0	20	ベリレン-d12
ジベンズ[a,h]アントラセン	20.87	278.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[g,h,i]ピレン	21.29	276.0	20	ベリレン-d12
内部標準				
ナフタレン-d8	3.87	136.0	20	—
アセナフチレン-d10	5.52	162.0	20	—
フェナントレン-d10	7.22	188.0	20	—
クリセン-d12	13.86	240.0	20	—
ベリレン-d12	18.03	264.0	20	—

参考文献

1. Anon. *Compendium Method TO-13A*. Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, Cincinnati, OH, USA, **1999**.
2. Guo, Y.; Wu, K.; Xu, X. *J. Environ. Health* **2011**, *73*, 22-25.
3. Beyer, J.; Jonsson, G.; Porte, C.; Krahn, M. M.; Ariese, F. *Environ. Tox. and Pharma.* **2010**, *30*, 224-244.
4. Essumang, D. K.; Doodoo, D. K.; Adjei, J. K. *J. Food Composition and Analysis* **2012**, *27*, 128-138.
5. Takigami, H.; Suzuki, G.; Hirai, Y.; Sakai, S. *Chemosphere* **2009**, *76*, 270-277.
6. Ali, N.; Dirtu, A. C.; Eede, N. V. D.; Goosey, E.; Harrad, S.; Neels, H.; 't Manneetje, A.; Coakley, J.; Douwes, J.; Covaci, A. *Chemosphere* **2012**, *88*, 1276-1282.
7. Stapleton, H. M.; Keller, J. M.; Schantz, M. M.; Kucklick, J. R.; Leigh, S. D.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2365-2379.
8. Sverko, E.; Tomy, G. T.; Marvin, C. H.; Zaruk, D.; Reiner, E.; Helm, P. A.; Hill, B.; Mccarry, B. E. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 361-366.
9. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson, Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373-381.
10. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
11. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
12. Forsberg, N. D.; Wilson, G. R.; Anderson, K. A. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8108-8116.
13. Smith, D.; Lynam, K. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Analysis in Fish by GC/MS Using Agilent Bond Elut QuEChERS Sample Preparation and a High Efficiency DB-5ms Ultra Inert GC Column*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-6668EN, **2012**.
14. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 80-92.

詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。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. 2015

Printed in Japan

July 30, 2015

5991-6088JAJP



Agilent Technologies