

Agilent Bond Elut EMR Lipid と GC/MS/MS によるアボカド中の 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

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

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、分析対象成分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。今回の実験では、GC/MS/MS を使用して、アボカドに含まれる GC で検査可能な 23 種類の農薬の分析にこの製品が適用できることを示しています。手順は、QuEChERS AOAC 抽出、その後の EMR Lipid 分散キットおよび脱水キットを使用します。EMR Lipid は、C18/PSA およびジルコニアベースの充填剤と比較して、質量、GC/MS フルスキャン、マトリックスの効果測定について非常に優れたマトリックス除去を実現しています。さらに、分析流路内に導入されるマトリックスの量も低減します。データは、C18/PSA や特にジルコニアと比較して、100 回の注入におよぶ分析でも再現性が非常に向上し、応答偏差が大きいことを示しています。EMR Lipid は脂質に対して非常に選択性が高く、分析対象成分の回収率を損ないません、分析対象成分の回収率は高く、精度も優れています。この実験は、EMR Lipid 分散キットが QuEChERS のワークフローに適しており、アボカド中の残留農薬分析で確実なマトリックスの除去を可能にし、迅速で堅牢、効率的なサンプル前処理が実現することを示すものです。



Agilent Technologies

はじめに

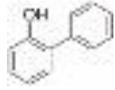
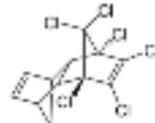
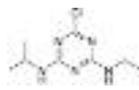
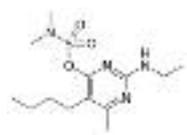
食品中の農薬残留物の分析は、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) メソッドを使用する多くのラボにとってルーチンワークとなっています [1, 2]。このメソッドを使用すると 1 回の抽出で低濃度の数百種類の農薬を分析できます。メソッドはさまざまな果物や野菜に対して適切に機能しますが、アボカドやナッツなどの高脂質の食品および動物由来の食品に対しては課題を伴います [3, 4]。これらの課題に対処することは、食品の安全性を保証するために、政府機関が要求する厳しいバリデーション基準への適合を担うラボにとって最も優先するべきことです。

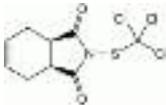
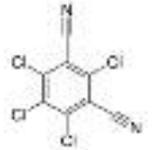
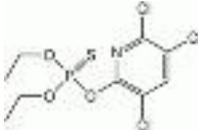
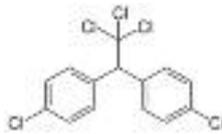
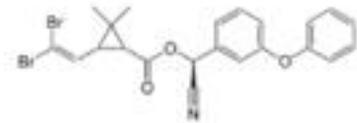
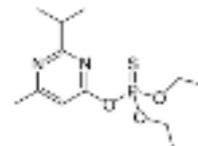
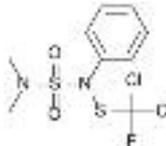
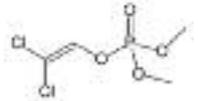
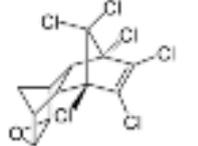
分析では LC と GC を組み合わせて使用し、多くのマルチクラス、複数残留物メソッドに関連する、揮発性、半揮発性、非揮発性の農薬に対応します [4]。多くの農薬は LC と GC の両方で検査できますが、一方で多くの農薬はいずれでも検査できません。それぞれの手法は、成分定量において固有の長所と短所を持ち、共溶出マトリックスから有害な作用を受けます。これらの共溶出物の除去は、複雑な食品マトリックス中での正確な定量にとって必須であり、C18、PSA、GCB などのマトリックス除去充填剤による処理が必要です [5]。ジルコニウムを含む他の材料は市販のもので、一般的なマトリックス除去充填剤と比べると脂質除去は概ね向上しています。しかし、すべての脂質クラスを除去ターゲットとしていない一方で、分析目

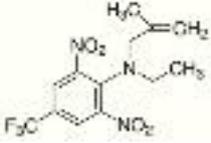
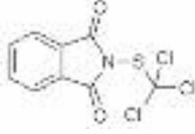
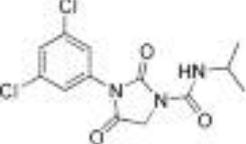
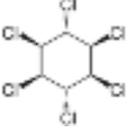
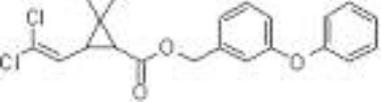
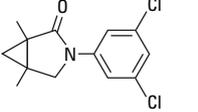
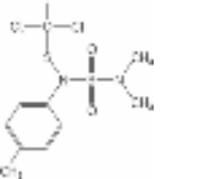
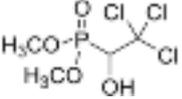
的の成分を除去してしまう場合があります [6, 7]。脂質含有量の高いサンプルでは、固相抽出カートリッジ (SPE) [7, 8, 9] またはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) [10] を使用したクリーンアップが必要となる場合もあり、時間とコストがさらにかかります。

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid は、最新の充填剤で、成分損失なしに主な脂質クラスをサンプル抽出物から選択的に除去します。複雑なマトリックスから脂質の干渉を除去することは、特に分析対象物質と同時に大量のマトリックスも抽出してしまう QuEChERS において非常に重要です。アボカドは、その脂質含有量の多さ (15~20 %) から難しいマトリックスとして知られています。そのため、今回は EMR Lipid の評価を目的として代表サンプルとして選択しました。この実験では、GC で検査できる 23 種類の農薬の分析でのサンプル前処理について、QuEChERS AOAC 抽出と EMR Lipid 分散キットおよび脱水キットの組み合わせを用いて調査します。適用範囲を広げるために、農薬は 10 種類の異なるクラス由来のものとし (表 1)。このアプリケーションノートでは、アボカドなどの複雑で脂質量の多いサンプルに対して EMR Lipid が提供するきわめて優れたクリーンアップ性能と、23 種類のマルチクラスの農薬残留物に対して高い回収率と精度を示すことを 3 つのレベルも分けて実証します。

表 1. ターゲット化合物、クラス、Log P、水溶性、化学構造 [11]。

| 名前 | カテゴリ | Log P | 水への溶解度 (mg/L) | 分子式 | 構造 |
|-------------|----------|-------|---------------|---|--|
| 2-フェニルフェノール | フェノール | 3.18 | 560 | C ₁₂ H ₁₀ O |  |
| アルドリノ | 有機塩素系 | 6.5 | 0.003 | C ₁₂ H ₆ Cl ₆ |  |
| アトラジン | トリアジン | 2.7 | 33 | C ₈ H ₁₄ ClN ₅ |  |
| ピリメート | ピリミディノール | 2.2 | 22 | C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S |  |

| 名前 | カテゴリ | Log P | 水への溶解度 (mg/L) | 分子式 | 構造 |
|-------------|---------|-------|------------------|---------------------------|--|
| キャプタン | フタルイミド | 2.5 | 5.1 | $C_9H_8Cl_3NO_2S$ |  |
| クロロタロニル | クロロニトリル | 2.94 | 1.0 | $C_8Cl_4N_2$ |  |
| クロルピリフォスメチル | 有機リン系 | 4.0 | 2.74 | $C_7H_7Cl_3NO_3PS$ |  |
| DDT | 有機塩素系 | 6.91 | 0.006 | $C_{14}H_9Cl_5$ |  |
| デルタメトリン | ピレスロイド | 4.6 | 0.0002 | $C_{22}H_{18}Br_2NO_3$ |  |
| ダイアジノン | 有機リン系 | 3.69 | 60 | $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$ |  |
| ジクロフルアニド | スルファミド | 3.7 | 1.3 | $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$ |  |
| ジクロロボス | 有機リン系 | 1.9 | 18,000 | $C_4H_7Cl_2O_4P$ |  |
| 硫酸エンドスルファン | 有機塩素系 | 3.13 | 0.48 | $C_9H_6Cl_6O_3S$ |  |
| エンドリン | 有機塩素系 | 3.2 | 0.24 | $C_{12}H_8Cl_6O$ |  |

| 名前 | カテゴリ | Log P | 水への溶解度 (mg/L) | 分子式 | 構造 |
|----------|-----------|-------|------------------|---|--|
| エタルフルラリン | ジニトロアニリン | 5.11 | 0.01 | C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ |  |
| フォルベット | フタルイミド | 3.02 | 0.8 | C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S |  |
| イプロジオン | ジカルボキシイミド | 3.1 | 12.0 | C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ |  |
| リンデン | 有機塩素系 | 3.5 | 8.52 | C ₆ H ₆ Cl ₆ |  |
| ベルメトリン | ピレスロイド | 6.1 | 0.006 | C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃ |  |
| プロシミドン | ジカルボキシイミド | 3.3 | 2.46 | C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ |  |
| スルホテップ | 有機リン系 | 3.99 | 10 | C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂ |  |
| トリルフルアニド | スルファミド | 3.9 | 0.9 | C ₁₀ H ₁₃ C ₁₂ FN ₂ O ₂ S ₂ |  |
| トリクロルホン | 有機リン系 | 0.43 | 120,000 | C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P |  |

実験方法

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。アセトニトリル (ACN) およびメタノールは Honeywell (マスキゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。試薬グレードの酢酸 (AA)、農薬標準試料、内部標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

溶液および標準試料

10 mL の酢酸を 990 mL の ACN に加えて、ACN 中 1 % 酢酸溶液を準備しました。標準試料原液および内部標準 (IS) 原液は、それぞれ 2.0 mg/mL の、ACN またはメタノールのどちらかで作成しました。混合作業溶液は 25 µg/mL の ACN 溶液として調製しました (キャプタン、フォルペット、トリクロロホン、ブピリメートを除く)。これらの 4 つの化合物については機器に対する反応が比較的低いため、混合作業溶液中で 5 倍濃い濃度にするため 125 µg/mL で調製しました。ACN 中に調製した 25 µg/mL の混合 IS 作業溶液には、TPP、パラチオンエチル-D₁₀、¹³C-DDT が含まれます。

装置

サンプル前処理法用に使用した機器および材料は以下のとおりです。

- ジェノグラインダー (SPEX、メアチェン、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)
- エッペンドルフ小型遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Vortexer および Multi-Tube 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ペンサ (VWR、サウスプレインフィールド、ニュージャージー州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010) および Agilent Bond Elut for QuEChERS EMR Lipid 脱水キット (部品番号 5982-0101)

使用機器

分析は、Agilent 7890A GC と、Agilent 7693B オートサンブラおよび Agilent 7000C トリプル四重極 GC/MS システムを組み合わせて実施しました。カラムバックフラッシュを適用しましたが、これは複雑なサンプルマトリックスの測定で推奨しています [12]。標準をスパイクしたサンプルの分析時間の合計は 23 分、カラムバックフラッシュの時間は 2 分でした。

機器条件

GC 条件

| | |
|------------------------|---|
| オートサンブラ: | Agilent 7693 オートサンブラおよびサンプルトレイ 10 µL シリンジ (部品番号 G4513-80220)、注入量 1 µL ポスト注入溶媒 A (アセトニトリル) 洗浄 3 回 サンプルポンプ 3 台 ポスト注入溶媒 B (イソプロパノール) 洗浄 3 回 |
| カラム: | Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、 0.25 mm × 15 m、0.25 µm (p/n 122-5512UI) |
| キャリア: | ヘリウム、コンスタントプレッシャーモード |
| ガスフィルタ: | ガスクリーンキャリアガスフィルタキット、 1/8 インチ (部品番号 CP17974) |
| 注入ロライナ: | Agilent ウルトライナートシングルテーパーブリットレスライナ、ウール入り (部品番号 5190-2293) |
| 注入口: | マルチモード注入口でバルスドコールドスプリットレスモードを使用、初期温度 75 °C、0.02 分間維持した後 750 °C/min で 350 °C に昇温 |
| 注入パルス圧力: | 36 psi、0.75 分まで |
| スプリットベントへの パーズ流量: | 0.75 分で 60 mL/min |
| 注入口圧力: | 測定時 17 psi、バックフラッシュ時 1.0 psi |
| 昇温プログラム: | 60 °C で 2.57 分間、その後 50 °C/min で 60 °C~150 °C、 6 °C/min で 150 °C~200 °C、16 °C/min で 200 °C~300 °C、 300 °C で 3 分間保持 |
| ポストラ: | 300 °C で 2 分間 |
| キャピラリー・フロー・ テクノロジー: | UltiMetal Plus パージ付 Ultimate ユニオン (部品番号 G3182-61581)、分析カラムおよび 注入口のバックフラッシュ用 |
| Aux EPC ガス: | パージ付き Ultimate ユニオンに配管されたヘリウム |
| ブリードライン: | 外径 0.0625 インチ x 内径 0.010 インチ x 100 cm、 316SS チューブ、オープンの上部に配置 |
| Aux 圧力: | 測定時 4 psi、バックフラッシュ時 75 psi |
| カラム 1 の接続: | 注入口とパージ付き Ultimate ユニオンの間 |
| リストリクタ: | 不活性フューズドシリカチューブ、 0.65 m × 0.15 mm (部品番号 160-7625-5) |
| カラム 1 の接続: | パージ付き Ultimate ユニオンと MSD の間 |
| MSD の条件 | |
| MSD: | Agilent 7000C トリプル四重極 GC/MS、イナート、 パフォーマンスエレクトロニクス付き |
| 真空ポンプ: | パフォーマンススターボ |
| モード: | MRM |
| チューニングファイル: | Atune.u |
| トランスファーライン温度: | 280 °C |
| ソース温度: | 300 °C |
| 四重極温度: | 150 °C (Q1 および Q2) |
| 溶媒待ち時間: | 2.57 分 |
| コリジョンガスフロー: | He クエンチガス 2.35 mL/min、N2 コリジョンガス 1.5 mL/min |
| MS 分離能: | MS1 および MS2 は 1.2 u |

分析対象成分ごとの MRM パラメータは、Agilent 農薬および環境汚染物質 MRM データベース (G9250AA) を用いて、容易に最適化されます。このデータベースには、1,070 種類を超える化合物の MS/MS 条件とリテンションタイムの情報が収められています [13]。表 2 に、

この実験で使用したターゲット化合物の MRM トランジションをまとめています。調査対象の 23 種類の農薬に対する標準的な GC/MS/MS クロマトグラムを例を図 1 に示しています。

表 2. GC/MS/MS MRM 条件および農薬分析に対するリテンションタイム

| 分析対象成分 | RT (分) | MRM | | | |
|-------------------------------|--------|---------------|--------|---------------|--------|
| | | 定量チャンネル | CE (V) | 定性チャンネル | CE (V) |
| ジクロルボス | 4.70 | 184.9 → 93 | 10 | 109 → 79 | 5 |
| トリクロルホン | 5.94 | 110.8 → 47 | 30 | 81.8 → 47 | 50 |
| 2-フェニルフェノール | 6.39 | 169 → 115.1 | 25 | 170 → 141.1 | 25 |
| エタルフルラリン | 7.58 | 275.9 → 202.1 | 15 | 315.9 → 275.9 | 10 |
| スルホテップ | 7.83 | 237.8 → 145.9 | 10 | 201.8 → 145.9 | 10 |
| アトラジン | 8.69 | 214.9 → 58.1 | 10 | 214.9 → 200.2 | 5 |
| リンデン | 8.83 | 181 → 145 | 15 | 216.9 → 181 | 5 |
| クロクタロニル | 9.20 | 263.8 → 168 | 25 | 265.8 → 231 | 20 |
| ダイアジノン | 9.22 | 137.1 → 54 | 20 | 199.1 → 93 | 20 |
| クローピリフォスメチル | 10.30 | 285.9 → 92.9 | 20 | 124.9 → 47 | 15 |
| ジクロフルアニド | 11.31 | 223.9 → 123.1 | 20 | 123 → 77 | 20 |
| アルドリン | 11.55 | 262.9 → 192.9 | 35 | 254.9 → 220 | 35 |
| パラチオンエチル D ₁₀ (IS) | 11.96 | 98.7 → 67 | 10 | 114.9 → 82.9 | 20 |
| トリルフルアニド | 12.80 | 136.9 → 91 | 20 | 136.9 → 65 | 30 |
| キャプタン | 12.96 | 151 → 79.1 | 15 | 149 → 79.1 | 10 |
| フォルベット | 13.13 | 259.8 → 130.1 | 15 | 261.8 → 130.1 | 15 |
| プロシミドン | 13.13 | 282.8 → 96 | 10 | 96 → 67.1 | 10 |
| ピリメート | 15.44 | 272.9 → 193.1 | 15 | 272.9 → 108 | 5 |
| エンドリン | 15.68 | 316.7 → 280.8 | 5 | 244.8 → 173 | 30 |
| 硫酸エンドスルファン | 17.44 | 273.9 → 238.9 | 15 | 271.9 → 237 | 15 |
| ¹³ C-DDT (IS) | 17.69 | 246.5 → 177.1 | 15 | 248.5 → 177.1 | 15 |
| DDT | 17.69 | 235 → 165.2 | 20 | 237 → 165.2 | 20 |
| TPP (IS) | 18.20 | 325.9 → 169 | 30 | 325.9 → 233 | 27 |
| イブプロジオン | 18.82 | 313.8 → 55.9 | 20 | 187 → 124 | 25 |
| ベルメトリン | 20.68 | 183.1 → 153.1 | 15 | 183.1 → 153.1 | 15 |
| デルタメトリン | 22.51 | 252.9 → 93 | 15 | 181 → 152.1 | 25 |

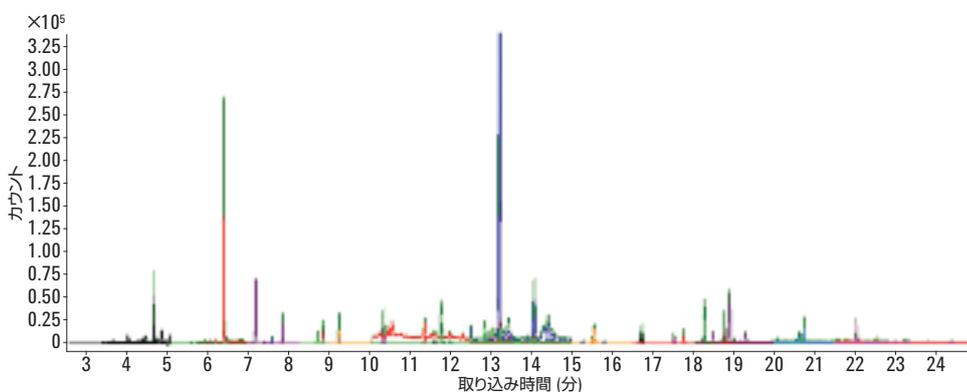


図 1. 農薬標準 50 ng/g を添加したアボカドサンプルの標準的な GC トリプル四重極クロマトグラム (MRM)。サンプル前処理は QuEChERS と Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップを組み合わせ実施

サンプル前処理

最終的なサンプル前処理手順は以下のように最適化しました。

1. ホモジナイズしたアボカド 15 g (±0.1 g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
2. 15 mL のアセトニトリル (1% AA) を加え 10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する
3. AOAC 抽出 QuEChERS キット (P/N 5982-5755) を加える
4. 振とう機で 2 分間混合する
5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
6. 水 5 mL を 15 mL の EMR Lipid 分散キットに加え、上澄み 5 mL を EMR Lipid チューブに移す
7. 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを攪拌した後、さらに 60 秒、Multitube Vortexer でバッチ全体をボルテックスミキサーで攪拌する
8. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
9. 上澄み 5 mL を、塩 (1:4、NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL の EMR Lipid 脱水キットに移し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
10. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
11. 上澄みの ACN 層を GC/MS/MS 注入用のサンプルバイアルに移す

サンプル前処理全体のワークフローを図 2 に示します。

キャリブレーション標準と品質管理サンプル

混合標準作業溶液を相当する濃度で添加し、プレスパイクした QC サンプルを作成してステップ 1 以降を 6 回繰り返しました。QC サンプルはアボカド中の 5、50、300 ng/g に相当する濃度の農薬を添加してあります。キャプタン、フォルペット、トリクロルホン、ピリメートに対する QC サンプルは 25、250、および 1,500 ng/g 相当のものを作成しました。IS 溶液をマトリックスブランク以外のすべてのサンプルにアボカド中の 250 ng/g に相当する濃度でスパイクしました。

標準および IS 分析溶液を使用して、ステップ 10 の後、マトリックスブランクサンプルに追加し、アボカド中の 1、5、10、50、100、200、300、および 400 ng/g と、250 ng/g IS に相当するマトリックスキャリブレーションサンプルを作成しました。4 つの農薬については、5、25、50、250、500、1,000、1,500、2,000 ng/g でマトリックスキャリブレーションサンプルを作成しました。

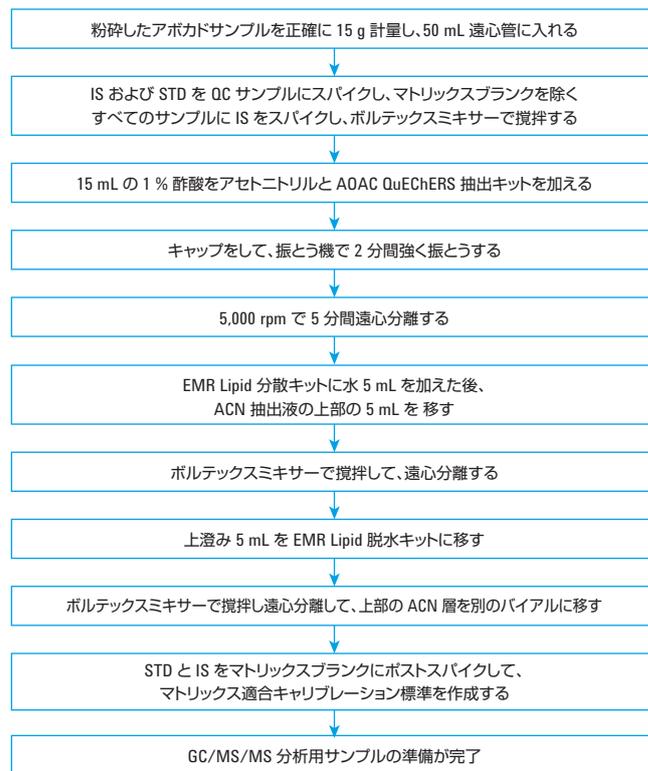


図 2. GC/MS/MS による、Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを用いたアボカド中の農薬分析のための QuEChERS 抽出を示すサンプル前処理ワークフロー

マトリックスクリーンアップの評価

アボカド抽出液を異なる 3 つのクリーンアップ材料、高脂質対応の dSPE (C18/PSA)、ジルコニア充填剤、EMR Lipid に適用しました。実験では、クリーンアップの前と後に最終抽出液の GC/MS フルスキャンプロファイルと比較しました。クロマトグラフバックグラウンドごとにマトリックスのクリーンアップ量を比較するためにクロマトグラムを重ね表示しました。マトリックスクリーンアップの効率を定量評価するために、GC/MS フルスキャンクロマトグラムを全体でマニユアル積分しました。マトリックス除去の効率については、方程式 1 に沿って計算しました。

$$\% \text{マトリックス除去} = \frac{\text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしないサンプル}} - \text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしたサンプル}}}{\text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしないサンプル}}} \times 100$$

方程式 1

EMR Lipid、C18/PSA、ジルコニア充填剤による処理の後のアボカド抽出物の重量を比較する重量測定実験を公開しています [14]。

メソッドの比較およびバリデーション

分析対象成分の回収率実験では、アボカド中に 50 ng/g の濃度でポストスパイクおよびプレススパイクしたサンプルを比較しました。サンプルは QuEChERS AOAC 抽出手順に続き EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニアのクリーンアップを用いて処理しました。EMR Lipid クリーンアップの場合、図 2 に示されたプロトコルに従いました。C18/PSA とジルコニア充填剤の各クリーンアップについては、同じ QuEChERS 抽出手順を適用しました。続けて、未処理の ACN 抽出液 1 mL を 2 mL C18/PSA dSPE チューブ (部品番号 5982-5122) または 100 mg のジルコニア充填剤を含む 2 mL バイアルに移しました。すべてのサンプルを 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌して小型遠心機により 13,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。次に ACN 層を GC/MS/MS 分析用のサンプルバイアルに移しました。標準および内部標準をブランクのアボカド抽出にポストスパイクして、マトリックスキャリアレーションサンプルを調製しました。回収率は、プレススパイク済みサンプルとポストスパイク済みサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

EMR Lipid メソッドは、アボカドで 3 つのレベルで 6 回繰り返して、8 ポイントのマトリックス適合検量線を使用して検証しました。定量には内部標準 (IS) を使用し、データは真度と精度として報告しました。

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響を測定するために、複数回にわたるアボカドサンプルの注入における分析対象成分の結果の一貫性を評価しました。実験では、EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニア充填剤で処理したアボカド抽出物を複数回注入することで、GC/MS/MS 上の分析対象成分の結果を経時比較しました。各テストバッチにはマトリックスブランクおよびポストスパイクした 50 ppb QC サンプルを使用しました。シーケンスでは 4 回マトリックスブランクを注入した後 5 回目に QC サンプルを注入する操作を繰り返し、合計 100 回の注入を実施しました。これは、異なるクリーンアップオプションを使用することで、GC/MS 流路表面に蓄積される除去されないマトリックスが分析対象成分の機器反応に与える影響を特定するためのものです。各クリーンアップについて、分析対象成分反応 (ピーク面積) を使用して 100 回の注入における %RSD を計算しました。GC 流路の影響を排除するため、各クリーンアップメソッドに対し、Agilent イナートフローパス用消耗品に加え、新しい Agilent ウルトライナートライナおよびカラムを使用しました。

結果と考察

マトリックスクリーンアップの評価

複雑なマトリックスは GC/MS の性能に大きく影響を及ぼします。マトリックスが GC 流路の表面に活性点を形成し、質量分析計にマトリックス効果を誘発して、最終クロマトグラムに干渉をもたらすためです。GC/MS (SIM) および GC/MS/MS (MRM) では、ターゲットイオンに対する選択性の向上が認められますが、除去されないマトリックスは依然として干渉を引き起こし、時間と共に性能を低下させる場合があります。アボカドのような高脂質マトリックスによるこのような悪影響を是正するために、より徹底したサンプル前処理クリーンアップメソッドを適用して、GC/MS 分析に適したサンプルを作成する必要があります。

図 3A は、アボカドのマトリックスブランクの GC/MS フルスキャンクロマトグラムと、EMR Lipid、C18/PSA、およびジルコニアのクリーンアップメソッドで得たクロマトグラフプロファイルを重ね表示したものです。追加のクリーンアップを行わないサンプルのクロマトグラム (黒) ではマトリックス干渉が強いことが示されています。これはターゲット化合物の分析をする上で妨げとなります。C18/PSA (青) およびジルコニア充填剤 (緑) によるクリーンアップで処理した抽出物のクロマトグラムでは、それぞれ 36 %、55 % の効率でマトリックスが除去されています。これは方程式 1 の算出結果と一致します。一方、EMR Lipid トレース (赤) では、GC/MS フルスキャンクロマトグラムでこれらの干渉がベースライン近くまで除去されていることが示されています。これは 95 % のマトリックス除去に相当します。EMR Lipid の使用により大量のクリーンアップが成功したことで、アボカド中の農薬の分析に明確な影響が生じます。サンプル中のマトリックスが大幅に減少し、機器の性能に影響が及ぶからです。さらに、従来の QuEChERS ワークフローにおける単純な抽出と EMR Lipid の組み合わせによっても同様の結果が得られました。

図 3B は、農薬標準 50 ppb を添加したアボカドサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラムを重ね書きしたものを示しています。MS/MS システムの選択性が向上したため、GC/MS SIM またはフルスキャンクロマトグラムに比べマトリックスバックグラウンドの影響が小さくなります。C18/PSA (青) およびジルコニア (緑) については、分析対象成分に対する選択性が優れているにもかかわらず、クロマトグラム上の 11 分から 20 分の間で干渉ピークが残っていることがわかります。これらの干渉は、一部の分析対象成分の信号の正確な積分に影響を及ぼします。EMR Lipid 抽出では、図 3B の赤のトレースが示すようにバックグラウンドが大幅にクリーンアップされ、積分の真度が劇的に向上します。

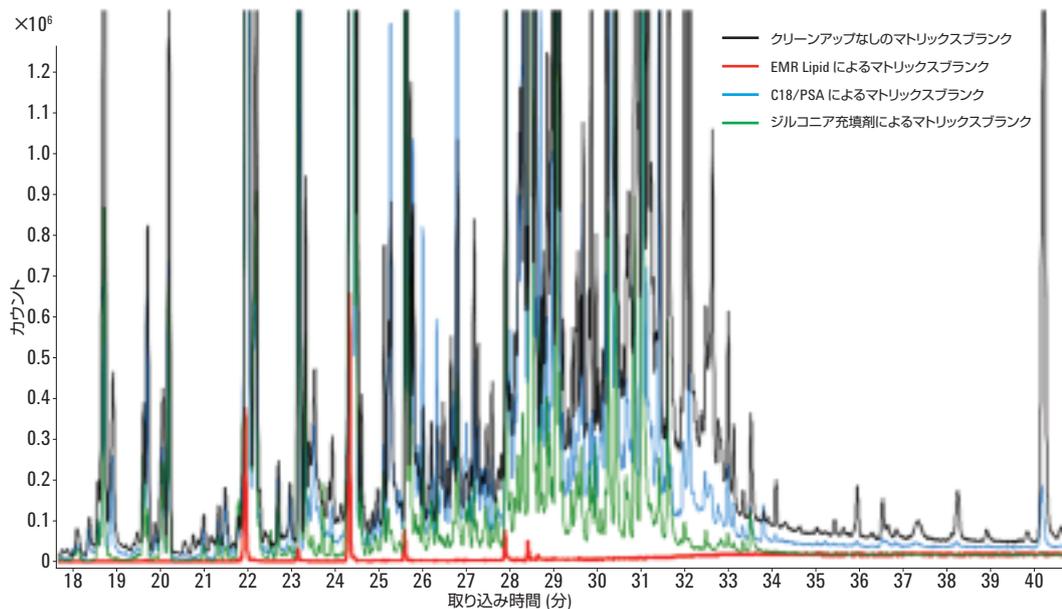


図 3A. QuEChERS AOAC 抽出後、Agilent Bond Elut EMR Lipid (赤)、ジルコニア (緑)、PSA/C18 (青)、クリーンアップなし (黒) で dSPE を実行して作成した、アボカドのマトリックスブランクの GC/MS フルスキャンクロマトグラムの重ね表示

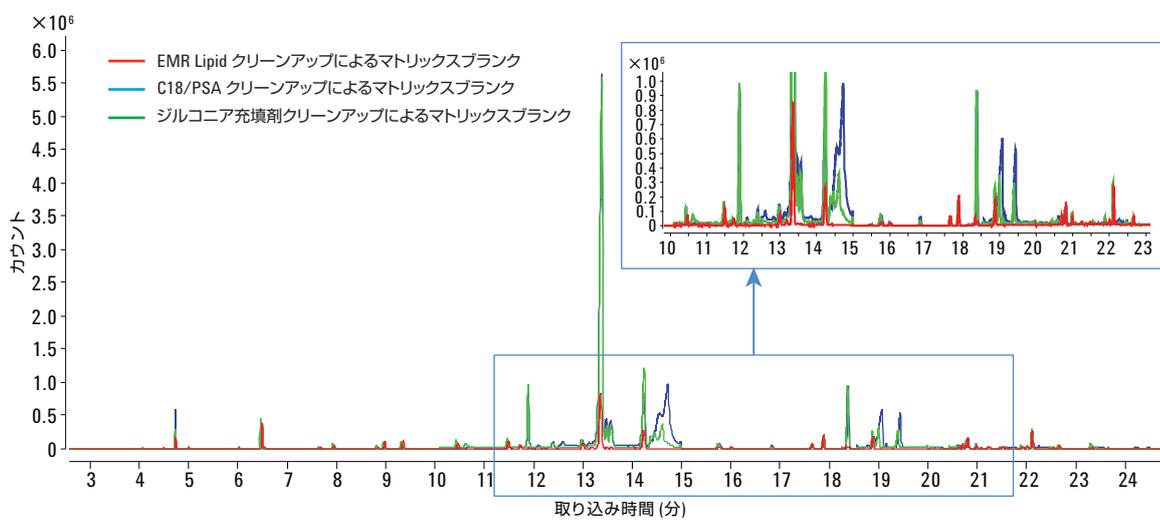


図 3B. QuEChERS AOAC 抽出後、Agilent Bond Elut EMR Lipid (赤)、C18/PSA (青)、ジルコニア充填剤 (緑) を使用して作成した、アボカドサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラムの重ね表示。すべてのサンプルに農薬標準 50 ppb を添加

EMR Lipid のマトリックスクリーンアップの向上と、3 種類の分析対象成分に対する優れたマトリックス除去効果を図 4 で示しています。すべてのケースにおいて、EMR Lipid クリーンアップを使用したクロマトグラムでは干渉ピークが低減し、信号/ノイズ比が向上し、確実なベースライン積分が可能です。このような改善により、データの処理と確認が迅速化および簡素化され、分析メソッドにおいて高い信頼性が構築されます。

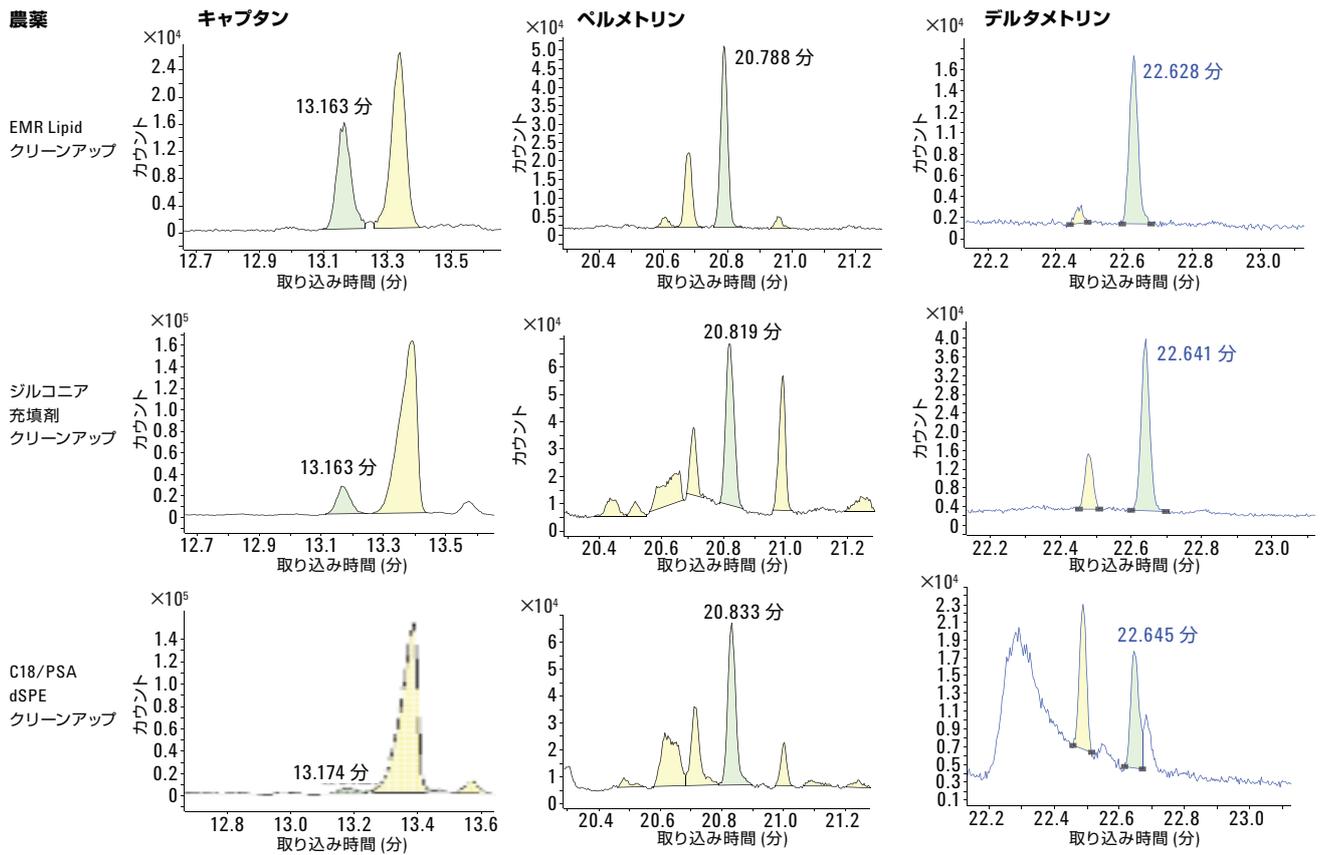


図 4. 分析対象成分と、MRM におけるマトリックスの影響を比較したクロマトグラム。

ブランクサンプルは Agilent Bond Elut EMR Lipid、ジルコニア、または PSA/C18 で処理し、最終サンプルには農薬標準 50 ppb をポストスパイク

分析対象成分の回収率についてのメソッドの比較

次に、最適化された EMR Lipid メソッドを、C18/PSA またはジルコニア充填剤を使用した従来の QuEChERS メソッドと比較しました。図 5 はこれらの異なるクリーンアップ方法を使用した 23 種類すべての農薬について回収率を比較したものです。結果は、EMR Lipid クリーンアップは分析対象成分の回収率の低下を引き起こさないため、C18/PSA クリーンアップと同等の回収率が得られることを示しています。しかし、すでに示したとおり C18/PSA およびジルコニア充填剤では、効率的にマトリックスを除去することはできません。

分析対象成分の一部には、クリーンアップメソッドに関係なく低い絶対回収率を示すものがあります。アルドリン、エンドリン、および DDT は回収率が 60 % を下回り、ペルメトリンとデルタメトリンの回収率はそれぞれ 63 %、75 % でした。C18/PSA クリーンアップの回収率は、EMR Lipid およびジルコニア充填剤での各クリーンアップに比べわずかに上回りました。これらの農薬は高い疎水性 (高 log P) と低い水溶性を備え、アボカドのような高脂質サンプルマトリックスに直ちに混和します。これはアセトニトリルのような極性溶媒による抽出を困難にします。強い溶媒を使用すれば、高脂質マトリックスからこれらの疎水性分析物を抽出する効率が向上し、絶対回収率も改善する可能性があります。高脂質マトリックスからの疎水性化合物抽出の効率と EMR については、今後研究の予定です。

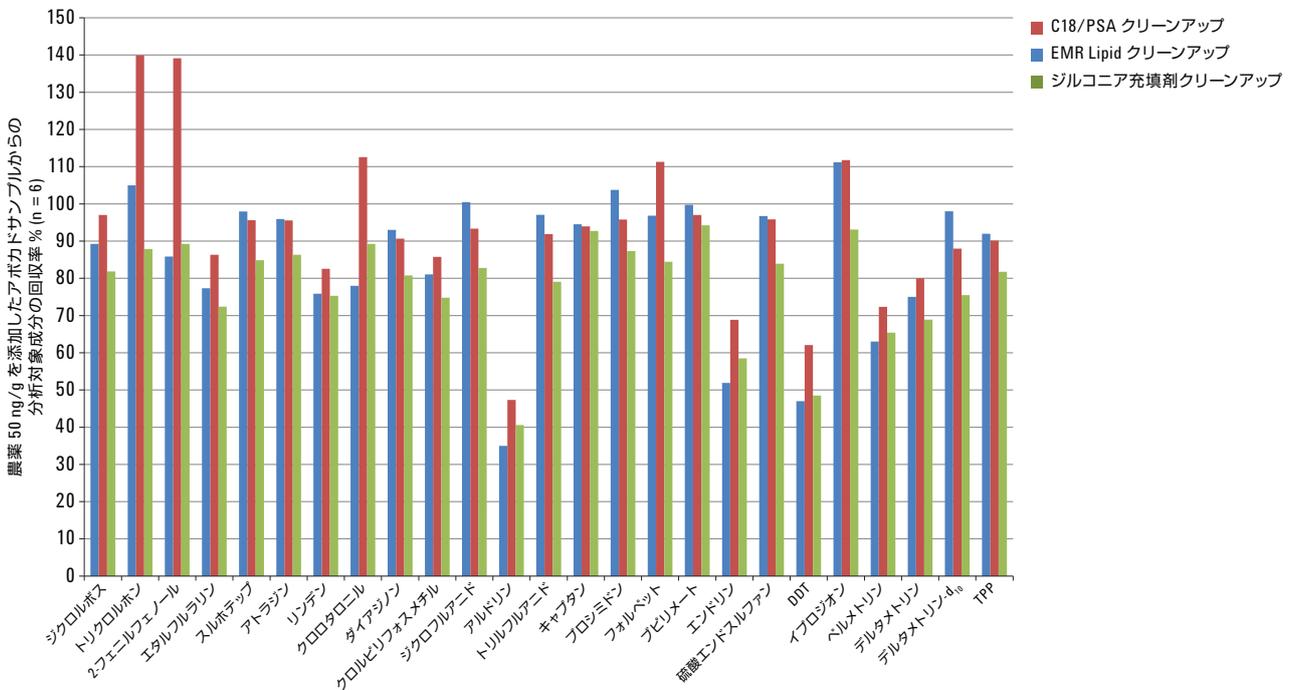


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid、C18/PSA、ジルコニアでの各クリーンアップ間における、アボカド中の 50 ppb 添加での回収率の比較

絶対回収率が低いこれらの化合物を補正するために、ラベル化された安定内部標準である ¹³C-DDT を使用して、最終の定量結果における DDT、アルドリン、エンドリンの真度を改善しました。ペルメトリンとデルタメトリンの内部標準としては TPP の使用が定量に適していました。

メソッドバリデーション

完全な定量バッチを実行することで、EMR Lipid メソッドのバリデーションを行いました。定量には内部標準 (IS) を使用し、結果は真度と精度として報告しました。3 種類の内部標準 (パラチオンエチル-D₁₀、¹³C-DDT、TPP) を定量に使用しました。リテンションタイムが 12 分より短い対象分析物にはパラチオンエチル-D₁₀ を、12 分より長い

ものには TPP を内部標準として使用しました。前述のとおり、アルドリン、エンドリン、DDT については ¹³C-DDT を内部標準とし、抽出効率の低さによる成分の損失を補正しました。

バリデーション結果の詳細を表 3 に示しています。図 6 は、QC を合計 18 回繰り返して計算した真度と精度の平均を利用してまとめた概要です (3 レベル、n=6)。農薬の真度は 1 つの成分 (67%) を除き 70% から 120% の間でした。精度についてはすべての対象分析物について 20% RSD を下回り、中でも 80% が 10% RSD を下回りました。アルドリンの真度は 70% をわずかに下回りましたが、精度は良好 (RSD が 6% 未満) で、SANCO ガイドラインの基準では許容範囲です [15]。

表 3. 5、50、300 ng/g の各レベルでスパイクし 6 回繰り返して分析したアボカド中の農薬の定量結果

| 分析対象成分 | 検量線 | | メソッドの真度および精度 (ng/g QCs ¹) | | | | | | |
|-------------|-------------|----------------|---------------------------------------|----------|------|----------|------|-------------|------|
| | 回帰適合/ 重み | R ² | キャリブ レーション レンジ (ng/g) | 5 (25) | | 50 (250) | | 300 (1,500) | |
| | | | | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD | 回収率 % | RSD |
| ジクロロポス | 直線、1/x | 0.9967 | 1-400 | 97 | 8.2 | 108 | 4.9 | 111 | 12.7 |
| トリクロロホン | 直線、1/x | 0.9964 | 5-2000 ¹ | 98 | 7.8 | 95 | 7.3 | 84 | 4.7 |
| 2-フェニルフェノール | 直線、1/x | 0.9996 | 10-400 ² | 97 | 14.0 | 104 | 1.7 | 105 | 5.1 |
| エタルフルラリン | 直線、1/x | 0.9969 | 1-400 | 109 | 3.2 | 98 | 7.6 | 110 | 6.5 |
| スルホテップ | 直線、1/x | 0.9958 | 1-400 | 96 | 5.8 | 76 | 3.9 | 85 | 9.8 |
| アトラジン | 直線、1/x | 0.9967 | 1-400 | 91 | 5.0 | 80 | 2.1 | 76 | 3.9 |
| リンデン | 直線、1/x | 0.9991 | 1-400 | 92 | 6.7 | 104 | 4.0 | 98 | 12.5 |
| クロロタロニル | 直線、1/x | 0.9944 | 1-400 | 89 | 13.5 | 103 | 8.6 | 92 | 19.4 |
| ダイアジノン | 直線、1/x | 0.9993 | 1-400 | 102 | 6.8 | 116 | 5.1 | 108 | 8.9 |
| クオルピリフォスメチル | 直線、1/x | 0.9984 | 1-400 | 101 | 6.2 | 123 | 4.5 | 113 | 15.0 |
| ジクロルアニド | 直線、1/x | 0.9989 | 1-400 | 96 | 10.2 | 85 | 5.1 | 91 | 4.3 |
| アルドリン | 直線、1/x | 0.9982 | 1-400 | 76 | 4.8 | 59 | 2.3 | 65 | 5.1 |
| トリルフルアニド | 直線、1/x | 0.9990 | 10-400 | 108 | 10.0 | 93 | 6.2 | 93 | 5.4 |
| キャプタン | 直線、1/x | 0.9959 | 25-2000 ^{1,2} | 89 | 8.2 | 109 | 11.0 | 87 | 18.1 |
| フォルベット | 直線、1/x | 0.9897 | 5-2000 ¹ | 76 | 9.5 | 79 | 9.9 | 87 | 13.2 |
| プロシミドン | 直線、1/x | 0.9977 | 1-400 | 87 | 5.0 | 76 | 1.9 | 79 | 7.2 |
| ブピリメート | 直線、1/x | 0.9957 | 5-2000 ¹ | 101 | 6.5 | 100 | 5.6 | 85 | 10.3 |
| エンドリン | 直線、1/x | 0.9967 | 1-400 | 75 | 10.8 | 88 | 6.7 | 80 | 13.6 |
| 硫酸エンドスルファン | 直線、1/x | 0.9996 | 1-400 | 96 | 9.9 | 97 | 6.4 | 95 | 4.9 |
| DDT | 直線、1/x | 0.9995 | 1-400 | 103 | 4.5 | 105 | 2.6 | 107 | 4.6 |
| イプロジオン | 直線、1/x | 0.9995 | 1-400 | 97 | 6.7 | 105 | 2.7 | 97 | 4.2 |
| ペルメトリン | 直線、1/x | 0.9992 | 1-400 | 87 | 6.6 | 97 | 4.3 | 84 | 14.0 |
| デルタメトリン | 直線、1/x | 0.9963 | 1-400 | 89 | 13.8 | 92 | 8.3 | 98 | 11.5 |

¹ 低反応のため、化合物は混合標準作業溶液の中で 5 倍濃い濃度で調製しました。そのため、その他の化合物に比べ、QC スパイクおよびキャリブレーション標準添加レベルが 5 倍高くなりました。

² 元の L00 では感度の低さ、またはマトリックス干渉ピークのどちらかが成分検出の妨げとなるため L00 を高くしました。

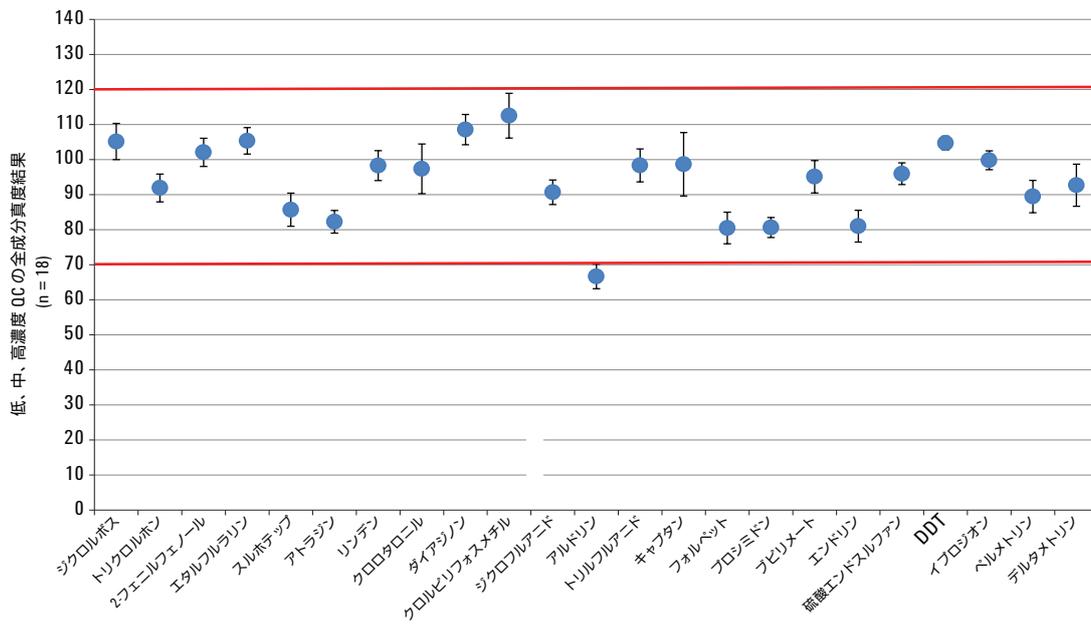


図 6. Agilent Bond Elut EMR Lipid を使用した QuEChERS 抽出により検出したアボカド中の 23 種類の農薬の定量結果
 データポイントは真度と精度を示すもので、3 つのレベルで 6 回繰り返して計算しました。エラーバー = 95 % CI。

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響

マトリックス干渉は、多くのサンプルがシステムに注入される過程で、時間の経過とともに GC/MS/MS のシステム性能に影響を及ぼします。GC 流路の活性点は機器の性能にマイナスの影響を与える場合があります。Agilent イナートフローパスのコンポーネントにより GC 流路全体の確実な不活性化が実現します。これにより、成分の損失や分離の低下を招く、対象分析物と活性点の間の負の相互作用が大幅に低減します。ただし、マトリックスに高沸点化合物 (高脂質) が含まれると、流路表面に蓄積して新たな活性点が生成されます。これは、時間の経過とともに分析対象成分の反応の変化を招き、メソッドの信頼性に大きな影響を与えると同時にバッチごとの注入可能回数を低減させる場合があります。これを解決するために、ラボはライナの交換やカラムの調整/交換など機器のメンテナンスを頻繁に実施しなければならず、結果的にラボの生産性が低下することになります。

マトリックスのクリーンアップ評価および重量測定で示したとおり [14]、EMR Lipid で処理したサンプルはバックグラウンドが非常にクリーンで、GC/MS/MS システムに導入されるマトリックスの量も大幅に減少することが明らかです。GC/MS 流路に蓄積する活性点の数も減少するため、機器分析の一貫性が保たれます。GC/MS/MS で 100 回にわたるアボカドサンプルの注入を実施した場合の各成分の精度 (RSD) が良好なことが、これを裏付けています (表 4)。EMR Lipid で処理したサンプルでは、対象分析物の 91 % が RSD 15 % 未満を達成しました。ほとんどが 10 % 未満です。2 つの化合物、キャプタン (RSD 29.9 %) と DDT (RSD 21.6 %) については、100 回注入した結果高い RSD を示しましたが、最初の 50 回の注入での RSD はそれぞれ 11.1 % と 6.4 % でした。

表 4. GC/MS/MS を使用して Agilent Bond Elut EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニア充填剤で処理したアボカドサンプルを 50 回および 100 回注入した場合の分析対象成分の再現性 (RSD) の比較。50 ng/g でサンプルに添加。対象分析物のピーク面積を使用して RSD 結果を計算

| 農薬 | 100 回の注入での対象分析物の RSD (n = 20) | | | 50 回の注入での対象分析物の RSD (n = 10) | | |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|
| | EMR Lipid クリーンアップ | C18/PSA クリーンアップ | ジルコニア充填剤 クリーンアップ | EMR-Lipid クリーンアップ | C18/PSA クリーンアップ | ジルコニア充填剤 クリーンアップ |
| ジクロロボス | 6.2 | 10.5 | 16.8 | 2.2 | 9.4 | 6.3 |
| 2-フェニルフェノール | 7.0 | 13.6 | 19.5 | 5.0 | 12.4 | 8.4 |
| エタルフルラリン | 12.4 | 18.8 | 32.0 | 5.8 | 10.3 | 7.9 |
| スルホテップ | 7.1 | 11.8 | 17.2 | 3.1 | 6.4 | 10.8 |
| アトラジン | 6.8 | 12.2 | 19.1 | 3.2 | 12.2 | 5.2 |
| リンデン | 8.5 | 10.8 | 20.0 | 4.6 | 10.9 | 5.1 |
| クロロタロニル | 12.5 | 11.7 | 37.4 | 8.0 | 12.9 | 11.0 |
| ダイアジノン | 6.6 | 11.7 | 16.9 | 4.4 | 10.5 | 5.6 |
| クオルピリフォスメチル | 8.4 | 8.9 | 14.9 | 3.8 | 8.6 | 6.6 |
| ジクロフルアニド | 11.7 | 9.0 | 25.9 | 5.4 | 9.9 | 5.5 |
| アルドリン | 9.8 | 19.3 | 25.7 | 8.6 | 19.3 | 7.1 |
| トリルフルアニド | 10.5 | 6.6 | 17.8 | 4.2 | 6.9 | 6.6 |
| キャプタン | 29.9 | 51.9 | 47.1 | 11.1 | 24.9 | 21.7 |
| プロシミドン | 6.8 | 14.3 | 22.5 | 5.6 | 13.8 | 4.8 |
| ピリメート | 6.8 | 10.4 | 20.7 | 7.6 | 11.0 | 6.2 |
| エンドリン | 8.3 | 12.6 | 24.1 | 5.9 | 13.8 | 5.4 |
| 硫酸 | 8.5 | 12.1 | 22.4 | 5.3 | 12.7 | 6.4 |
| エンドスルフアン | 8.5 | 12.1 | 22.4 | 5.3 | 12.7 | 6.4 |
| DDT | 21.6 | 22.4 | 42.6 | 6.4 | 12.0 | 11.8 |
| イプロジオン | 11.0 | 10.7 | 40.0 | 8.2 | 10.9 | 16.3 |
| ベルメトリン | 6.8 | 11.8 | 18.8 | 5.2 | 11.2 | 8.6 |
| パラチオンエチル ₁₀ (IS) | 11.8 | 7.2 | 13.0 | 4.7 | 6.8 | 7.0 |
| TPP (IS) | 9.1 | 19.9 | 28.3 | 9.0 | 22.5 | 12.8 |

C18/PSA では分析対象成分の 74 % の RSD が 15 % 未満だったのに対し、ジルコニアは非常に低く、分析対象成分のわずか 9 % でした。ジルコニアで処理した抽出物は特に問題があり、100 回の注入で分析対象成分の 100% で RSD が 10 % を超え、57 % の RSD が 20 % を上回りました。これは、C18/PSA およびジルコニアによる各クリーンアップ抽出での高レベルの残存マトリックスが機器の性能に悪影響を及ぼし、その結果、分析対象成分反応に重大な変化が生じることを示しています。これらの結果は、EMR Lipid のマトリックス除去の卓越性を実証しています。EMR Lipid により GC 流路の活性点は減少し、複数注入に対する精度は向上し、機器メンテナンス頻度を下げることが可能になります。

結論

アボカドに含まれる GC で検査可能な 23 種類の農薬について、QuEChERS AOAC 抽出の後で Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用する迅速で信頼性があり堅牢なメソッドを開発し検証しました。マトリックス効果を評価し、従来の C18/PSA およびジルコニア充填剤によるクリーンアップと比較しました。EMR Lipid は C18/PSA およびジルコニア充填剤に比べ、GC/MS および GC/MS/MS の双方で優れたクロマトグラフクリーンアップを実現する結果となっています。EMR Lipid クリーンアップを導入すると、高脂質マトリックスのサンプル分析での GC/MS 使用が円滑になります。分析対象成分の回収率の比較では、EMR Lipid クリーンアップは C18/PSA と同等の結果が得られ、ジルコニア充填剤との比較ではより良好な結果となっています。優れたマトリックス除去性能はこのアプリケーションにおける EMR Lipid の最大の利点です。GC/MS/MS における 100 回の注入でも卓越した再現性を実証しました。C18/PSA 処理と、特にジルコニア処理によるサンプルの分析対象成分の精度は、100 回の注入実験で非常にばらつきがありました。そのため、EMR Lipid を dSPE クリーンアップ手段として QuEChERS ワークフローで使用すると、ラボの生産性向上、サンプルスループットの改善、データの処理と確認の簡素化、バッチ再実行の削減、機器メンテナンスの軽減が実現します。他の複雑で高脂質なサンプルやターゲット化合物での EMR の活用が今後も期待されます。

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1-20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80-92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107-5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373-381.
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, USA, 2014.*
http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. 「高マトリックス試料の残留農薬を高速分析するための新しいツール」アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-1716JAJP、**2004**.
13. Meng, C-K. 「GC/MS/MS アナライザと農薬および環境汚染物質 MRM データベース」アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9453JAJP、**2011**.
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN, **2015**.
15. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, SANCO/12571/2013, 19 November 2013; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

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
August 4, 2015
5991-6097JAJP



Agilent Technologies