

GC/MS/MS による農薬分析での EMR Lipid クリーンアップと強化された 脱水処理の利点

アプリケーションノート

食品検査

著者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、脂質の多いサンプル中の脂質を選択的にクリーンアップできるように設計された次世代のサンプル前処理製品です。この製品は、QuEChERS および除タンパク処理のような広く認められているワークフローからの抽出物の前処理のための簡便な分散固相抽出 (dSPE) フォーマットで使用されます。キットパック入りの無水 MgSO_4 を用いて EMR Lipid クリーンアップ後の EMR プロトコルを変更します。無水 MgSO_4 は、水系溶媒相とアセトニトリル溶媒相との分離や、後続の乾燥ステップのために残留水分および水溶性残留物を完全に除去する目的で使用します。強化された脱水処理は、特に不安定な分析対象物について機器分析の再現性を向上させることによって、GC タイプのアプリケーションに大きな影響を与えます。今回の実験では、アボカド中の GC で検査可能な農薬を GC/MS/MS で分析する場合に適用するこの変更 EMR プロトコルを調査しています。変更 EMR プロトコルは、効率の高いマトリックス除去および許容範囲にある分析対象物の回収率を維持したまま、特に不安定な農薬に対して機器分析の再現性、信頼性、長期にわたる使いやすさを向上させます。



Agilent Technologies

はじめに

食品に含まれる農薬残留物の分析は多くのラボにとってルーチンワークとなっています。QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) メソッド [1、2] を採用することで、数百種類の農薬を低濃度でも分析できます。この手法はさまざまな果実および野菜に対して適切に機能します。しかし、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新たな課題をもたらします [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べきことです。

Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、最新の充填剤で、分析対象物を損失することなく主な脂質をサンプル抽出物から選択的に除去します。以前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の多いサンプルに対して EMR Lipid が提供する極めて優れたクリーンアップを紹介しました。EMR Lipid は、マルチクラスの農薬残留物に対応できる回収率および精度も備えています [5]。脱水処理の進歩により、脱水ステップからの NaCl の除去が有効であることが判明しました。NaCl の存在はごくわずかな割合の水を許容することがあり、このためマトリックス以外の水溶性残留物が最終抽出物に存在することになります。残留水分の完全な除去は、GC および GC/MS 分析の信頼性にとって重要です。

強化された脱水処理では、相分離およびサンプルの乾燥のために無水 $MgSO_4$ を使用します。これにより、EMR Lipid クリーンアップのマトリックス除去を確保しながら、残留水分および水溶性残留物の除去が大幅に向上します。この実験では、GC/MS/MS によるアボカド中の農薬分析で EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を使用する利点を示しています。キャプタホル、ホスメット、クマホス、ピラクロストロピンの 4 種類の異なる不安定な農薬を添加して不安定な農薬分析における残留水分の影響を評価しました。

実験方法

試薬および薬品

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 (マスキーゴン、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) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。農薬標準と内部標準は Sigma-Aldrich 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、AA が 1 % の ACN 溶液を調整しました。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 μ g/mL の ACN 溶液として調製しました。ACN 中に調製した 25 μ g/mL の混合 IS 作業溶液には、TPP、パラチオンエチル-D10、 ^{13}C -DDT が含まれます。

装置と材料

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 (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 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およびリピーター
- Agilent Bond Elut AOAC 抽出キット (部品番号 5982-5755)
- Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE (部品番号 5982-1010) および EMR $MgSO_4$ 脱水キットパック (部品番号 5982-0102)

機器条件

GC と MS の条件は以前のアプリケーションノート [5] に記載されていません。分析は、Agilent 7890A GC と、Agilent 7693B オートサンプラおよび 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。

GC 条件

パラメータ	値
GC:	Agilent 7890A GC
カラム:	Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、 0.25 mm × 15 m、0.25 μm (部品番号 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)
注入口ライナ:	Agilent ウルトライナートシングルテーパースプリットレス 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パ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
パルスドスプリット レス注入:	36 psi、0.75 分まで
スプリットベントへ のバージ流量:	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
オープン:	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
分析後:	300 °C で 2 分間
キャピラリー・ フロー・ テクノロジー:	Agilent UltiMetal Plus バージ付 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
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

MSD の条件

パラメータ	値
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
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
MS 分離能:	MS1 および MS2 は 1.2 u

表 1 に、今回の実験で追加し使用した 4 種類の不安定な農薬の MRM トランジションをまとめています。その他の農薬の MRM トランジションは参考文献の [5] にまとめています。

表 1. 今回の実験で使用した GC/MS/MS MRM パラメータと追加した不安定な農薬のリテンションタイム

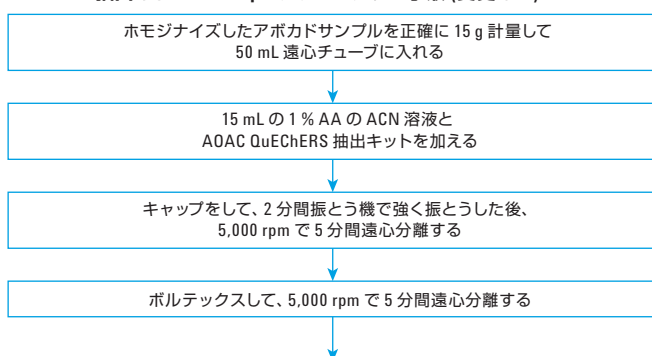
不安定な 分析対象物	RT (分)	MRM			
		定量 チャンネル	CE (V)	定性 チャンネル	CE (V)
キャプタホル	18.20	183 → 79	10	150 → 79	5
ホスメット	18.77	160 → 77.1	20	160 → 133.1	20
クマホス	20.67	361.9 → 109	10	210 → 182	10
ピラクロ ストロピン	22.03	132 → 77.1	20	164 → 132	15

サンプル前処理

EMR Lipid クリーンアップ後の脱水ステップにのみ変更を加えました。QuEChERS 抽出ステップと EMR Lipid クリーンアップステップに変更はありません。EMR Lipid クリーンアップ後に、ACN 層を水性相から相分離し、その後さらに無水 $MgSO_4$ で乾燥させました。図 1 に プロトコル図を示しています。EMR Lipid クリーンアップ後の変更手順に対して強調される点が 2 つあります。

- 1 つ目は、サンプルに $MgSO_4$ を加えることにより、 $MgSO_4$ および水の発熱性効果が最小に抑えられ、塩の凝集が低減することです。
- 2 つ目は、EMR Lipid クリーンアップ後の 1 mL の ACN 抽出液用、300 mg の無水 $MgSO_4$ 塩 (EMR 脱水キットパックから) を使用して 2 mL 乾燥用チューブで事前計量したことです。

QuEChERS 抽出および EMR Lipid クリーンアップ手順 (変更なし)



強化された脱水後処理 (変更あり)

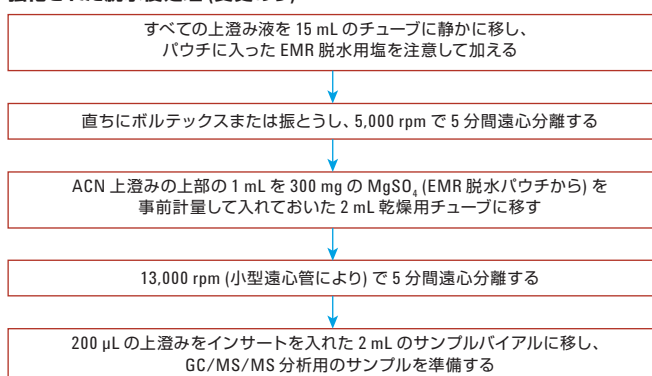


図 1. GC/MS/MS によるサンプル前処理ワークフロー。
変更のない QuEChERS 抽出法と EMR Lipid クリーンアップステップの後に強化された脱水手順を用いたアボカド中の農薬を分析するための推奨プロトコル。

GC/MS/MS システム性能に対する サンプルマトリックスの影響

GC/MS/MS 機器の性能に対するサンプルマトリックスの影響を直接測定するために、EMR Lipid クリーンアップ後にオリジナル脱水ステップと強化された脱水処理に従って、アボカドのマトリックスブランクサンプルを調製しました。その後、マトリックスブランクに、農薬標準 50 ppb をポストスパイクして GC/MS/MS システム性能に対するマトリックス効果を求めました。

不安定な化合物について、分析対象物のレスポンス (ピーク面積)、ピーク形状、複数回の注入にわたっての再現性を調査しました。

注入シーケンスは、4 回のマトリックスブランクサンプルの注入、その後のポストスパイク済みサンプルの注入で構成されています。この注入パターンを 100 回繰り返しました。つまり、合計 80 回のマトリックスブランクサンプルの注入と合計 20 回のポストスパイク済みサンプルの注入をこのテストシーケンスで実行しました。オリジナル脱水または強化された脱水処理を用いたシーケンス間でライナを交換しカラムヘッドをトリムしました。UI シングルテーパープリットレスライナ、ウール入りと UI ディンプルライナはいずれも複雑なマトリックスサンプルの分析に一般的に用いられています。これらのライナは、強化された脱水処理を用いて調製したアボカドサンプルを 100 回注入した後で外観を評価しました。

マトリックス除去の効果と分析対象物の回収率

マトリックス除去の効果は、GC/MS をフルスキャンモードで用いたアボカドマトリックスブランクを分析することによって確認し、以前のアプリケーションノートに記載されているように [5]、効率計算を用いてクロマトグラフィープロファイル全体を比較しました。各分析対象物の 50 ppb でのプレススパイクとポストスパイクのピーク面積を比較することによって、分析対象物の回収率を評価しました。

結果と考察

分析対象物のより高いレスポンスとより良好なピーク形状

EMR Lipid クリーンアップ後の強化された脱水処理は、残留水分と水溶性残留物を除去します。図 2 は、強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップを用いて GC/MS/MS で分析した、不安定な化合物のレスポンスとピーク形状のクロマトグラフィーの比較を示しています。分析

対象物のレスポンスは 3 倍以上向上し、特にピラクロストロピンとトリクロルホンでは 10 倍向上しているのが分かります。クロマトグラフィーも向上し、より対称性の高いピーク形状、より低減したピークテーリングを示し、データ処理が容易になっています。これらの向上は、流路表面との大きな相互作用なしに、不安定な化合物が GC 流路を通過したことを示しています。

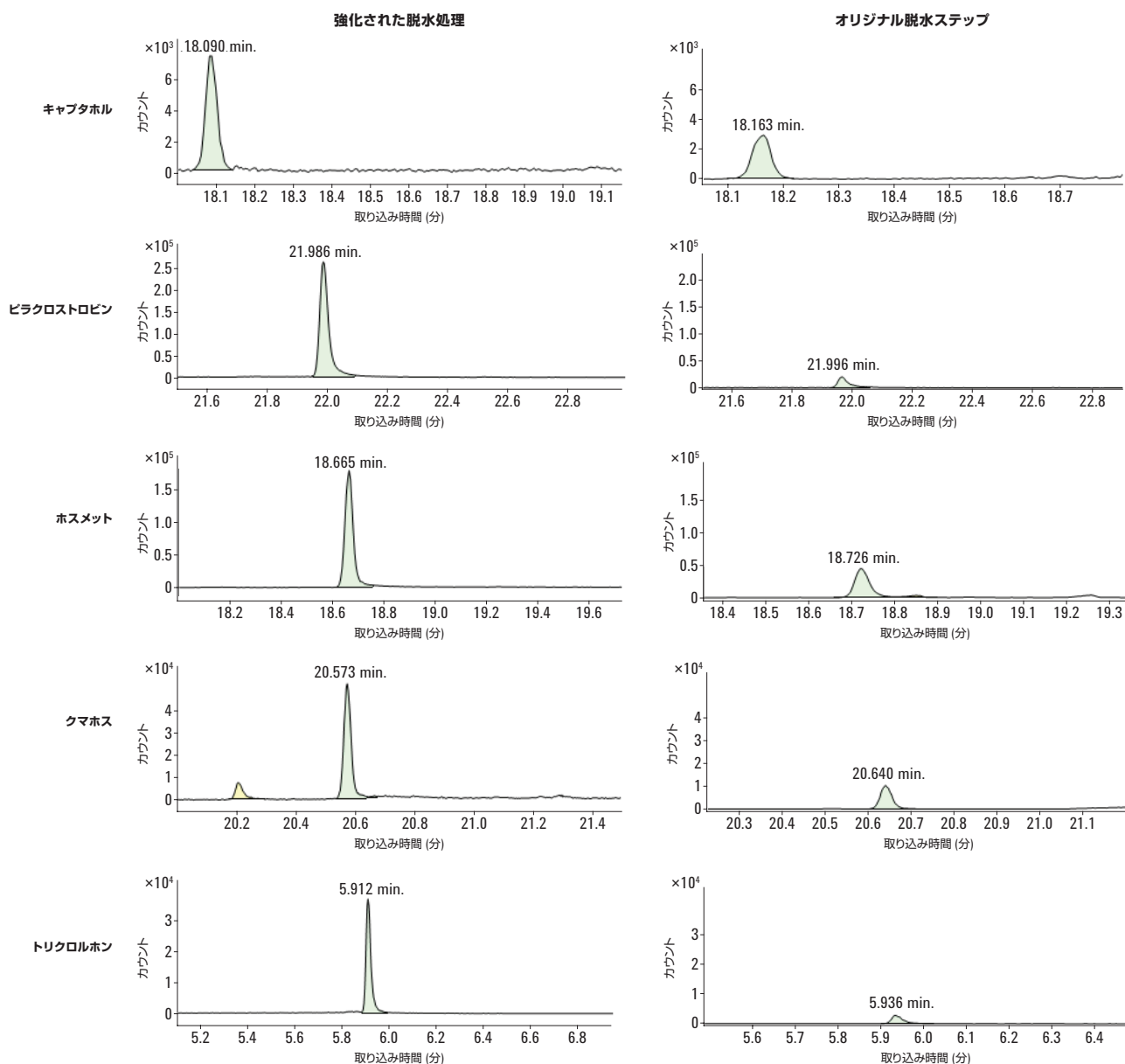


図 2. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理とオリジナル脱水ステップを用いて GC/MS/MS で分析したときの不安定な化合物のレスポンスおよびピーク形状についてのクロマトグラフィーの比較

システムの再現性の向上

メソッドの再現性は、定量の結果の信頼性に直接影響を及ぼすため、分析における最も重要な側面といえることはほぼ間違いありません。マトリックスは流路内に複数回の注入にわたって蓄積するため、分析対象物、特に不安定な化合物のレスポンスは複数回の注入にわたって変化することがあります。レスポンスが一致しないために、定量は困難かつ信頼できないものになります。前回の実験結果では、EMR Lipid クリーンアップを用いて調整した複雑なサンプルの複数回の注入で、GC/MS/MS システムの再現性が大幅に向上したことが示されました [5]。これらの向上にもかかわらず、一部の不安定な化合物は複数回の注入でなおもばらつきました。このばらつきはほとんどの場合、最終サンプル抽出物に含まれる微量の残留水分が原因です。EMR Lipid クリーンアップ後の強化された脱水処理では、 $MgSO_4$ 塩分配による乾燥ステップを実施し残留水分および水溶性固形残留物を最終サンプル抽出物から除去して、GC/MS/MS システムの再現性を高めました。

図 3 に、ピラクロストロピンを例として挙げ、EMR Lipid クリーンアップ後の強化された脱水処理によって調整したアボカドサンプルを注入した場合、再現性が向上することを示しました。この図では、EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いて調整したサンプルと従来の PSA/C18 クリーンアップを用いて調整したサンプルとの分析結果を比較しています。EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いて調整したサンプルでピラクロストロピンのレスポンスの再現性が飛躍的に向上したことは、データから明白です。従来の PSA/C18 クリーンアップや EMR オリジナルプロトコルを用いてサンプルを調整した場合、100 回の注入後のピラクロストロピンの信号は最初のレスポンスの 30 ~ 40 % に低下します。この場合、一貫性がないために、この化合物は定量分析で不合格となります。しかし、EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いた場合は、ピラクロストロピンについて優れた信号の再現性 ($\pm 10\%$ の偏差) を得ることができました。EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いて得られる優れた再現性は、不安定な分析対象物の定量分析を信頼性がより堅牢なものにします。

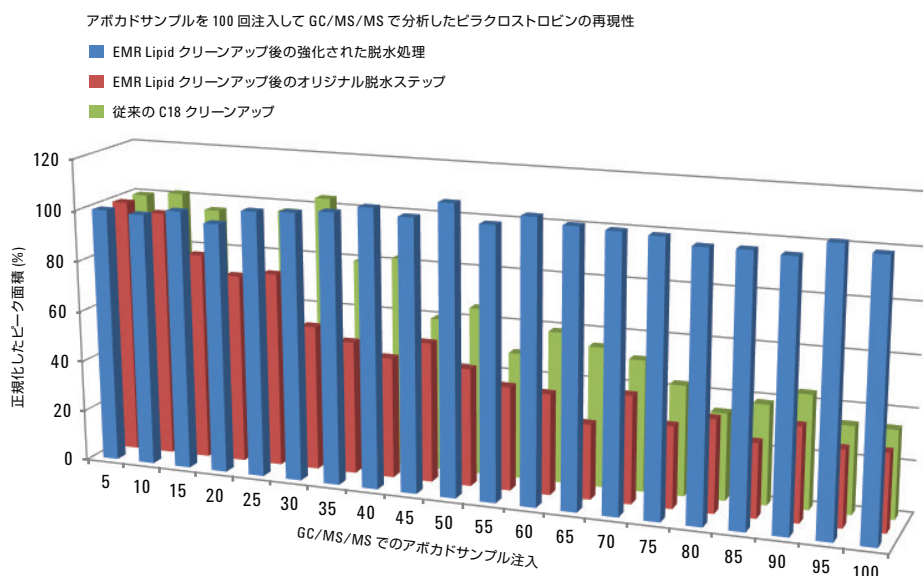


図 3. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いた場合、および従来の C18 クリーンアップを用いて調整したアボカドサンプルを 100 回注入した場合の不安定な化合物であるピラクロストロピンのレスポンスの GC/MS/MS での再現性。

表 2 に、今回の実験で検査対象となったすべての農薬と、前述の 3 つのサンプル処理メソッドを用いて調整したアボカドサンプルを 100 回注入したときの各農薬の RSD をまとめています。EMR Lipid クリーンアップの後に強化された脱水処理を用いた場合、29 種類の化合物のうち 24 種類で 10 % 未満の RSD を示しています。キャプタン、フォルベット、キャプタホル、DDT は GC/MS/MS では分析の難しい化合物で、特に PSA/C18 クリー

ンアップでは高い RSD を示し、100 回の注入において信号に重大なばらつきをもたらしています。しかし、EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いて調整したサンプルにおいて信号の減少は小さく、この 4 種類の不安定な農薬についても 50 回の注入では再現性は判定基準を満たし RSD は 10 % 未満でした。

表 2. アボカドサンプルの 100 回注入にわたっての分析対象物の GC/MS/MS の再現性 (ピーク面積 RSD %)。

農薬	100 回の注入 (n = 20) での分析対象物の RSD		
	EMR Lipid クリーンアップ後に 強化された脱水処理	EMR Lipid クリーンアップ後に オリジナル脱水ステップ	C18/PSA クリーンアップ
ジクロロボス	8.5	6.2	10.5
トリクロロホン	9.2	35.0	73.0
2-フェニルフェノール	2.5	7.0	13.6
エタルフルラリン	4.6	12.4	18.8
スルホテップ	3.1	7.1	11.8
アトラジン	2.1	6.8	12.2
リンデン	3.1	8.5	10.8
クロロタロニル	2.2	12.5	11.7
ダイアジノン	2.6	6.6	11.7
クロルピリフォスメチル	2.6	8.4	8.9
ジクロフルアニド	5.4	11.7	9.0
アルドリン	2.1	9.8	19.3
トリフルアニド	6.6	10.5	6.6
キャプタン	29.8	29.9	51.9
フォルベット	22.0	53.8	52.2
プロシモドン	2.1	6.8	14.3
ピリメート	3.1	6.8	10.4
エンドリン	4.0	8.3	12.6
硫酸エンドスルファン	3.6	8.5	12.1
DDT	16.1	21.6	22.4
キャプタホル	38.5	53.8	63.7
イプロジオン	3.7	11.0	10.7
ホスメット	6.2	24.0	12.5
クマホス	4.3	19.8	9.7
ペルメトリン	3.0	6.8	11.8
ピラクロストロピン	3.7	43.7	38.8
デルタメトリン	8.7	22.5	9.8
パラチオンエチル-d10 (IS)	4.9	11.8	7.2
TPP (IS)	2.1	9.1	19.1

GC 注入口ライナとカラムの寿命の延長

EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いるもう 1 つの利点は、微量の残留水分に溶解している可能性のある非揮発性の塩残留物の低減です。Agilent ウルトライナートシングルテーパープリットレスライナ、ウール入り (部品番号 5190-2293) と Agilent UI デインプルライナ (部品番号 5190-2297) の 2 タイプの UI ライナを、アボカドサンプルを 100 回注入してテストしました。テスト後、ライナの外觀に残留物の堆積があるかどうかを目視で検査しました。図 4 は 100 回の注入後も両方のライナが事実上きれいなこと示しています。以上の結果は、EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いることで優れたクリーンアップを実現できることを証明しています。この結果、ライナとカラムの寿命が延び、システムメンテナンスは少なくなります。

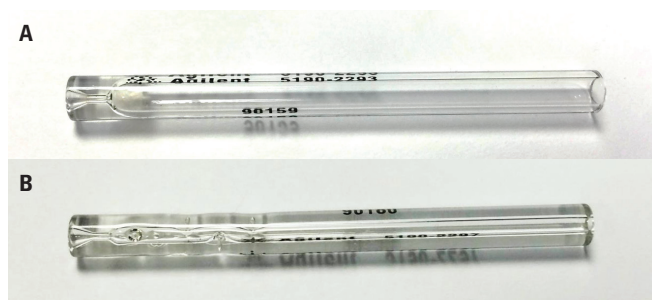


図 4. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いて調整したアボカドサンプルを 100 回注入した後の代表的な GC 注入口ライナの外觀。A) Agilent ウルトライナートシングルテーパープリットレスライナ、ウール入り、B) Agilent UI デインプルライナ。

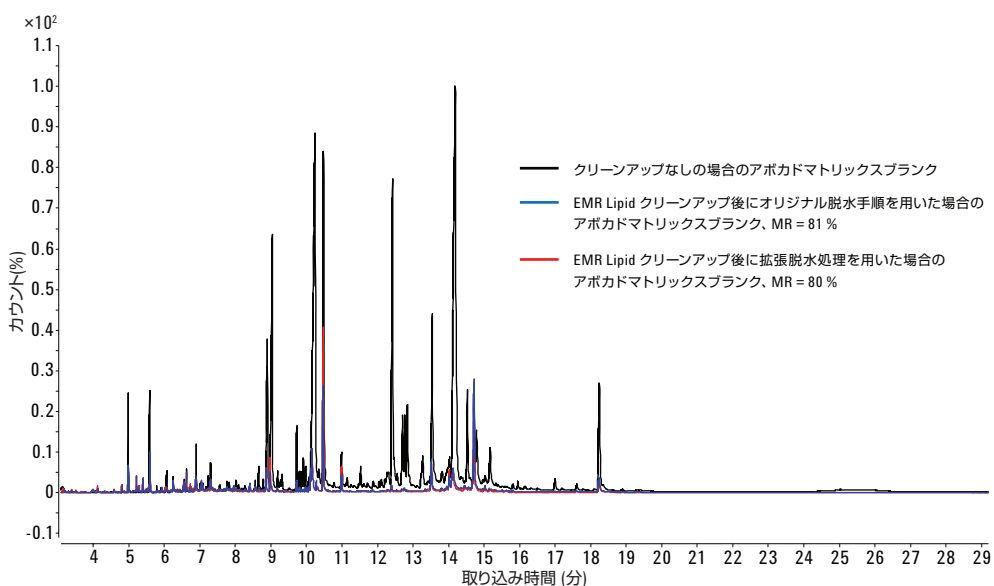


図 5. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理とオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いた場合の GC/MS フルスキャンでのクロマトグラフィーの比較により示された、同等のマトリックス除去の効率。

同等のマトリックス除去の効果と分析対象物の回収率

マトリックス除去の効果は、クリーンアップの前と後の GC/MS フルスキャンプロファイルと比較して評価しました [5]。結果は、EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理を用いた場合とオリジナル脱水ステップを用いた場合とで、同等のマトリックス除去の効果を実現できることを示しました (図 5)。

図 6 はEMR Lipid クリーンアップ後にそれぞれ強化された脱水処理とオリジナル脱水ステップを用いて調整したアボカドサンプルに 50 ppb の農薬を添加した場合の回収率 (n = 6) を比較しています。一部の分析対象物は強化された脱水処理を用いた場合回収率がわずかに低くなっています。しかし、すべての化合物で 5% 未満の RSD を確保し、再現性が飛躍的に向上しています。

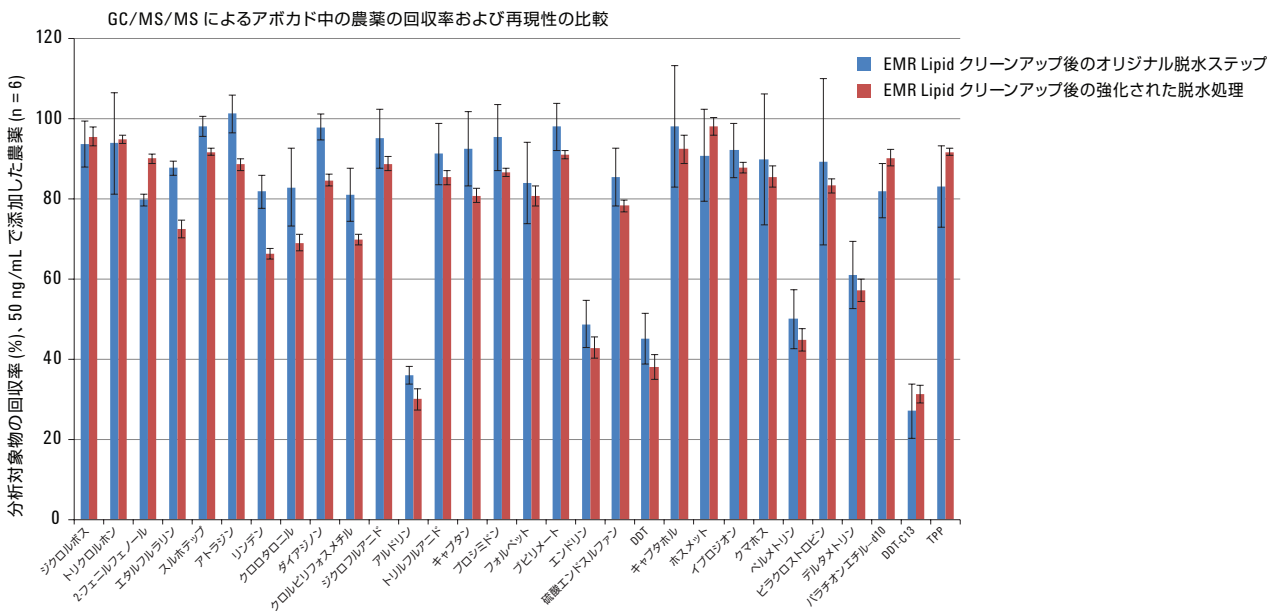


図 6. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いて調整し、50 ng/mL で添加したアボカドサンプルの農薬の回収率。

結論

EMR Lipid クリーンアップ後の強化された脱水処理では、GC/MS/MS でのサンプル注入の前に、無水 MgSO₄ による脱水ステップと乾燥ステップを実施し残留水分と水溶性残留物を除去します。分析対象物のレスポンスを高め、より良好なピーク形状を提供し、機器の優れた再現性を実現し、注入ロライナとカラムの寿命を延ばすことで、GC/MS/MS 分析を向上させています。この手法は、特に不安定な分析対象物に注目する場合、複雑で脂質の多いサンプルのサンプル前処理の向上を目指す分析者にとって最適です。また、EMR Lipid クリーンアップ後の強化された脱水処理は、複雑なサンプルについて高いマトリックス除去効果を維持し、多成分残留農薬分析のための許容可能な分析対象物の回収率を実現します。脱水キット (無水 MgSO₄) は、簡単にサンプル分注できるように注ぎ口が付き、適切に保管もできるキットパックで提供されます。

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Steinbahr, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615 & 60A.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61(10)*, 2315–2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. Pesticide residues in chicken eggs - A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by GC/MS/MS*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6097EN, **2015**.

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., 2016

Printed in Japan

March 10, 2016

5991-6707JAJP



Agilent Technologies