

Bond Elut EMR-Lipid クリーンアップを用いた GC/MS/MS によるカボチャ種子油中の EU 規制対象の優先 PAH の分析

著者

Thorsten Bernsmann
Chemisches und
Veterinäruntersuchungsamt
Münsterland-Emscher-Lippe
(CVUA-MEL), AöR Münster,
Germany

Diana Wong, Limian Zhao,
Bruce Quimby, and
Joerg Riener
Agilent Technologies, Inc.

概要

カボチャ種子油に含まれる欧州連合 (EU) 規制対象の優先多環芳香族炭化水素 (PAH) を、液液抽出に続いて Bond Elut EMR-Lipid (EMR-Lipid) および PSA/C18/MgSO₄ dSPE (PSA/C18/MgSO₄) クリーンアップを使用して分析しました。PAH の定量には、Agilent JetClean セルフクリーニングイオン源 (JetClean) およびバックフラッシュ (BF) を搭載したガスクロマトグラフィートリプル四重極質量分析計 (GC/MS/MS) を使用しました。JetClean は、分析中に低流量の水素を導入することにより、イオン源への PAH の堆積を防ぎます。また、分析後にミッドカラム BF を使用することで、カラム寿命が延長されます。PAH のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) 分析時には、マトリックス干渉を排除するために、高コリジョンエネルギー (50 eV) を使用しました。その結果、中間溶出 PAH は、プレスパイク濃度 1、10、50 ng/g のすべてにおいて、回収率が EU の規制限度 50 ~ 120 % の範囲内でした。一方、高分子量 PAH については、プレスパイク濃度 50 ng/g の場合のみ EU の規制限度が満たされました。回収率の RSD は、ベンゾ(a)ピレン (プレスパイク濃度 1 ng/g で 23 %) を除き、調査したすべての PAH について、EU の規制限度内である 20 % 未満でした。メソッドの定量性能を検証するために精度および真度分析を実施したところ、3 種類のすべてのプレスパイク濃度で真度 100 ± 20 %、RSD 20 % 未満という結果が得られました。定量下限 (LOQ) は、シクロペンタ(cd)ピレンおよび 5-メチルクリセン (10 ng/g) を除き、調査したすべての PAH について 1 ng/g でした。検量線では、 $R^2 > 0.99$ という良好な直線性が観察されました。

はじめに

PAH は、炭素と水素のみからなる 2 つ以上の芳香環で構成される有機化合物群です。PAH は、産業的な食品加工（ロースト、乾燥など）、高温調理（フライ、直火焼きなど）、または環境曝露（化石燃料や木材の不完全燃焼など）の過程で形成されます。食用油に関しては、直火を使用した種子および穀粒の乾燥プロセスが PAH の発生源として最有力視されています¹。種子のロースト加工で使用される高温も、食用油のもう 1 つの汚染原因となっている可能性があります。さらに、産業排出物や自動車排ガスへの植物の曝露などの環境曝露も、食用油中で検出される PAH に寄与しているものと考えられます。PAH は疎水性の性質を持つことから、脂肪や脂質が、食物中の PAH の主な生成源となっています²。

2005 年以降、欧州委員会 (EC) 規則により、多様な食品群中のベンゾ(a)ピレンの最大濃度が規定され、食品科学委員会 (SCF) では、さらに 15 種類の PAH 成分が発がん性物質として定められました。また、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) において、ベンゾ(c)フルオレンもモニタリングすべき PAH に指定されました。EC 規則 1881/2006 および 835/2011 では、食用または食品原材料として用いられる油脂中の残留 PAH の最大許容濃度として、ベンゾ(a)ピレンを 2.0 µg/kg、ベンゾ(a)ピレン、ベンゾ(a)アントラセン、ベンゾ(b)フルオランテン、およびクリセンの総濃度を 10 µg/kg に定めています^{3, 4}。

Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) dSPE クリーンアップは、2015 年の発売以来、大きな注目を集めてきました。EMR-Lipid dSPE の充填剤は、脂質の非分岐炭化水素鎖に選択的に作用するため、ターゲット成分の大部分を、以降の分析に用いられる溶液中にそのまま取り出すことができます。このことから、EMR-Lipid は多種多成分残留分析に最適であると言えます。EMR-Lipid の充填剤は、マトリックス干渉、特に脂質の除去において優れた利便性と効果を発揮し、目的成分の低濃度検出を可能にします^{5, 6}。EMR-Lipid dSPE クリーンアップ後、MgSO₄ および NaCl を含む EMR-Polish 分散キットを使用して残留水分を除去しました。これは、GC/MS/MS 分析に不可欠なステップです。次に、PSA/C18/MgSO₄ dSPE クリーンアップを使用して、さらにマトリックスクリーンアップと水分除去を行いました。

PAH の分析において課題となるのが、その化学的特性です。そこで、GC/MS/MS についても、この分析に合わせて改良しました⁷。PAH は、表面に付着する性質を持ち、凝結しやすく、また容易には気化しません。これらの問題に対処するため、表面への接触を最小限に抑え、気化を促進するために、GC 注入口、MSD トランスファーライン、および MSD イオン源を高温に保ちました。また、JetClean によりデータ取り込み中に低流量の水素を導入することで、イオン源をクリーンな状態に保ちました⁸。さらに、ガラスウール入りの注入口ライナを使用することにより、熱を伝達しながら、ライナ底部への PAH の堆積を防ぎました。各分析の終了時には、バックフラッシュによって高分子量の溶出マトリックスを除去し、カラムの寿命を維持しました⁹。PAH は変化しにくいいため、すべての PAH の MRM 取り込みに 50 eV の高コリジョンエネルギーを使用しました。これにより、PAH をそのまま維持しながら、マトリックス干渉を除去することができました。

このアプリケーションノートでは、PAH で汚染されている可能性の高い、脂肪分が豊富で複雑なマトリックスであるカボチャ種子油について調査した結果を紹介합니다。カボチャ種子油中の脂肪酸は、主にパルミチン酸 (9.5 ~ 14.5 %)、ステアリン酸 (3.1 ~ 7.4 %)、オレイン酸 (21 ~ 46.9 %)、リノール酸 (35 ~ 60.8 %) で構成されています¹⁰。カボチャ種子油は、100 °C を超える温度でローストしたカボチャ種子を水圧プレスで加圧し、濃緑色の種子油を搾り出すことによって製造されます。このロースト加工に加え、PAH の量を大幅に減少させることのできる精製ステップがないことも、カボチャ種子油のもう 1 つの PAH 汚染原因になっているものと考えられます¹。

実験方法

溶媒およびサンプル前処理製品

今回の実験には、HPLC または GC グレードの溶媒を使用しました。アセトニトリル (ACN) (271004) およびイソオクタン (650439) は、Sigma-Aldrich 社から購入しました。

サンプルクリーンアップに使用したサンプル前処理製品は、以下のとおりです。

- Bond Elut EMR-Lipid 分散 SPE、15 mL チューブ (EMR-Lipid) (p/n 5982-1010)
- Bond Elut EMR-Lipid Polish、15 mL チューブ、NaCl および無水 MgSO₄ を含む (EMR-Polish) (p/n 5982-0101)
- QuEChERS 分散 SPE、EN メソッド、15 mL チューブ、PSA 150 mg、C18EC 150 mg、および MgSO₄ 900 mg を含む (PSA/C18/MgSO₄) (p/n 5982-5156)

標準および溶液の調製

PAH 標準混合液 (STD) の調製には、PAH 標準混合試料 (p/n 5191-4508) を使用しました。同位体標識された内部標準混合液 (IS) の調製には、重水素化 PAH (p/n 5191-4509) を使用しました。プレスバイク品質管理 (QC) サンプルは、STD ブランク溶液と IS スパイク溶液をイソオクタンで目的濃度に調製し、これをカボチャ種子油に直接スパイクすることにより調製しました。マトリックス適合キャリブレーション用のポストスパイクサンプルは、STD ブランク溶液と IS スパイク溶液をイソオクタンで目的濃度に調製し、この溶液で乾燥マトリックスブランク (MB) サンプルを再溶解することにより調製しました。プレスバイクおよびポストスパイク濃度は、STD を 1、10、および 50 ng/g とし、IS を 50 ng/g としました。マトリックス適合キャリブレーション濃度は、STD を 1、2、5、10、25、50、および 100 ng/g とし、IS を 50 ng/g としました。

サンプル前処理

今回の実験には、店舗で購入したローストカボチャ種子油を使用しました。サンプルは、ACN での抽出後、EMR-Lipid によるサンプルクリーンアップと、EMR-Polish による残留水分の除去を行いました。その後、PSA/C18/MgSO₄ クリーンアップを使用して、さらにマトリックスクリーンアップと水分除去を行いました。図 1 に、サンプル前処理の詳細な手順を示します。

GC/MS/MS 分析

今回の実験には、GC/MS/MS として、Agilent 7890B GC、JetClean セルフクリーニングイオン源を搭載した Agilent 7010 トリプル四重極 GC/MS、および Agilent 7693A オートサンプラ (ALS) を使用しました。表 1～3 および図 2 に、GC および MSD パラメータの詳細を示します。データ取り込みには MassHunter GC/MS Acquisition B.07.06 を、データ解析には MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 および MassHunter Quantitative Analysis B.09.00 を使用しました。

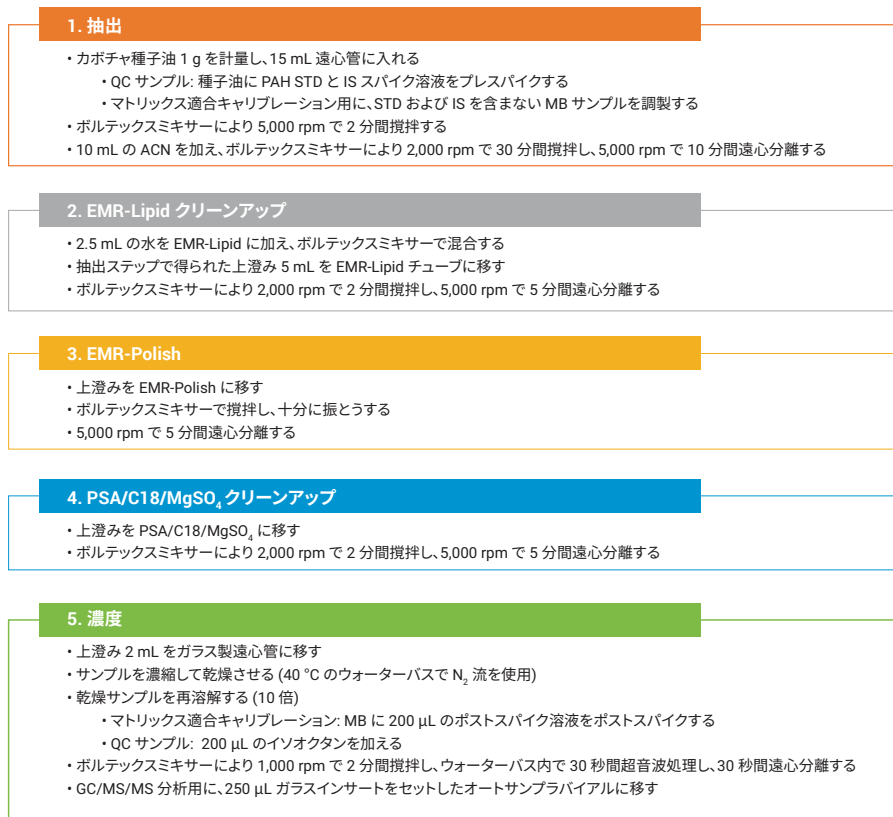


図 1. GC/MS/MS 分析に向けたカボチャ種子油サンプルの前処理手順の詳細

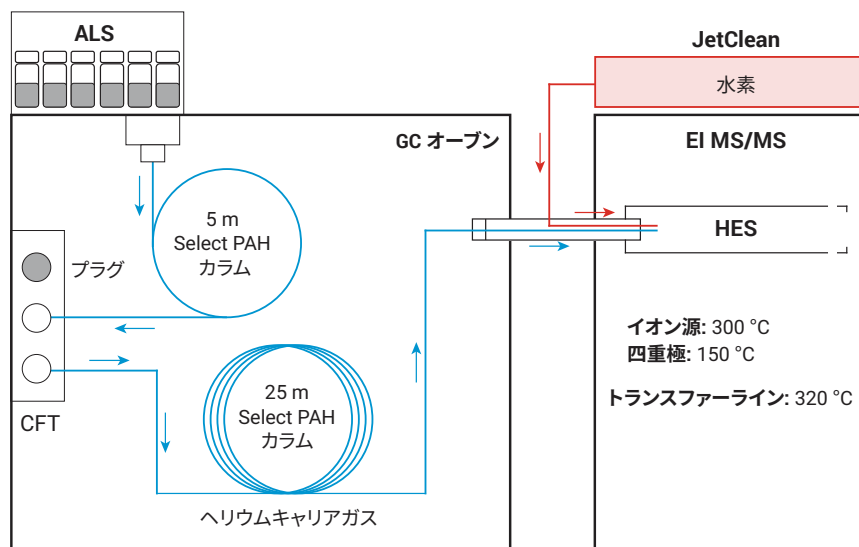


図 2. BF および JetClean が構成された電子イオン化 (EI) モードの GC/MS/MS。矢印はヘリウムキャリアガス流の方向を示します。BF 用に、CFT ページ 3 ウェイスブリッタを使用して 2 本のカラムが構成されています。また、イオン源に 0.33 mL/min の水素流を導入するために、JetClean セルフクリーニングイオン源が測定とクリーニングモードで MSD に構成されています。HES = 超高感度イオン源。CFT = キャピラリー・フロー・テクノロジー

PAH の低濃度分析には、以下に示す GC/MS/MS の改良が不可欠です。

- BF のセットアップ (図 2)
 - Select PAH カラム (長さ 30 m × 直径 250 μm × 膜厚 0.15 μm) を 5 m カットします。
 - カットした 5 m のカラムでスプリット / スプリットレス注入口とキャピラリー・フロー・テクノロジー (CFT) を接続します。
 - 残りの 25 m で CFT と質量分析検出器 (MSD) を接続します。
 - Acquisition ソフトウェアの BF ウィザードを使用して、分析後の手順を以下のように設定します。
 - 注入口圧力を 2 psi に低減
 - CFT 圧力を 70 psi に増加
 - オープン温度を 320 °C に維持
 - ボイドボリュームとして 20 を使用し、BF 時間を 0.38 分に指定
- 注入口、トランスファーライン、およびイオン源の温度をそれぞれ 320、320、および 300 °C にします。
- 注入口ライナには、ウルトライナート 4 mm、シングルテーパ、ガラスウール入り (PAH に熱を伝達させるため) を使用する必要があります。
- JetClean セルフクリーニングイオン源は、イオン源への水素流量を 0.33 mL/min とし、測定とクリーニングモードで動作させます。
- リテンションタイムシフトを防ぎ、メンテナンスを容易にするために、クリセンのリテンションタイムを 25.89 分にロックします。

表 1. GC パラメータ

GC 分析条件	
GC	7890B GC システム
インレット	スプリット/スプリットレス
モード	スプリットレス
ヒーター	320 °C
圧力	14.4 psi
トータル流量	54.2 mL/min
セプタムパージ流量	3 mL/min
セプタムパージ流量モード	スイッチド
スプリットイベントへのパージ流量	1 分で 50 mL/min
注入口ライナ	Agilent 4 mm ウルトライナートライナ、シングルテーパ、ガラスウール入り、900 μL (p/n 5190-2293)
オープン	
オープン昇温	初期:80 °C (0.5 分間保持) 昇温 1: 120 °C/min で 120 °C まで 昇温 2: 40 °C/min で 180 °C まで 昇温 3: 3 °C/min で 280 °C まで 昇温 4: 120 °C/min で 330 °C まで (14 分間保持)
合計分析時間*	50.08 minutes
バックフラッシュ用カラムのセットアップ	
カラム	Agilent Select PAH (p/n CP7462)
寸法	長さ 30 m × 直径 250 μm、膜厚 0.15 μm
カラム 1	
仕様	5 m × 250 μm、0.15 μm (30 m カラムから 5 m カット)
In	スプリット/スプリットレス注入口
出口	BF EPC
圧力	14.4 psi
流量	1.2 mL/min
モード	定流量
カラム 2	
仕様	25 m × 250 μm、0.25 μm (カラム 1 用に 5 m カットした残り)
主セグメント	24.83 m、オープンで加熱
セグメント 2	0.17 m、Thermal Aux 1 で加熱
In	BF EPC
出口	MSD
圧力	12.3 psi
流量	1.5 mL/min
モード	定流量
キャリアガス	ヘリウム
RT ロック	クリセンを 25.89 分にロック*

* 機器により異なる

BF 使用条件	
オープン温度	330 °C
BF 圧力	70 psi
BF 中の注入口圧力	2 psi
ポイドボリューム	20
BF 時間	0.38 minutes
注入口への BF 流量	29.124 mL/min
注入口	7693A オートサンブラ
注入量	2 µL
シリンジサイズ	10 µL
シリンジ	G4513-80203
粘度ディレイ	2 秒
Thermal Aux 2 (MSD トランスファーライン)	
ヒーター	320 °C

表 2. MS パラメータ

MSD 条件	
MSD	7010 トリプル四重極 LC/MS
イオン源	電子イオン化
スキャンタイプ	MRM
イオン化エネルギー	70 eV
溶媒ディレイ	14 minutes
MS イオン源	300 °C
MS 四重極	150 °C
ゲイン	10
コリジョンセル	
He クエンチガス	4 mL/min
N ₂ コリジョンガス	1.5 mL/min
JetClean	
操作	測定とクリーニング
水素流量	0.33 mL/min

表 3. MRM トランジションとスキャンセグメント

成分 ^a	RT (分) ^b	クオンティファイア ^c	クオリファイア ^c	ドウェル (ms)	サイクル/s	ms/サイクル
ベンゾ(c)フルオレン	21.2	216.0 -> 215.0	216.0 -> 216.0	350	1.4	702
ベンゾ(a)アントラセン-d ₁₂	27.3	240.0 -> 240.0	240.0 -> 238.0	100	1.4	705.8
ベンゾ(a)アントラセン	27.5	228.0 -> 228.0	228.0 -> 226.0	100	1.4	705.8
クリセン-d ₁₂	27.8	240.0 -> 240.0	240.0 -> 238.0	100	1.4	705.8
シクロペンタ(cd)ピレン	27.9	226.0 -> 226.0	226.0 -> 225.0	100	1.4	705.8
クリセン	28.1	228.0 -> 228.0	228.0 -> 226.0	100	1.4	705.8
5-メチルクリセン	31.3	242.0 -> 240.0	242.0 -> 242.0	230	1.4	692.7
ベンゾ(b)フルオランテン-d ₁₂	35.6	264.0 -> 264.0	264.0 -> 262.0	125	1.3	755.3
ベンゾ(b)フルオランテン	35.8	252.0 -> 252.0	252.0 -> 250.0	125	1.3	755.3
ベンゾ(k)フルオランテン-d ₁₂	35.8	264.0 -> 264.0	264.0 -> 262.0	125	1.3	755.3
ベンゾ(k)フルオランテン	35.9	252.0 -> 252.0	252.0 -> 250.0	125	1.3	755.3
ベンゾ(j)フルオランテン	36.0	252.0 -> 252.0	252.0 -> 250.0	125	1.3	755.3
ベンゾ(e)ピレン	37.1	252.0 -> 252.0	252.0 -> 250.0	170	1.5	683.6
ベンゾ(a)ピレン-d ₁₂	37.2	264.0 -> 264.0	264.0 -> 262.0	170	1.5	683.6
ベンゾ(a)ピレン	37.2	252.0 -> 252.0	252.0 -> 250.0	170	1.5	683.6
ジベンゾ(ah)アントラセン-d ₄	40.7	292.0 -> 292.0	292.0 -> 290.0	60	1.4	730.2
インデノ(123-cd)ピレン-d ₁₂	40.8	288.0 -> 288.0	288.0 -> 286.0	60	1.4	730.2
ジベンゾ(ah)アントラセン	40.8	278.0 -> 276.0	278.0 -> 278.0	60	1.4	730.2
インデノ(123-cd)ピレン	40.8	276.0 -> 274.0	276.0 -> 276.0	60	1.4	730.2
ベンゾ(ghi)ペリレン-d ₁₂	42.1	288.0 -> 288.0	288.0 -> 286.0	150	1.1	905.4
ベンゾ(ghi)ペリレン	42.2	276.0 -> 276.0	276.0 -> 274.0	150	1.1	905.4

^a 内部標準として、同位体標識された化合物 (-d₁₂ および -d₄) を使用 (p/n 5191-4509)。その他すべての成分は PAH 標準混合試料 (p/n 5191-4508) のもの。ゲイン = 10。

^b リテンションタイムはシステムにより異なる

^c すべての成分および内部標準のクオンティファイアおよびクオリファイアの MRM トランジションにコリジョンエネルギー 50 eV を使用。定量イオンは、存在量が多く、干渉が少ないことを基準に選択。すべてのプリカーサーおよびプロダクトイオンにユニット分解能 (0.7 amu) を使用。

結果と考察

EMR-Lipid によるサンプル前処理

EMR-Lipid dSPE クリーンアップを、種子油マトリックス中の PAH 分析用に改良しました。カボチャ種子油は、脂肪の多い疎水性マトリックスであり、高疎水性の PAH 成分に強く結合します。通常、EMR-Lipid dSPE クリーンアップで効率的に脂質を除去するには、サンプル混合液中に水が 50 % 含まれていなければなりません。ただし、50 % の水を添加すると PAH の溶解性が低下し、成分の回収率に悪影響をおよぼします。そのため、EMR-Lipid 充填剤活性化用の水を 2.5 mL (通常は 5 mL) に減量しました。その後、充填剤

との相互作用を最大化するために、直ちにカボチャ種子油抽出液を EMR-Lipid 充填剤に加えました。通常、残留水分の除去には、EMR-Polish dSPE が推奨されます。ただし、GC/MS/MS 分析には、この 1 ステップの水分除去では不十分なため、追加の乾燥ステップが必要になります。そこで、さらにマトリックススクリーンアップと完全な水分除去を行うために、PSA/C18/MgSO₄ dSPE クリーンアップを使用しました。また、GC/MS/MS 分析において目的とする PAH の定量下限を達成するために、サンプルを濃縮し、イソオクタンで 10 倍に再溶解しました。

EMR-Lipid dSPE クリーンアップによるマトリックススクリーンアップ効率を評価するために、MS フルスキャンを使用しました。サンプルクリーンアップなしのカボチャ種子油では、マトリックスおよび脂質による干渉が、ベースラインの上昇とカラムのオーバーロードとして現れました (図 3)。以下の 3 通りのサンプルクリーンアップメソッドを比較しました。

- PSA/C18/MgSO₄ dSPE
- EMR-Lipid dSPE
- EMR-Lipid dSPE および PSA/C18/MgSO₄ dSPE

EMR-Lipid に加えて PSA/C18/MgSO₄ を使用したクリーンアップでは、脂質およびその他のマトリックス干渉が最も効率的にクリーンアップされました。

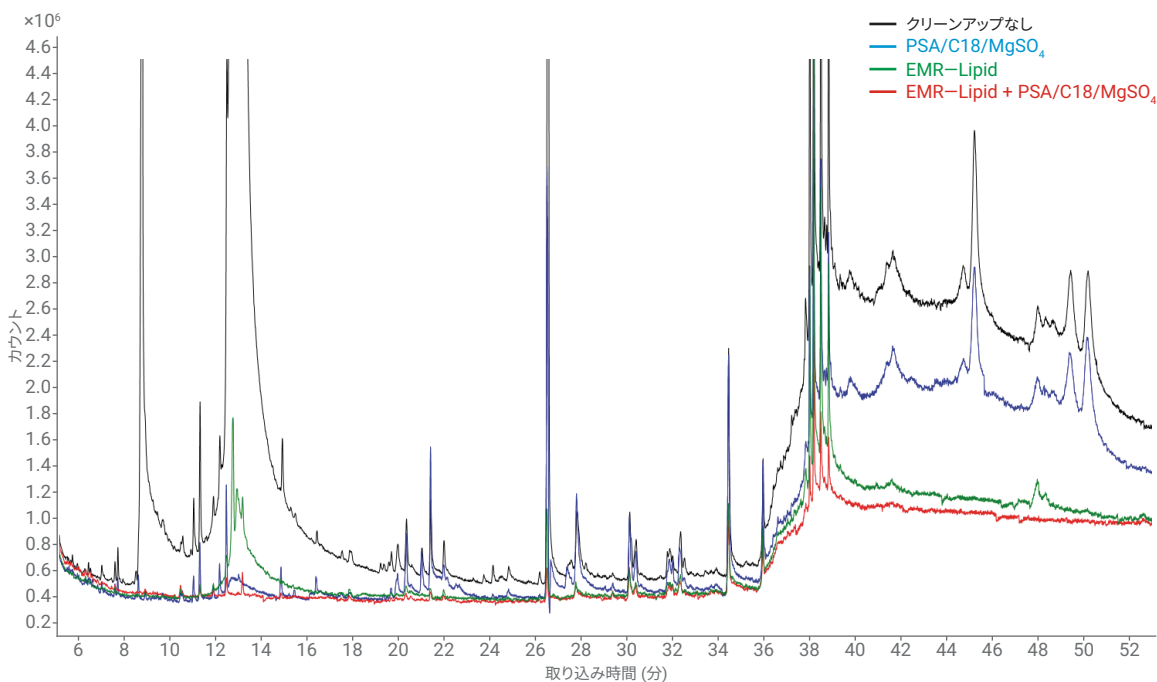


図 3. さまざまなクリーンアップ手順によるパンプキン種子油抽出液のクロマトグラム。MS スキャン範囲 m/z 40 ~ 1,050。黒: クリーンアップなし、青: PSA/C18/MgSO₄ クリーンアップ、緑: EMR-Lipid クリーンアップ、赤: EMR-Lipid と追加の PSA/C18/MgSO₄ クリーンアップ

GC/MS/MS 分析

GC/MS/MS を JetClean および BF で改良することにより、カボチャ種子油中に低濃度で存在する PAH を定量することができました。JetClean セルフクリーニングイオン源は、データ取り込み中に低流量の水素をイオン源に直接導入することによりマトリックスの堆積を排除するモジュールです。一方、BF は、分析終了時に最初のカラムの流れを逆流させ、高沸点のマトリックス汚染物質をスプリットベントから排出させることにより、サンプルキャ

リーオーバーを低減します。イオン源への汚染物質の堆積を防げることも、BF の利点です。これにより、カラムのベイクアウトを行わなくてもカラムの寿命が維持され、イオン源への堆積によるカラムブリードも防げます。

カボチャ種子油中の PAH を分析するために、MRM を高コリジョンエネルギー (CE) で使用しました。定量イオンおよび確認イオンは、イオンの存在量と重要度にもとづいて選択しました。PAH は容易にはフラグメント化しないため、クオンティファイアのプリカーサから

プロダクトイオンへのトランジションは、分子質量から分子質量への遷移 ($[M]^+ \rightarrow [M]^+$) になります。クオリファイアのトランジションは、 $[M]^+ \rightarrow [M-2]^+$ で分析しました。50 eV という高 CE は、PAH をそのまま維持しながらマトリックス干渉を除去するうえで有効でした (図 4)。表 4 に、MRM トランジションを示します。

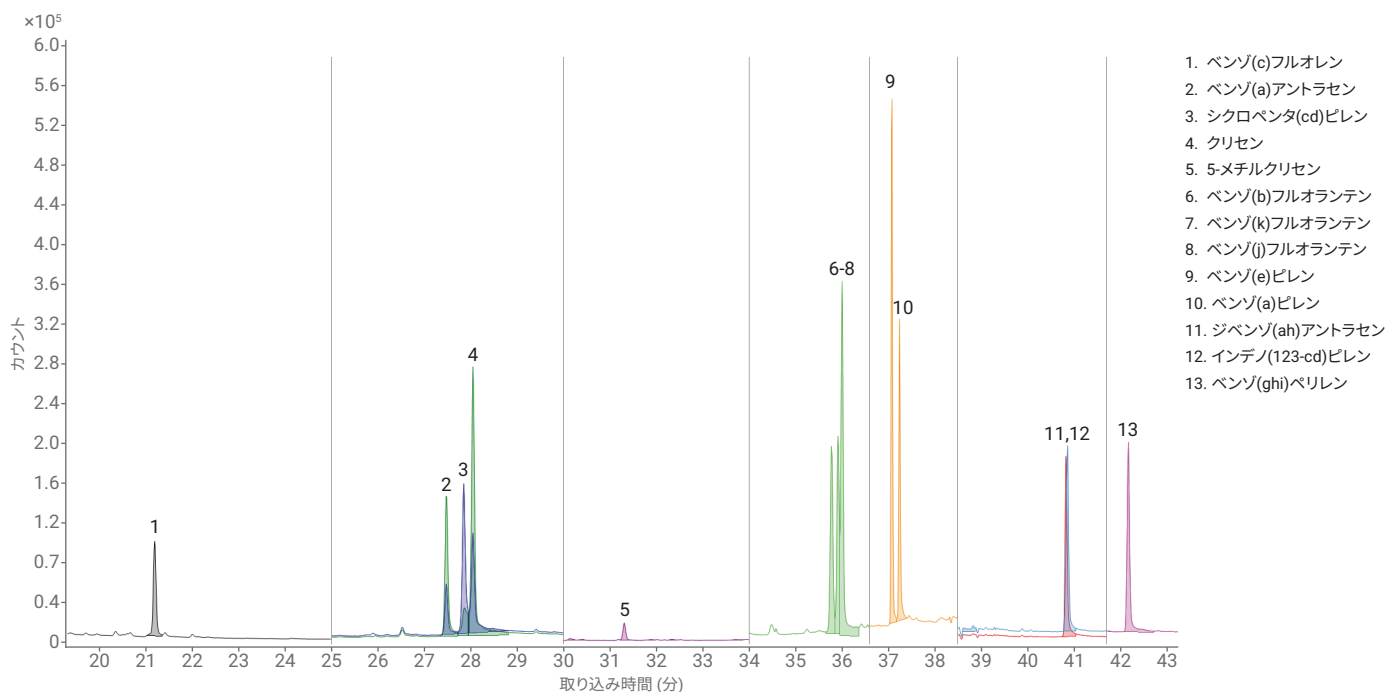


図 4. PAH を 50 ng/g でスパイクしたカボチャ種子油のマトリックス適合キャリブレーションで得られた定量イオンの MRM TIC。コリジョンエネルギー 50 eV。クオンティファイアのトランジション $[M]^+ \rightarrow [M]^+$ がプロットされています (M は分子質量)。

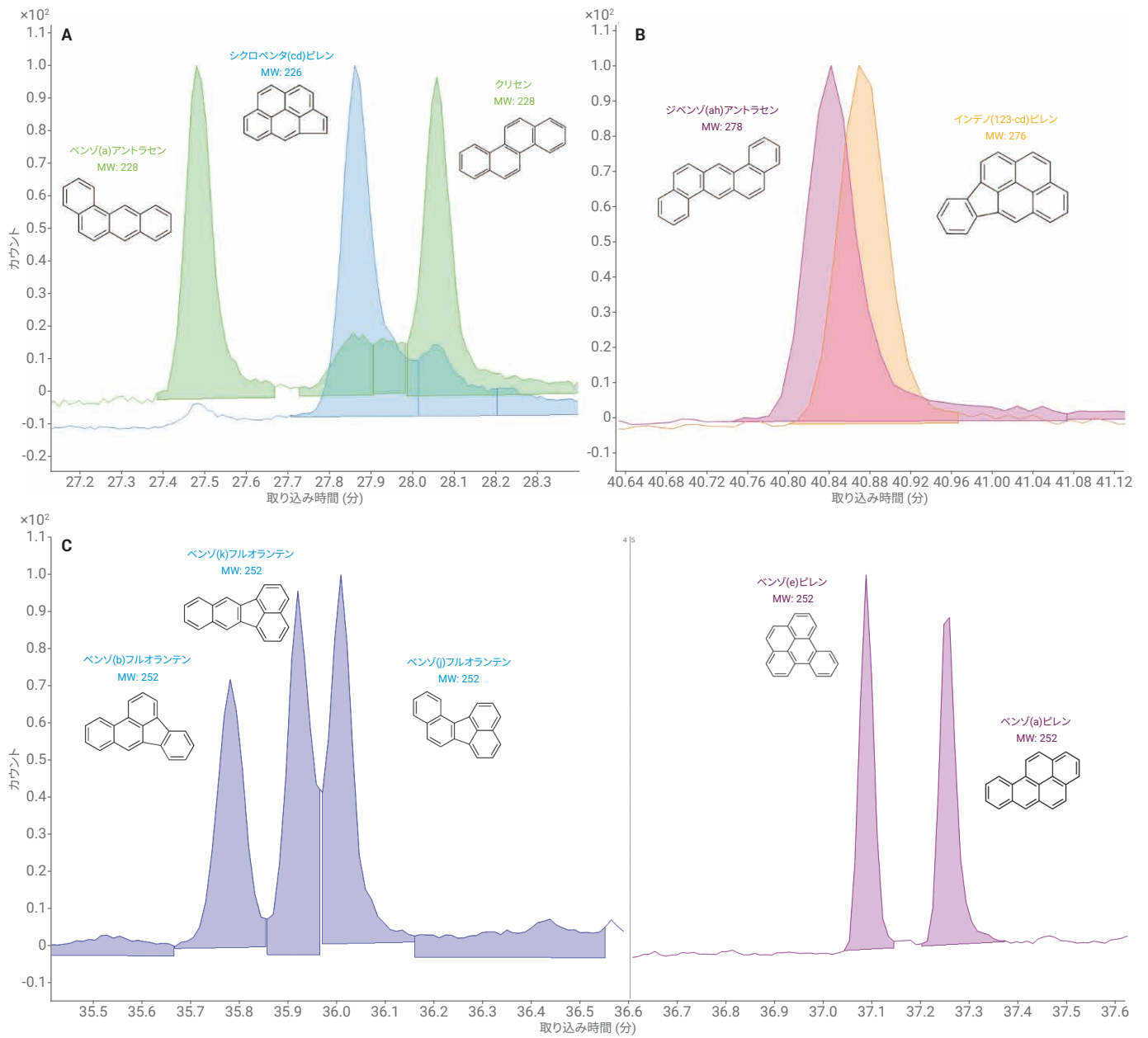


図 5. PAH を 5 ng/g でスパイクしたカボチャ種子油の GC/MS/MS MRM クロマトグラム (A ~ E)。コリジョンエネルギー 50 eV。クオンティファイアのトランジション $[M]^+ \rightarrow [M]^+$ がプロットされています (M は分子質量)。

Select PAH カラムは、質量フラグメンテーションが同一であることから多くの GCカラムでは一般に分離の難しい PAH 化合物ペアに対し、優れた分離能、良好なピーク形状、高い感度を示しました¹¹。このカラムは、今回の実験で調査した以下の PAH 化合物ペアの分離に特に役立ちました (図 6A ~ C)。

- ベンゾ(a)アントラセン、シクロペンタ(cd)ピレン、およびクリセン (分子質量 226、228 Da)
- インデノ(123-cd)ピレンおよびジベンゾ (ah)アントラセン (分子質量 276、278 Da)
- ベンゾ(b)フルオランテン、ベンゾ(k)フルオランテン、およびベンゾ(j)フルオランテン (分子質量 252 Da)
- ベンゾ(e)ピレンおよびベンゾ(a)ピレン (分子質量 252 Da)

プレスパイク濃度 1 ng/g でも、EU 委員会規則でモニタリング対象に指定されている PAH 4 種に対して優れた感度、ピーク形状、および分離能を示しました (図 6)。

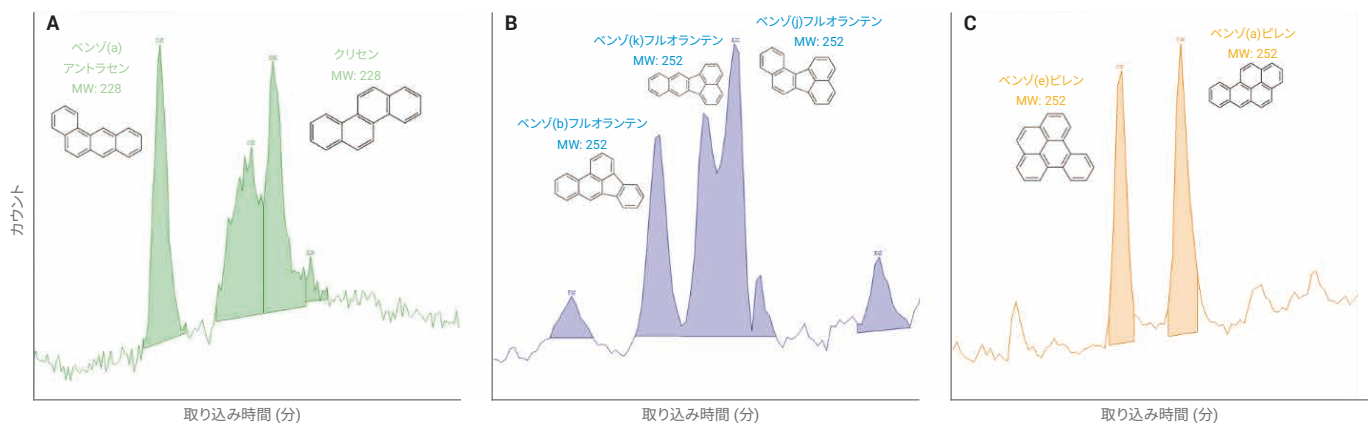


図 6. PAH を 1 ng/g でプレスパイクしたカボチャ種子油の MRM TIC

真度および精度

今回開発したサンプル前処理メソッドを使用することで、カボチャ種子油に 1、10、および 50 ng/g でスパイクしたサンプルにおいて優れた真度と精度が得られました。IS 補正を使用して分析した成分の真度は、79～108% の範囲でした (図 7A)。どのスパイク濃度でも、ベンゾ(k)フルオランテン (プレスパイク濃度 1 ng/g で 79%) を除くすべての化合物について、80～120% の範囲の真度が得られました。RSD は 2～17% の範囲でした (図 7B)。シクロペンタ(cd)ピレンおよび 5-メチルクリセンは、スパイク濃度 1 ng/g で検出されませんでした。

LOQ および検量線の直線性

メソッドの定量には、7 ポイントのマトリックス適合キャリブレーションを使用しました。マトリックス適合検量線は、PAH 濃度 1、2、5、10、25、50、および 100 ng/g、IS 濃度 50 ng/g で作成しました。検量線の作成には、 $1/x^2$ の重み付き直線回帰を使用し、結果的な検量線の R^2 は 0.99 を上回りました (表 5)。LOQ は、10 ng/g だったシクロペンタ(cd)ピレンと 5-メチルクリセンを除き、1 ng/g でした。

表 5. カボチャ種子油の 7 ポイントのマトリックス適合キャリブレーション

成分	LOQ	R ²
ベンゾ(c)フルオレン	1	0.9991
ベンゾ(a)アントラセン	1	0.9956
シクロペンタ(cd)ピレン	10	0.9949
クリセ	1	0.9932
5-メチルクリセ	10	0.9958
ベンゾ(b)フルオランテン	1	0.9982
ベンゾ(k)フルオランテン	1	0.9981
ベンゾ(j)フルオランテン	1	0.9925
ベンゾ(e)ピレン	1	0.9975
ベンゾ(a)ピレン	1	0.9925
Dibenzo(ah)anthracene	1	0.9994
インデノ(123-cd)ピレン	1	0.9987
ベンゾ(ghi)ペリレン	1	0.9988

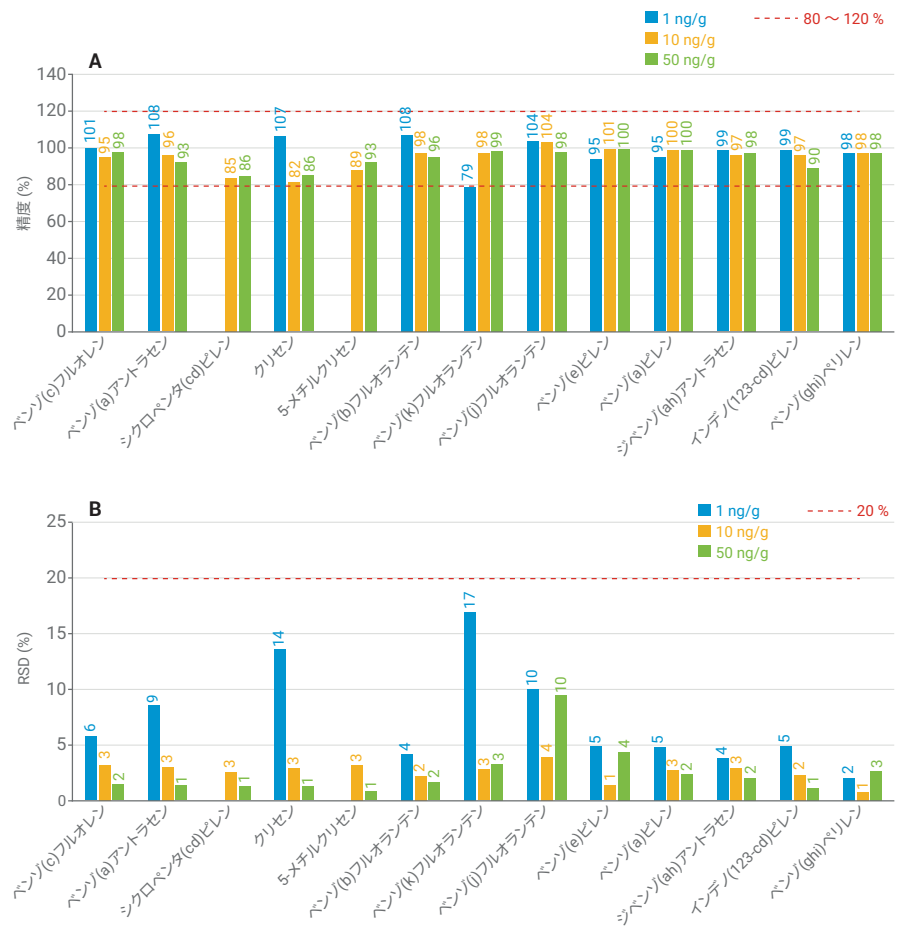


図 7. PAH 標準混合液を 1、10、および 50 ng/g でスパイクしたカボチャ種子油中の PAH の真度 (A) と精度 (B)。IS は 50 ng/g でスパイクしました。成分は、リテンションタイムが短いものから順にプロットされています。n = 6。

回収率

絶対回収率は、IS を使用しない状態で 27 ~ 94 % の範囲でした (図 8A)。回収率の RSD は 5 ~ 23 % の範囲でした (図 8B)。PAH の絶対回収率は、分子量の増加に伴って減少しています。これは、抽出ステップでアセトニトリルへの PAH の溶解性が低下したためです。全体的な回収率は、一部のスパイク濃度でのベンゾ(e)ピレン、ベンゾ(a)ピレン、ジベンゾ(ah)アントラセン、インデノ(123-cd)ピレン、およびベンゾ(ghi)ペリレンを除き、EU 委員会規則で規定された 50 ~ 120 % の限度内でした。ベンゾ(e)ピレンおよびベンゾ(a)ピレンの回収率は、スパイク濃度 10 ng/g でそれぞれ 45 % と 44 % でした。ジベンゾ(ah)アントラセンの回収率は、スパイク濃度 1 および 10 ng/g でそれぞれ 37 % と 39 % でした。インデノ(123-cd)ピレンの回収率は、スパイク濃度 1 および 10 ng/g でそれぞれ 38 % と 33 % でした。ベンゾ(ghi)ペリレンの回収率は、スパイク濃度 1、10、および 50 ng/g でそれぞれ 34 %、27 %、42 % でした。RSD% 値は、ベンゾ(a)ピレン (23 %) を除くすべての成分について 20 % を下回りました。ただし、回収率の低さは、定量に IS を使用することで改善できます。シクロペンタ(cd)ピレンおよび 5-メチルクリセンは、スパイク濃度 1 ng/g で検出されませんでした。

結論

カボチャ種子油中の PAH を分析するために、液液抽出に続いて Bond Elut EMR-Lipid dSPE および PSA/C18/MgSO₄ クリーンアップを行った後に GC/MS/MS 分析を行うメソッドを開発しました。EMR-Lipid dSPE クリーンアップは、充填剤活性化用の水を減量し、クリーンアップ中の PAH の回収率を高めるように改良しました。GC/MS/MS は、JetClean および BF により改良しました。これらの改良により、ほぼすべての EU 規制対

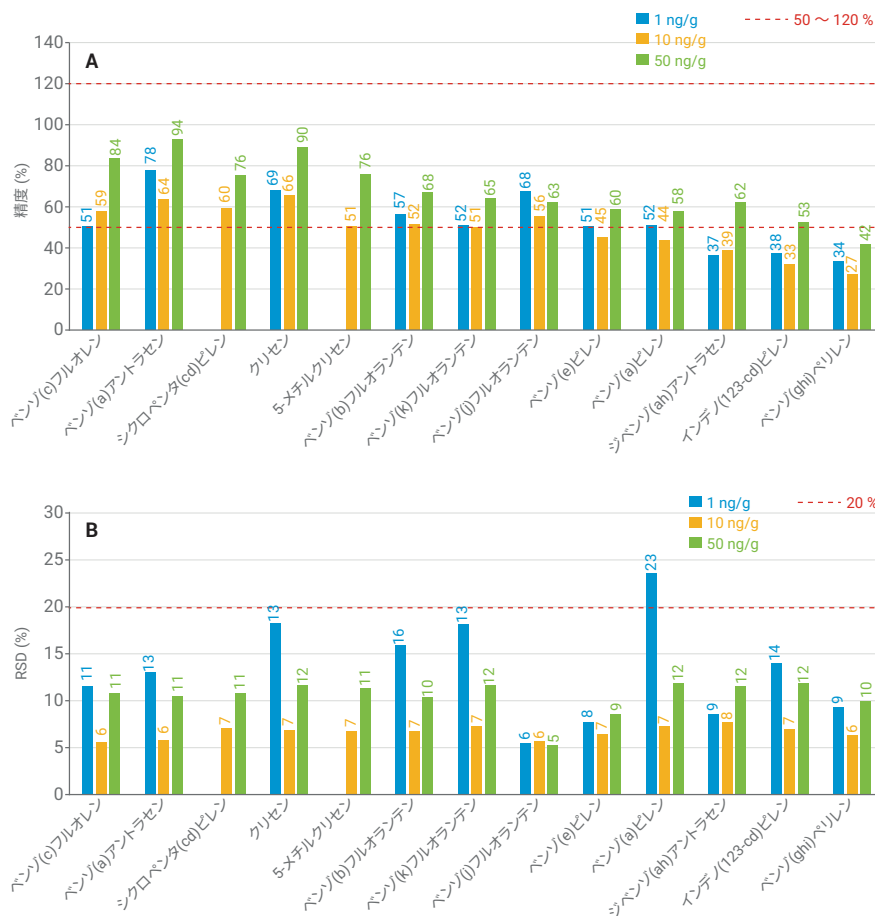


図 8. PAH 標準混合液を 1 ng/g (青)、10 ng/g (黄)、および 50 ng/g (緑) でスパイクしたカボチャ種子油中の PAH の回収率 (A) と RSD (B)。n=6。成分は、リテンションタイムが短いものから順にプロットされています。

象の優先 PAH について、50 ~ 120 % の限度内の回収率が得られました。検量線では、 $R^2 > 0.99$ という良好な直線性を達成できました。真度は、プレススパイク濃度 1 ng/g で 79 % だったベンゾ(k)フルオランテンを除き、100 ± 20 % の範囲内でした。精度は、すべての成分について 20 % 未満でした。回収率は、ほとんどの中間溶出成分について、EU 委員会

規則で定められた 50 ~ 120 % の限度内でした。ただし、より高分子量の PAH については課題が残されました。その原因は、抽出時のアセトニトリルに対する PAH の溶解性にあるものと考えられます。

参考文献

1. Larsson, B. K.; Eriksson, A. T.; Cervenka, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1987**, *64*, 365-370.
2. Zedeck, M. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **1980**, *3*, 537-567.
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L 364*, 20.12.2006, p. 5.
4. Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L 215*, 20.8.2011, p. 4.
5. Zhao, L.; Lucas, D. Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by GC/MS/MS. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6097EN, **2015**.
6. Lucas, D.; Zhao, L. PAH Analysis in Salmon with Enhanced Matrix Removal. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6088EN, **2015**.
7. Anderson, K. A.; et al. Modified Ion Source Triple Quadrupole Mass Spectrometer Gas Chromatograph for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Analyses. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1419*, 89-98.
8. PAHs Analysis in Palm Oil Significant Robustness Improvement Technology Advantage: Agilent JetClean Self-Cleaning Ion Source in a GC/MS/MS System. *Agilent Technologies Application Brief*, publication number 5991-7520EN, **2016**.
9. Meng, C.-K. Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush. *Agilent Technologies Application Brief*, publication number 5989-6018EN, **2006**.
10. Murkovic, M.; et al. Changes in Chemical Composition of Pumpkin Seeds During the Roasting Process for Production of Pumpkin Seed Oil (Part 1: Non-Volatile Compounds). *Food Chem.* **2004**, *84*, 359-365.
11. Kuipers, J.; et al. GC/MS Analysis of 16 EPA and (15+1) EU PAHs in Salmon Using an Agilent J&W Select PAH GC Column. *Agilent Technologies Application Note*, publication number SI-02424, **2010**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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, March 19, 2019
5994-0593JAJP