アプリケーションノート

食品試験・農業

GC/MS/MS によるカリフォルニア州大麻管理局の規制対象農薬の高速分析

著者

Ron Honnold[1], Eric Fausett[1], Jessica Westland[1], and Anthony Macherone[1,2]

[1] Agilent Technologies, Inc.

[2] The Johns Hopkins University School of Medicine

はじめに

医療用または成人の嗜好用大麻の使用が合法である米国の多くの州とカナダでは、大麻の花に含まれる残留農薬の同定と定量が必要です。これらの地域では、アッセイと必要なハードウェアはほぼ共通ですが、複雑なマトリックス、膨大なターゲットリスト、地域固有の最大許容レベル/定量下限（LOQ）によって、分析の感度、特異性、真度、精度、堅牢性が損なわれる場合があります。また分析作業を複雑にするもう 1 つの要因は、Δ^9-テトラヒドロカンナビノール（THC）などの共抽出干渉物、その他のカンナビノイド、テルペン、ポリフェノール、クロロフィル、および *Cannabis spp* によって合成されるその他の多くの化学物質を除去するサンプル前処理手順が必要であるということです。

アジレントは 2018 年に、Pacific Agricultural Laboratories と共同で「A Novel Comprehensive Strategy for Residual Pesticide Analysis in Cannabis Flower」[1]を発行しました。その後、アジレントの Montreal Center of Excellence が「A Sensitive and Robust Workflow to Measure Residual Pesticides and Mycotoxins from the Canadian Target List in Dry Cannabis Flower」[2]を発行しました。このアプリケーションノートの研究では、Canopy Growth Corporation（オンタリオ州スミスス・フォールズに拠点を置くマリファナ栽培企業）から提供された乾燥大麻抽出物を使用しました。またアジレントは 2019 年 3 月に「Determination of Pesticides and Mycotoxins as Defined by California State Recreational Cannabis Regulations」を発行しました。[3] これらのアプリケーションノートでは、シングルストリームのサンプル前処理手順と、液体クロマトグラフ／トリプル四重極質量分析計（LC/MS/MS）およびガスクロマトグラフ／トリプル四重極質量分析計（GC/MS/MS）を用いた乾燥大麻マトリックス中の規制対象農薬の分析について説明しています。

今回の研究では、カリフォルニア州大麻管理局の規制対象となっている、GC/MS/MS で検出可能な乾燥花の抽出物に含まれる農薬を分析するための高速クロマトグラフィーメソッドを説明します。これらの農薬には、ペンタクロロニトロベンゼン（PCNB）、メチルパラチオン、キャプタン、および *cis/trans*-クロルデンなどが含まれます。この手法は「Determination of Pesticides and Mycotoxins as Defined by California State Recreational Cannabis Regulations」[3]と組み合わせて使用します。このアプリケーションノートでは、GC/MS/MS 分析にあわせて変更した最終希釈溶媒や希釈倍率のサンプル前処理手順も説明しています。

試薬と実験方法

Agilent 7890B ガスクロマトグラフと Agilent 7010B 質量分析計を組み合わせて使用しました。GC にはマルチモード注入口（MMI）、パージ付き Ultimate ユニオン（ミッドカラムバックフラッシュ用に構成）、15 m の HP-5MS UI カラム（p/n 19091S-431）2 本を取り付けました。注入口には 2 mm のウルトライナートディンプルスプリットレスライナ（p/n 5190-4006）と 11 mm のウルトライナートノンスティック高性能グリーンセプタム（p/n 5190-3158）を使用し、コールドパルスドスプリットレス注入用に構成しました。

7890B GC メソッドパラメータ

7693 オートサンプラの構成：5 µL シリンジ付きのフロントインジェクタ。2 µL の容量でサンプル洗浄に続き 3 回のサンプルポンプ。注入タイプは 2 層サンドイッチ（L1、L2）で、L1 エアギャップ、L2 注入量、および L2 エアギャップはすべて 0.2 µL に設定しました。サンドイッチ注入では濃度 10 % のアナライトプロテクタントを使用しました。アナライトプロテクタントの詳細については、付録を参照してください。

1.0 µL のサンプルを 2 秒の粘性待ち時間で注入しました。サンプル注入の排出スピードは、注入前後のドウェルタイムなしで 3,000 µL/min でした。洗浄溶媒 A と洗浄溶媒 B（いずれも 100 % の高純度な農薬グレードのアセトニトリル）の注入後洗浄を、各 4 µL で 4 回実施しました。溶媒洗浄の吸引および排出速度は 300 µL/min で、溶媒洗浄モードは A1-A6、B1-B4 でした。

パラメータ	設定値
MMI プログラム	パルススプリットレスモード、名目ヘッド圧力 19.768 psi
セプタムパージ流量	スイッチドモードで 3 mL/min、トータル流量 54.3 mL/min
注入パルス圧力	35 psi、0.95 分まで
スプリットベントへのパージ流量	0.98 分で 50 mL/min
ガスセーバー	20 mL/min（2 分後）
クライオガス	空気
初期注入口温度	70 ° C、保持時間は 0.35 分
注入口温度	350 ° C/min で注入温度 280 ° C まで昇温
注入口のポストラン温度	310 ° C
ポストランのトータル流量	25 mL/min
オーブンプログラム	70 ° C で 1 分 40 ° C/min で 170 ° C まで上昇（0 分間保持） 10 ° C/min で 250 ° C まで上昇（0 分間保持）
ポストラン温度	280 ° C
ポストラン（バックフラッシュ）時間	1.24 分（5 ボイドボリューム）
合計分析時間	11.5 分
合計ラン時間	12.74 分
合計サイクルタイム	15 分以内
カラム 1	15 m × 250 µm、0.25 µm HP-5MS ウルトライナート（19091S-431UI） ヘリウムキャリアガス（1.3 mL/min）
ポストラン（バックフラッシュ）フロー	−4.0296 mL/min
カラム 2	15 m × 250 µm、0.25 µm HP-5MS ウルトライナート（19091S-431UI） ヘリウムキャリアガス（流量上昇モード）
カラム 2 流量プログラム	最初に 3 mL/min で 0.95 分間保持してから、100 mL/min で 1.5 mL/min に低減
ポストラン（バックフラッシュ）フロー	4.4437 mL/min
コリジョンセル	ヘリウムクエンチガス 2.25 mL/min 窒素コリジョンガス 1.5 mL/min

7010B 質量分析計のメソッドパラメータ

溶媒ディレイは 7 分でした。質量分析計の動作モードは電子イオン化（EI）で、イオン源温度は 300 ° C、トランスファーライン温度は 280 ° C でした。表 1 にマルチプルリアクションモニタリング（MRM）トランジション、四重極分離能、コリジョンエネルギー、およびゲイン係数を示します。

表 1. 7010B 質量分析計での MS/MS 条件

時間セグメント	開始時間	化合物名	ISTD ?	プリカーサイオン	Q1 分離能	プロダクトイオン	Q2 分離能	ドウェル	コリジョンエネルギー	ゲイン係数
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	248.7	ワイド	144	ワイド	50	45	15
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	248.7	ワイド	141.9	ワイド	50	45	15
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	248.7	ワイド	213.9	ワイド	50	15	15
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	236.8	ワイド	143	ワイド	50	30	15
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	213.7	ワイド	178.9	ワイド	50	15	15
1	7	ペンタクロロニトロベンゼン	FALSE	106.9	ワイド	47	ワイド	50	45	15
2	8.14	パラチオンメチル	FALSE	262.9	ワイド	79	ワイド	75	30	15
2	8.14	パラチオンメチル	FALSE	262.9	ワイド	109	ワイド	75	10	15
2	8.14	パラチオンメチル	FALSE	125	ワイド	79	ワイド	75	30	15
2	8.14	パラチオンメチル	FALSE	125	ワイド	47	ワイド	75	10	15
3	9.35	キャプタン-d_6	TRUE	270	ワイド	84	ワイド	45	25	15
3	9.35	キャプタン-d_6	TRUE	154	ワイド	84	ワイド	45	20	15
3	9.35	キャプタン	FALSE	151	ワイド	79	ワイド	45	30	15
3	9.35	キャプタン	FALSE	151	ワイド	80	ワイド	45	30	15
3	9.35	キャプタン	FALSE	149	ワイド	79.1	ワイド	45	30	15
3	9.35	キャプタン	FALSE	149	ワイド	70	ワイド	45	15	15
3	9.35	キャプタン	FALSE	116.9	ワイド	82	ワイド	45	30	15
4	10.2	クロルデン	FALSE	377	ワイド	267.8	ワイド	75	25	15
4	10.2	クロルデン	FALSE	375	ワイド	265.8	ワイド	75	25	15
4	10.2	クロルデン	FALSE	271.8	ワイド	118.9	ワイド	75	15	15
4	10.2	クロルデン	FALSE	196	ワイド	126.1	ワイド	75	25	15

LC/MS/MS と GC/MS/MS に共通のサンプル前処理の詳細

代表的なサンプルを分析するには、大麻を抽出前に完全に均質化する必要があります。このためには、2 種類のセラミックホモジナイザ（p/n 5982-9313）またはステンレスビーズを刻んだ大麻のチューブに添加し、機械で 5 分以上高速振動させます。できれば垂直振動機器（ジェノグラインダータイプの機械）を使用してください。ホモジナイザによって、乾燥大麻が細かい粉末になります。

1. 均質化された大麻サンプルを 1.0 g 計量し、50 mL のポリプロピレン（PP）製遠心分離チューブに入れます。
2. 2 種類のセラミックホモジナイザを添加して密閉します。
4. スパイクされたクリーンアップ前のマトリックスサンプルを用意する場合は、農薬標準溶液、同位体標識されたキャプタン-d_6、およびマイコトキシン標準試料を乾燥大麻粉末にピペットで添加し、30 秒間撹拌します。
5. ステップ 3 からチューブに、農薬グレードのアセトニトリルを 15 mL 添加します。
6. 機械でチューブを 3 ～ 5 分高速振動させます。できれば垂直振動機器（ジェノグラインダータイプのマシン）を使用してください。これで農薬とマイコトキシンがアセトニトリルに抽出されます。
7. チューブの振動中に、SampliQ C18 EC 6 mL 500 mg の固相抽出（SPE）カートリッジ（p/n 5982-1365）をマニホールドに設置して、SPE マニホールドを前処理します。容量が 25 mL 以上のコレクションチューブを配置します。できればカートリッジの下で 50 mL の目盛付き PP 遠心分離チューブを使用して、溶出液が収集されるようにしてください。
8. ステップ 6 の上清を、SampliQ C18 EC SPE カートリッジに移します。これは重力によって流れます。
9. すべての溶媒が C18 カートリッジを通過して収集されたら、ステップ 6 から 5 mL のアセトニトリルを空のチューブに添加し、機械で 3 ～ 5 分高速振動させます。これで、大麻原料に残留していた農薬とマイコトキシンが抽出されます。
10. ステップ 9 の上清を、同じ SampliQ C18 EC SPE カートリッジに移します。
11. 最後の 5 mL のアセトニトリルで、ステップ 9 の空のチューブをすすいでチューブ壁に残っている可能性がある農薬をすべて洗浄し、この溶媒を同じ C18 カートリッジに通します。25 mL 未満のアセトニトリル抽出液が（15、5、および 5 mL の 3 つに分かれて）収集されます。
12. すべての溶出液をメスフラスコに移し、アセトニトリルを加えるか、50 mL の目盛付きポリプロピレン遠心分離チューブの 25 mL のマークを使用して、最終容量を 25 mL に調整します。撹拌します。これでサンプルが 25 倍に希釈されます。
13. クリーンアップされた抽出物（ステップ 12）をきれいなチューブに移し、密閉してラベルを付けます。

GC/MS/MS 固有の詳細なサンプル前処理

アジレントの一般的な GC/MS/MS サンプル前処理ワークフローは次のとおりです。

- 2 mL のバイアルに、25 倍に希釈した抽出液と 100 % の高純度な農薬グレードのアセトニトリルを 1 対 5 の比率で混合し、125 倍の希釈溶液にします。10 秒間撹拌します。これで、GC/MS/MS システムに注入するサンプルの準備が完了しました。

ただしこのアプリケーションノートでは、高マトリックス注入による注入条件の堅牢性のテストを試みました。このため上記のステップ 1 ～ 13 に従って、8 ～ 250 ppb の範囲（25 倍に希釈）で 6 点の検量線を作成しました。これは、乾燥花のマトリックスでは 200 ppb（0.2 µg/g） ～ 6,250 ppb（6.25 µg/g）に相当します。

結果と考察

成分の溶出順序は PCNB（7.587 分）、メチルパラチオン（8.486 分）、キャプタン-d_6（10.00 分）、キャプタン（10.040 分）、cis-クロルデン（10.334 分）、および *trans*-クロルデン（10.593 分）でした。図 1 は、バイアル中の 8 ppb の 5 種類の化合物の高速 GC/MS/MS の MRM クロマトグラム（乾燥花マトリックスでは 200 ppb）と、オートサンプラバイアル中の 8 ～ 250 ppb の範囲の直線検量線を示しています。

キャリブレータごとに 3 回、合計で 18 回注入して、検量線を作成しました。表 2 に LOQ、LOD、%RSD、R^2 の結果の概要を示します。

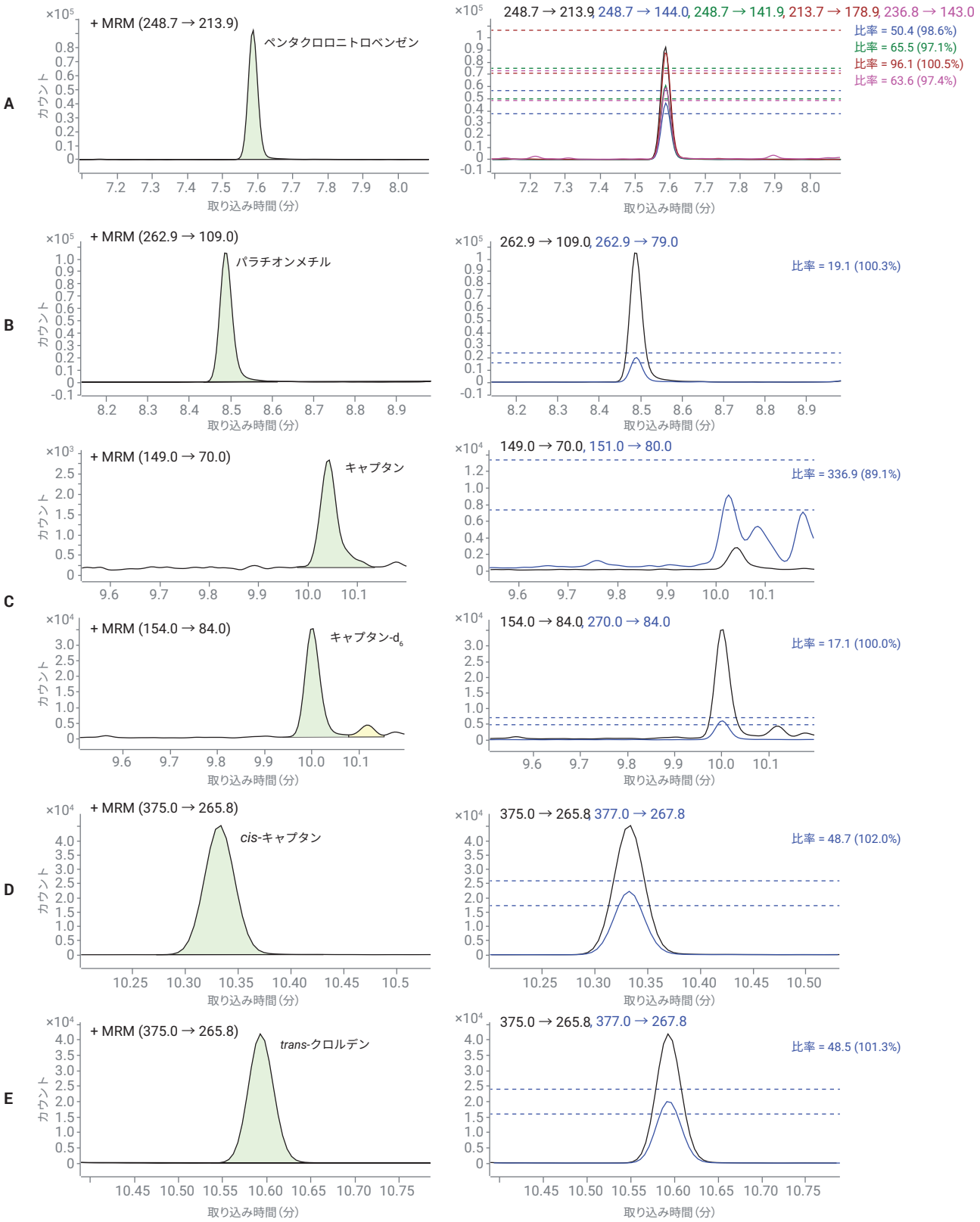

図 1. A：PCNB、B：メチルパラチオン、C：キャプタンおよびキャプタン-d_6 内部標準：D：*cis*-クロルデン、E：*trans*-クロルデン

表 2. 結果の概要。実験によるバイアル中における LOQ は 10:1 のシグナル/ノイズ比（S/N）で決定。
実験によるバイアル中における LOD は 3:1 の S/N で決定。マトリックス中の値はバイアル中の値に 25 倍の希釈係数を掛けて決定

化合物	CA カテゴリ	CA LOQ (ppb)	バイアル中における LOQ (ppb)	マトリックス中における LOQ (ppb)	バイアル中における LOD (ppb)	マトリックス中における LOD (ppb)	% RSD	R^2
PCNB	II	100.0	0.2	4.0	0.1	1.3	0.47	>0.999
メチルパラチオン	I	>LOD	0.5	11.8	0.2	3.9	2.85	>0.994
キャプタン	II	700.0	4.9	122.0	1.6	40.7	0.16	>0.998
cis-クロルデン	I	>LOD	0.05	1.3	0.02	0.4	0.16	>0.999
trans-クロルデン	I	>LOD	0.06	1.6	0.02	0.5	0.78	>0.999

結論

このアプリケーションノートで説明した高速 GC/MS/MS メソッドを用いると、乾燥花大麻マトリックスの分析において高い感度、真度、精度、堅牢性を実現できることがわかりました。注入口で 25 倍希釈の高マトリックスの注入を試したところ、50 ～ 60 回の注入ごとにライナ変更が必要でした。200 ～ 6,250 ppb のキャリブレーション範囲は、吸引製品では 700 ppb、その他の製品では 5,000 ppb でキャプタンの最大許容レベルを網羅します。

このメソッドは、カリフォルニア州固有のアジレントアプリケーションノート 5994-0648 と組み合わせて使用する必要があります。このアプリケーションノートには、LC/MS/MS と GC/MS/MS の両プラットフォーム用に設計されたシングルストリームのサンプル前処理が含まれます。

謝辞

本書の執筆にあたり、基本的な GC/MS/MS 手法を提示し、貴重なアドバイスを提供したアジレントの Jeffery S. Hollis に、感謝の意を表します。

参考文献

1. Asanuma, L.; *et al.*A Novel Comprehensive Strategy for Residual Pesticide Analysis in Cannabis Flower.*Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-9030, **2018**.
2. Roy, J-F.; *et al.*A Sensitive and Robust Workflow to Measure Residual Pesticides and Mycotoxins from the Canadian Target List in Dry Cannabis Flower.*Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0429, **2018**.
3. Stone, P. J. W.; *et al.*Determination of Pesticides and Mycotoxins as Defined by California State Recreational Cannabis Regulations. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0648, **2019**.

付録

アナライトプロテクタントの前処理

- L-グロン酸 γ-ラクトン（L-グロノラクトン）、CAS no.1128-23-0：純度 >95 %、Sigma-Aldrich
- (g) D-ソルビトール、CAS no. 50-70-4：純度 >95 %、Sigma-Aldrich

L-グロノラクトン原液

約 500 mg の L-グロノラクトンを量り、10 mL のメスフラスコに入れます。4 mL の水を添加し、アセトニトリルで量を増やします。必要に応じて、超音波処理して溶解します。

(k) D-ソルビトール原液

約 500 mg の D-ソルビトールを量り、10 mL のメスフラスコに入れます。5 mL の水を添加し、アセトニトリルで量を増やします。必要に応じて、超音波処理して溶解します。

(l) アナライトプロテクタント（AP）溶液（20 mg/mL の L-グロノラクトンと 10 mg/mL の D-ソルビトール複合溶液）

4 mL の L-グロノラクトン原液と 2 mL の D-ソルビトール原液を 10 mL のメスフラスコに入れ、アセトニトリルで量を増やします。

GC/MS/MS システムで使用する場合は、この混合液を 1:10 の割合でアセトニトリルで希釈し、オートサンプラの回転トレイの位置 2 に配置することを推奨します。標準のサンドイッチ手法を使用します。上下に 0.1 µL のエアプラグおよび 0.1 µL のアナライトプロテクタントを入れます。

使用時まで冷蔵しておきます。冷蔵庫に保管します。使用可能期間は 1 か月です。回転トレイ上では、時間がたつとこの混合液が分解されるため、3 日ごとにトレイ上の溶液を交換し、感度の低下やテーリングが発生しないようにする必要があります。

サンドイッチ注入の設定

上記の濃度で、オートサンプラの L2 の位置（2 mL のバイアル）に、アナライトプロテクタントを含むバイアルを配置します。2 µL のサンプルと 0.2 µL のアナライトプロテクタントを注入します。これは一種のマトリックスマッチング標準として機能します。これを使用して標準試薬とサンプルも注入します。

または、アナライトプロテクタントで各バイアルをスパイクすることもできますが、この方法ではサンプル前処理が増えます（この作業にはオートサンプラを使用することを推奨します）。

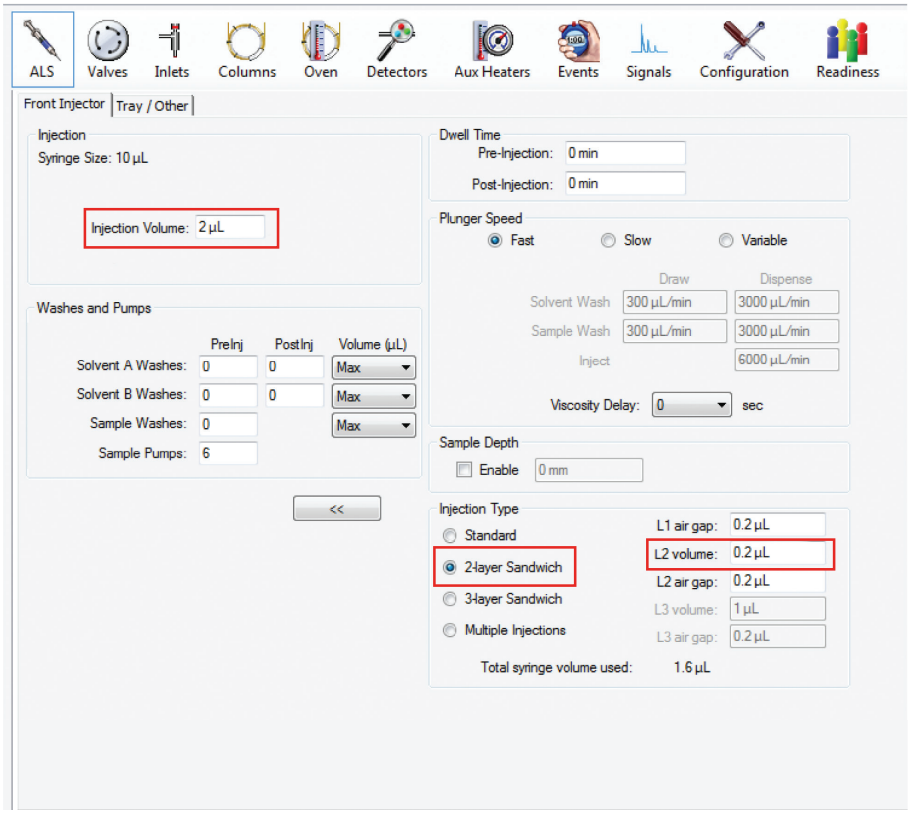

図 2. 2 層サンドイッチ注入の設定

免責事項

アジレントの製品および溶液は、大麻の品質管理および安全性試験の目的のために、州/国の法律で許可されているラボでの使用を想定しています。

ホームページ
www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ
0120-477-111
email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2019
Printed in Japan, August 27, 2019
5994-1019JAJP

Agilent
Trusted Answers