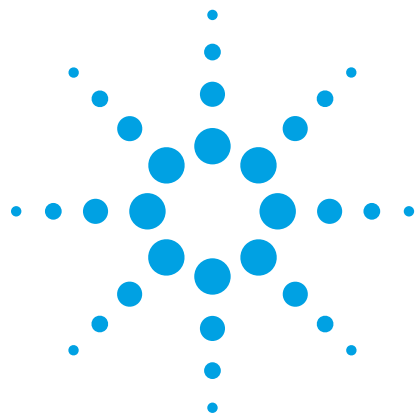




最適化された抽出/クリーンアップ 手法と Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS システムを使用した魚類 組織中の臭素化難燃剤 (BFRs) の測定

アプリケーションノート

食品安全性



著者

Kamila Kalachova, Jana Pulkrabova,
Tomas Cajka, and Jana Hajslova
Department of Food Analysis and
Nutrition
Institute of Chemical Technology,
Prague
Technicka 3
166 28 Prague 6
Czech Republic

Chris Sandy
Agilent Technologies UK Ltd
610 Wharfedale Road
Winnersh Triangle
Wokingham
Berkshire
RG41 5TP
UK

概要

このアプリケーションノートでは、魚類筋肉組織に含まれるポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDEs) と各種の代替臭素化難燃剤 (ABFRs) をハイスループットで高感度、そしてコスト効率の高い同時定性および定量分析メソッドの開発およびバリデーションについて説明します。トリプル四重極 GC/MS を使うことにより、サンプルの前処理を大幅に簡略することが可能でした。均質化したサンプルに水を加えた後、疎水性対象化合物は無機塩の添加により酢酸エチルへ転溶されます。その後、分離により得られた粗有機抽出物に含まれる多量の脂肪をシリカミニカラムで除去しました。最後に、Agilent 7890 GC / 7000B トリプル四重極 GC/MS システムのマルチブルリアクションモニタリング (MRM) モードを用いて魚類抽出物を分析しました。



Agilent Technologies

はじめに

魚類、特に脂肪分の多い魚類 (サケなど、一般にエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) などの ω -3 多価不飽和脂肪酸が含まれるもの) は循環器系に良く、冠動脈疾患の二次予防に適切であることが証明されています。逆に、これが臭素系難燃剤 (BFRs) などの一部の汚染物質に対する摂食曝露の危険性を増すこともあります。この結果、0.1 % を超える 5 臭化ジフェニルエーテル (5-BDE) と 8-BDE 工業混合物が含まれる食品製品が 2004 年 8 月に欧州連合 (EU) 市場で禁止され、2008 年 7 月には、10-BDE が含まれる電気および電子製品にも禁止の対象が広がりました [1, 2]。これらの法律制定の結果、商用に適した代替 BFRs が PBDEs の代替物質として導入されました。1,2-ビス (2,4,6-トリプロモフェノキシ) エタン (BTBPE) など、そのうちのいくつかはすでに環境中で検出されています [3]。したがって、食品の汚染を管理し、食品・飼料緊急警報システム (RASFF) に柔軟に対応する

ために、大量の信頼できるデータを短時間で収集できるシンプルで、低コスト、迅速、そして高感度な分析メソッドが必要とされています [4]。

実験方法

標準および溶液

BDE 28–203、HBB、PBT、PBEB、および BTBPE は、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100、および 500 ng/mL の濃度レベルで、BDE 206、207、209、および OBIND は 0.25、0.5、1、5、10、50、100、500、および 1,000 ng/mL の濃度レベルの検量線用の標準溶液をイソオクタンで調製しました。各キャリブレーションポイントに加えてイソオクタン中のサンプル抽出物には、サロゲート BDE 37 と、シリンジスパイク BDE 77 および ^{13}C -BDE 209 がそれぞれ 10、5、および 50 ng/mL の濃度になるよう調製しました。

表 1. 対象化合物、サロゲート (SUR)、およびシリンジスパイク (SS)

略語	対象化合物	CAS 番号
BDE 28	2,4,4'-トリプロモジフェニルエーテル	41318-75-6
BDE 37 (SUR)	3,4,4'-トリプロモジフェニルエーテル	147217-81-0
BDE 47	2,2',4,4'-テトラプロモジフェニルエーテル	5436-43-1
BDE 49	2,2',4,5'-テトラプロモジフェニルエーテル	243982-82-3
BDE 66	2,3',4,4'-テトラプロモジフェニルエーテル	189084-61-5
BDE 77 (SS)	3,3',4,4'-テトラプロモジフェニルエーテル	93703-48-1
BDE 85	2,2',3,4,4'-ペンタプロモジフェニルエーテル	182346-21-0
BDE 99	2,2',4,4',5'-ペンタプロモジフェニルエーテル	60348-60-9
BDE 100	2,2',4,4',6'-ペンタプロモジフェニルエーテル	189084-64-8
BDE 153	2,2',4,4',5,5'-ヘキサプロモジフェニルエーテル	68631-49-2
BDE 154	2,2',4,4',5,6'-ヘキサプロモジフェニルエーテル	207122-15-4
BDE 183	2,2',3,4,4',5',6'-ヘプタプロモジフェニルエーテル	207122-16-5
BDE 196	2,2',3,3',4,4',6,6'-オクタプロモジフェニルエーテル	N/A
BDE 197	2,2',3,3',4,4',6,6'-オクタプロモジフェニルエーテル	N/A
BDE 203	2,2',3,4,4',5,5',6'-オクタプロモジフェニルエーテル	N/A
BDE 206	2,2',3,3',4,4',5,5',6'-ノナプロモジフェニルエーテル	N/A
BDE 207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'-ノナプロモジフェニルエーテル	N/A
BDE 209	デカプロモジフェニルエーテル	1163-19-5
^{13}C -BDE 209 (SS)	^{13}C -デカプロモジフェニルエーテル	N/A
BTBPE	1,2-ビス (2,4,6-トリプロモフェノキシ) エタン	37853-59-1
HBB	ヘキサプロモベンゼン	87-82-1
PBEB	ペンタプロモエチルベンゼン	85-22-3
PBT	ペンタプロモトルエン	87-83-2
OBIND	オクタプロモトリメチルフェニルインダン	N/A

試薬および材料

- ヘキサン (極微量分析用、メルク、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- イソオクタン (極微量分析用、メルク、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- 酢酸エチル (GC 残留分析用、シグマ・アルドリッチ、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- ジクロロメタン (極微量分析用、メルク、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- 無水硫酸ナトリウム (Penta、チェコ共和国、またはこれと等価のもの)

無水硫酸ナトリウムを 600 °C で 7 時間加熱し、使用前までデシケータ中で保管しました。この硫酸ナトリウムは 1 ヶ月間の使用が可能です。

- シリカゲル (0.063~0.200 mm) (メルク、ドイツ、またはこれと等価のもの)

シリカゲルを 180 °C で 5 時間加熱して活性化させ、次に 2 % の脱イオン水を加え、3 時間振とうして不活性化させ、使用前に 16 時間デシケータ中で保管しました。このシリカゲルは 14 日間の使用が可能です。

- 硫酸マグネシウム (シグマ・アルドリッチ、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- 塩化ナトリウム (Lach-Ner、チェコ共和国、またはこれと等価のもの)
- ガラスウール (メルク、ドイツ、またはこれと等価のもの)
- ポリプロピレンチューブ、50 mL (Merci、フランス、またはこれと等価のもの)
- ガラスパスツールピペット、D812、長さ 230 mm (Poulten & Graf GmbH、ドイツ、またはこれと等価のもの)

機器

- 組織ブレンダー (レッチェ、ドイツ、ハーン)
- 真空ロータリエバポレータ、温浴付きビュッヒ Rotavapor R-114 および R-200 (Buchi、スイス)
- 遠心分離器、Rotina 35R (Hettich Zentrifugen、ドイツ)

サンプル前処理

10 g のホモジナイズした魚類組織 (サロゲート BDE 37 - 絶対量 10 ng) を 5 mL の蒸留水と混合し、ポリプロピレン製遠心分離チューブ内で 10 mL の酢酸エチルとともに、1 分間激しく振とうしました。次に、4 g の硫酸マグネシウムと 2 g の塩化ナトリウムをこの混合物に加えました。

チューブをさらに 1 分間振とうし、遠心分離し (5 分間、11,000 rpm)、有機層から 5 mL の上澄みを分取しました。乾燥窒素ガスを穏やかに流し、溶媒を慎重に留去しました。

蒸発乾固した抽出物を 1 mL の n-ヘキサンに再溶解し、自作のシリカゲルミニカラムを使用して精製しました。脂肪の測定と、魚類筋肉の脂肪含有量に応じたシリカミニカラムのサイズの見積りについては別の資料に説明があります [5]。収集した溶離液を真空ロータリエバポレータを使用して慎重に濃縮させ、穏やかな乾燥窒素ガス気流の下で残留溶媒を留去しました。残留物を、シリンジスパイクとして使用する BDE 77 (5 ng/mL) と ¹³C BDE 209 (50 ng/mL) が含まれる 0.5 mL のイソオクタンに再溶解しました。

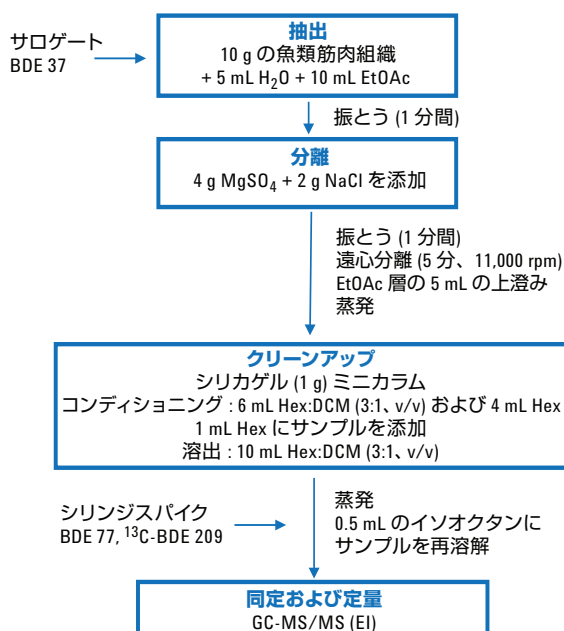


図 1. 鮮魚筋肉組織の抽出およびクリーンアップの一般的な方法 (Hex - n-ヘキサン、DCM - ジクロロメタン、EtOAc- 酢酸エチル)

機器による分析

測定は、Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS (Agilent Technologies) で行いました。GC システムには 7693A オートサンブラ (Agilent Technologies) と二酸化炭素冷却マルチモード注入口 (MMI) を接続しました。分離には DB-XLB キャピラリカラム (15 m × 0.18 mm、膜厚 0.07 μm、Agilent Technologies) を使用しました。GC の分析の条件を表 2 にまとめます。

表 2. GC 分析の最分析条件

Agilent 7890 GC の条件

カラム	15 m × 0.18 mm、0.07 µm DB-XLB (カスタムカラム、p/n N/A)
オートサンブラ 注入	Agilent 7693A オートサンブラ CO ₂ による冷却を使用した 2 µL コールドスプリットレス マルチモード注入口 (MMI)
注入ポートライナ	内径 2 mm ディンプル不活性化ライナ (p/n 5190-2296)
インジェクタ温度プログラム	80 °C (0.20 分間) - 600 °C/min - 285 °C
注入モード	コールドパルスドスプリットレス
注入パルス圧力	50 psi
スプリットレス期間	1.5 分間
スプリットベントへの パージ流量	50 mL/min で 1.0 分間
キャリアガス	ヘリウム
キャリアガス流量	1.5 mL/min (11 分間) - 15 mL/min - 3 mL/min
オン温度プログラム	110 °C (1.5 分間) - 30 °C/min - 110~320 °C (3.5 分間)
分析時間	12 分間

表 3. MS/MS メソッド

化合物名	プリカーサ イオン	MS1 分離能	プロダクト イオン	MS2 分離能	CE	RT ウィンドウ (min)	EM ゲイン
BDE 28	405.8	Wide	246	Wide	20	0.3	10
	407.8	Wide	248.1	Wide	22	0.3	10
PBT	406.7	Wide	325.8	Wide	16	0.3	10
	406.7	Wide	246.8	Wide	24	0.3	10
PBEB	499.7	Wide	484.6	Wide	19	0.3	10
	499.7	Wide	420.5	Wide	11	0.3	10
BDE 37	405.8	Wide	246.0	Wide	20	0.3	10
	407.8	Wide	248.1	Wide	22	0.3	10
BDE 49	485.7	Wide	326.1	Wide	28	0.3	10
	483.7	Wide	324.1	Wide	32	0.3	10
HBB	551.7	Wide	472.5	Wide	26	0.3	10
	551.7	Wide	391.5	Wide	34	0.3	10
BDE 47	485.7	Wide	326.0	Wide	28	0.3	10
	483.7	Wide	324.1	Wide	32	0.3	10
BDE 66	485.7	Wide	326.0	Wide	28	0.3	10
	483.7	Wide	324.1	Wide	32	0.3	10
BDE 77	485.7	Wide	326.0	Wide	28	0.3	10
	403.8	Wide	269.9	Wide	35	0.3	10

7000B トリプル四重極 GC/MS のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) を用いて、表 3 に示すように対象化合物ごとに 2 つのトランジションを検出して対象化合物を定量/確認しました。トランスファーライン、イオン源、MS1、MS2 の温度は、それぞれ 300 °C、280 °C、150 °C、および 150 °C でした。コリジョンセルガスは窒素 1.5 mL/min、およびヘリウムクエンチガスは 2.25 mL/min でした。エレクトロンマルチプライア (EM) のゲイン値を表 3 に示します。MS 1 および MS 2 の分離能は 1.2 amu (半値全幅) です。デュエルタイムは、タイムセグメントあたりのトランジションの数に応じて、5 サイクル/s (Hz) になるように 20~80 ms に調整しました。

データ処理には MassHunter 定量分析ソフトウェア (バージョン B.04.04) (Agilent Technologies) を使用しました。

表 3. MS/MS メソッド (続き)

化合物名	プリカーサ イオン	MS1 分離能	プロダクト イオン	MS2 分離能	CE	RT ウィンドウ (min)	EM ゲイン
BDE 100	565.7	Wide	405.8	Wide	28	0.3	10
	403.8	Wide	269.9	Wide	35	0.3	10
BDE 99	565.7	Wide	405.8	Wide	28	0.3	10
	403.8	Wide	269.9	Wide	35	0.3	10
BDE 85	565.7	Wide	405.8	Wide	28	0.3	10
	403.8	Wide	269.9	Wide	35	0.3	10
BDE 154	643.6	Wide	483.8	Wide	20	0.3	10
	483.7	Wide	374.9	Wide	40	0.3	10
BDE 153	643.6	Wide	483.8	Wide	20	0.3	10
	483.7	Wide	374.9	Wide	40	0.3	10
BDE 183	561.7	Wide	454.9	Wide	45	0.3	100
	721.6	Wide	561.8	Wide	17	0.3	100
BTBPE	356.8	Wide	277.8	Wide	13	0.3	100
	356.8	Wide	328.6	Wide	11	0.3	100
BDE 197	801.7	Wide	641.5	Wide	14	0.3	100
	641.7	Wide	534.5	Wide	47	0.3	100
BDE 203	801.7	Wide	641.5	Wide	14	0.3	100
	641.7	Wide	534.5	Wide	47	0.3	100
BDE 196	801.7	Wide	641.5	Wide	14	0.3	100
	641.7	Wide	534.5	Wide	47	0.3	100
BDE 207	719.6	Wide	559.6	Wide	49	0.3	100
	879.8	Wide	719.6	Wide	9	0.3	100
BDE 206	719.6	Wide	559.6	Wide	49	0.3	100
	879.8	Wide	719.6	Wide	9	0.3	100
OBIND	406.7	Wide	327.7	Wide	25	0.3	100
	852.7	Wide	771.7	Wide	14	0.3	100
13C- BDE 209	651.5	Wide	543.6	Wide	34	0.3	100
	811.8	Wide	651.4	Wide	44	0.3	100
BDE 209	799.4	Wide	639.5	Wide	44	0.3	100
	639.6	Wide	530.7	Wide	36	0.3	100

結果と考察

新たに開発されたハイスループットなサンプル前処理方法を、7000B トリプル四重極 GC/MS システムと組み合わせることで、21 種類の代表的な BFRs を分析できます。監視する必要がある BFRs の中核グループの中で EFSA CONTAM パネルに含まれる主要な 8 種類の PBDE 同族体 (BDE 28、47、99、100、153、154、183、209) に加えて [6、7]、さらに 8 種類の PBDE 同族体 (BDE 49、66、85、196、197、203、206、207) と 5 種類の代替 BFRs (PBEB、PBT、HBB、BTBPE、OBIND) も測定しました。

クロマトグラフィによる分離

PBDEs の分析時には、対象化合物の分離だけではなく、対象以外の化合物との共溶出の可能性も考慮する必要があります。これは、実際のサンプルでは多くの異性体が検出する可能性があるからです。このような理由により、通常は長さ 30 m のキャピラリカラムを使用します。ただし、BDE 209 などの高度に臭素化された熱分解性化合物を分析する必要がある場合には、短い (10~15 m) カラムが必要になることがあり、したがって、共溶出のリスクが生じる可能性があります。さらに NCI を使用すると、臭素

の同位体パターン (m/z 79 および 81) が検出され、他の臭素化合物と干渉しやすくなります。逆に、EI はより特異的な $[M]^+$ および $[M-Br_2]^+$ イオンを生成し、 ^{13}C -ラベルされた標準を使用して正確な定量を容易に行うことができますが、NCI と比較すると、一般に定量下限は高くなります。

図 2 および 3 に示すように、EI モードで動作させた Agilent DB-XLB (15 m × 0.18 mm, 0.07 μ m) キャピラリカラムを備えた 7000B トリプル四重極 GC/MS システムを使用したところ、21 種類のすべての標的 BFRs が 12 分未満で分離されました。これに対し、NCI モードのシングル四重極を使用した GC では 17.5 分間が必要です (図 4)。機器分析に必要な時間の短縮は、DB-XLB カラムと、EI-MRM で動作させたトリプル四重極質量分析装置の高い分離効率によるものです。この方法では、選択性の高いプリカーサイオンとプロダクトイオンを使用して、PBDEs を他の臭素化合物から分離できました。図 2 からわかるように、PBEB と BDE 37 の共溶出は、異なる MS/MS (EI) イオントランジションを使用することで容易に分離することができました。ただし、GC/MS (NCI) を使用した場合には図 4 の BDE 28 と PBT を分離することはできませんでした。

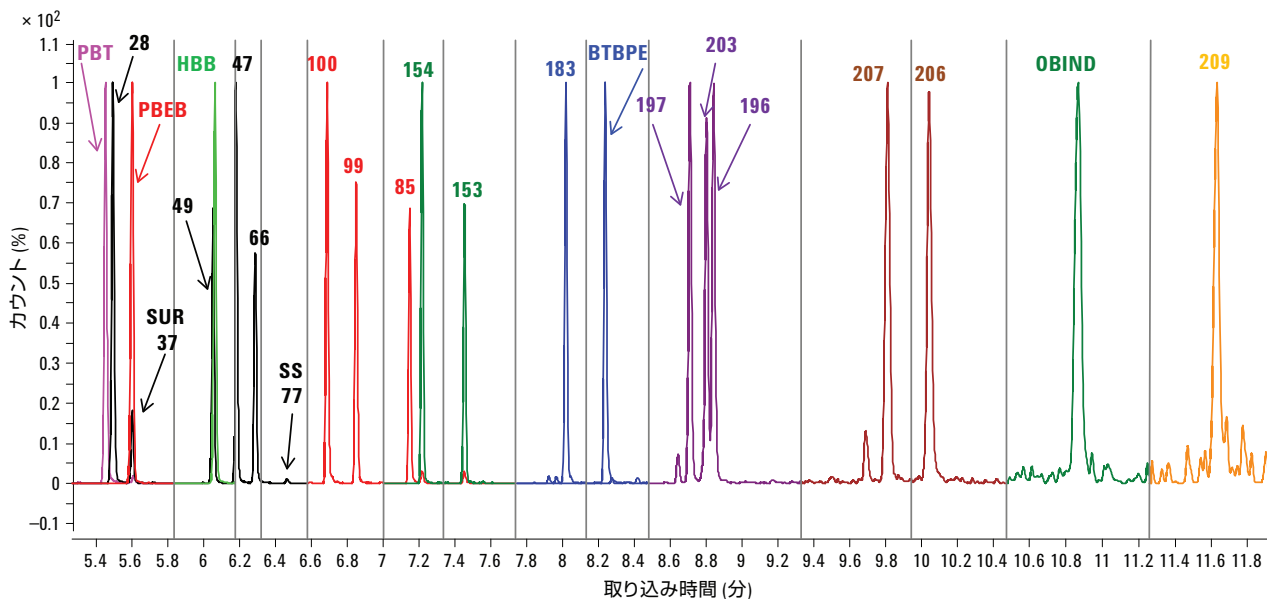


図 2. 5 μ g/kg でスパイクした魚類筋肉組織のクロマトグラム (GC-EI-MS/MS)

低濃度で汚染されたマトリックスサンプルを使用した GC/MS/MS 予備測定を基準にすると、魚類筋肉組織の LOQ は、0.05 ng/mL に相当する 0.005 µg/kg の範囲内となりました (高度に臭素化された BFRs では高い値が得られる)。

鮮魚組織に含まれる対象化合物の広い濃度範囲を考慮して、キャリブレーションには 0.05~500 ng/mL と広スケールの標準溶液を使用する必要があります (BDE 206、207、209、OBIND の場合は

0.25~1,000 ng/mL)。重み付き線形回帰 (1/x) を使用し、LOQ から最大のキャリブレーションポイント (500 ng/mL または 1,000 ng/mL) までの検量線について決定係数 (R^2) を計算しました。これらの実験では、すべての対象化合物がこのキャリブレーション範囲内で直線性を示し、決定係数 (R^2) は 0.99 を超えました。

表 4. サンプル前処理メソッドと最適化された GC/MS/MS 分析のバリデーションの実験で得られた結果の概要

対象化合物	1 µg/kg		5 µg/kg		LOQ (µg/kg)	直線性 (R^2)*
	REC (%)	RSD (%)	REC (%)	RSD (%)		
BDE 28	89	2	92	6	0.005	0.9990
BDE 47	78	7	83	5	0.005	0.9983
BDE 49	100	6	97	4	0.005	0.9993
BDE 66	100	6	96	5	0.005	0.9989
BDE 85	107	7	106	6	0.005	0.9984
BDE 99	106	8	100	5	0.005	0.9982
BDE 100	102	8	98	5	0.005	0.9981
BDE 153	107	10	101	7	0.05	0.9985
BDE 154	99	10	93	6	0.005	0.9984
BDE 183	100	8	104	10	0.05	0.9936
BDE 196	83	14	81	8	0.1	0.9964
BDE 197	86	12	93	12	0.1	0.9990
BDE 203	79	12	81	12	0.1	0.9929
BDE 206	79	10	86	13	1	0.9987
BDE 207	85	12	89	14	0.5	0.9963
BDE 209	81	8	79	11	1	0.9985
PBT	115	10	114	5	0.05	0.9994
PBEB	105	7	105	4	0.01	0.9959
HBB	102	12	103	3	0.05	0.9969
BTBPE	113	13	113	12	0.01	0.9973
OBIND	104	11	107	10	1	0.9929

* 決定係数 (R^2) は、LOQ から最大のキャリブレーションポイント (500 ng/mL = 50 µg/kg、BDE 206、207、209、および OBIND の場合は 1,000 ng/mL = 100 µg/kg) までの検量線について計算しました。

結論

酢酸エチル抽出と SPE シリカ系ミニカラムによるクリーンアップを行う新たに開発した手順により、ラボのスループットを上げ、最大で 6 つのサンプルを 1 時間以内で前処理できるようになります。これに対して、ソックスレー抽出を行い、一般的なクリーンアップ手順を実行する場合には数時間が必要です。さらに、新しいサンプル処理方法を適用すると、抽出溶媒の使用量も大幅に減少するため、コストを削減するだけでなく、より環境にやさしい分析を提供できるようになります。

このアプリケーションノートの「実験方法」の項で詳細に説明したサンプル前処理と最適化された GC/MS/MS 分析条件のメソッドは、SANCO ドキュメント No. 12495/2011 [8] に適合しています。これは元来、残留農薬の分析用に開発されたものですが、他の有機食品汚染物質にも一般に適用されています (回収率の範囲は 70~120 %、再現性は 20 % 未満)。すべての対象化合物の回収率の範囲は 78~115 % で、再現性 (相対標準偏差、RSD で表す) は、低いスパイクレベルでも 14 % を超えることはありませんでした。最適化された GC/MS/MS (EI) 条件の下では、LOQ は 0.005 µg/kg でした (高度に臭素化された BFRs では値が大きい)。

トリプル四重極 MS (EI モード) は、ルーチン分析で用いられるシングル四重極 MS の代わりとして優れています。これは、高質量領域のプリカーサイオンとプロダクトイオンを選択できるため、干渉が軽減され、選択性が向上するからです。このアプローチを使用すると、曝露分析で信頼性の高いデータ評価を実施するために必要な微量の BFRs も分析可能になります。このアプリケーションの詳細は、最近発行された学術誌の記事にも掲載されています [9]。

参考文献

1. EC: Directive 2003/11/EC of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether).
2. BSEF. Bromine Science and Environmental Forum; 2012. <http://www.bsef.com> (accessed June 26, 2012).
3. A. Covaci, S. Harrad, M. A.-E. Abdallah, N. Ali, R. J. Law, D. Herzke, C. A. de Wit, Environ. Int. 37 (2011), 532–556.
4. Rapid Alert System for Food and Feed, http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm (accessed June 26, 2012).
5. K. Kalachova, J. Pulkrabova, L. Drabova, T. Cajka, V. Kocourek, J. Hajslova, Anal. Chim. Acta. 707 (2011), 84–91.
6. EFSA, Advice of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to relevant chemical compounds in the group of brominated flame retardants for monitoring in feed and food Request for data on Brominated Flame Retardants Levels in Foodstuffs, EFSA Journal. 328 (2006), 1–4.
7. EFSA, Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. EFSA Journal. (2011), 9(5), 2156.
8. Document no. SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
9. K. Kalachova, T. Cajka, C. Sandy, J. Hajslova, J. Pulkrabova, Talanta 105 (2013), 109–116.

詳細情報

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2013

Printed in Japan

January 7, 2013

5991-0887JAJP



Agilent Technologies