

Agilent Captiva EMR-Lipid と GC/MS/MS によるサケ中の残留農薬の 多成分分析

著者

Pimpernelli J. dos Santos,
Sônia M. V. S. Cardoso,
Osmar D. Prestes,
Martha B. Adaime,
and Renato Zanella
Universidade Federal de
Santa Maria, Departamento
de Química, Laboratório de
Análises de Resíduos de
Pesticidas (LARP), Santa
Maria-RS, Brasil, 97105-900

Mariana Baptista
Agilent Technologies do
Brasil, Barueri-SP, Brasil,
06455-000

概要

このアプリケーションノートでは、サケ中の多成分残留農薬を測定する分析メソッドについて説明します。サンプル前処理メソッドは液体抽出をベースとしており、その後 Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップと、Agilent Intuvo 9000 GC と 7010B トリプル四重極質量分析装置 (GC/MS/MS) による分析を行います。Captiva EMR-Lipid クリーンアップは、サケからの脂質などの主な干渉物を効率的に除去します。全 38 種類の農薬を Agilent HP-5ms ウルトライナートカラムを用いて 20 分の分析で測定し、サケ中のすべての化合物について 0.5 ~ 25 µg/kg の濃度範囲で良好な直線性 ($R^2 \geq 0.990$) を得られました。全体の回収率は、83 % から 125 % の範囲で RSD < 25 % でした。

はじめに

養殖水産物の需要の急増により、安全な食品供給を確実にするための残留農薬のモニタリングの必要性が高まっています。魚サンプルの複雑な組成（高タンパク質および高脂質含有量）のために、サンプル前処理が分析結果の品質を確保する際の課題となります。サンプルを適切に前処理するには、十分な量のターゲット化合物を一貫して抽出するとともに、マトリックスを効率的に除去する必要があります。

農薬の残留レベルが規制の最大残留基準値 (MRL) に適合するかどうかを判断するには、農薬の広範囲の追跡が必要です。サケはオメガ 3 脂肪酸の良質な供給源で、% 構成で約 20 % のタンパク質と 10 % の脂質が含まれています。国連食糧農業機関 (FAO) によると、サケは世界で 9 番目に多く養殖されている魚で、寄生虫が存在する可能性があるために養殖中にいくつかの農薬の使用が許可されています¹。しかし、これらの化合物の存在が、食料供給の面からは微量であっても、環境において害を引き起こす可能性があります。

この研究の目的は、サケのサンプル中の 38 種類の農薬残留物の検出および定量のための、効率的でシンプルな GC/MS/MS ベースの分析メソッドの開発でした。メソッドは、固液抽出をベースとし、続いて Captiva EMR-Lipid クリーンアップと残留水分の除去を実施しました。GC/MS/MS メソッドは、超高感度イオン源 (HES) と 30 m HP-5ms ウルトライナートカラムを用いたダイナミックマルチプレリアクションモニタリング (dMRM) をベースとしました。

実験方法

材料および試薬

- 農薬標準物質 (高純度 $\geq 95\%$) : Dr. Ehrenstorfer (ドイツ) および Sigma-Aldrich (米国)
- アセトニトリル (ACN)、メタノール (MeOH)、酢酸エチル (EtOAc) HPLC グレード : J.T. Baker (米国)
- 試薬グレードのイソオクタン : Mallinckrodt (アイルランド)
- ポリプロピレンチューブ (15 mL および 50 mL) : Sarstedt (ドイツ)
- エッペンドルフマイクロチューブ (2 mL) : Axygen Scientific (EUA)

溶液および標準試料

個々の農薬原液 (1000 mg/L) を適切な溶媒 (ACN、MeOH、またはトルエン) で調製し、 $\leq -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。混合物溶液 (10 mg/L) を ACN で調製し、 $\leq -5\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。

80:20 の ACN/EtOAc 抽出溶媒と 16:64:20 の ACN/EtOAc/水溶出溶液を調製し、室温で保管しました。

実験装置と材料

- 遠心分離機 NT 825 : (Novatecnica、サンパウロ、ブラジル)、SL 703 : (Solab、サンパウロ、ブラジル)
- ボルテックスミキサー QL-901 : (Microtechnology、サンパウロ、ブラジル)
- 電子天びん UX-420H および AUW 220D : (島津製作所、京都、日本)
- 超純水 (18 M Ω cm) : Milli-Q システム (フランス)
- Captiva EMR-Lipid カートリッジ、3 mL、300 mg (p/n 5190-1003)

- マニホールド : Vac Elut 12 ポジション (p/n 5982-9115)
- セラミックホモジナイザ (p/n 5982-9313)
- シリンジフィルタ、13 mm、0.22 μm 、ナイロン (p/n 5190-5269)
- 注入口セプタム、ブリード/温度最適化 (BTO)、ノンスティック、11 mm (p/n 5183-4757)
- バイアル 2 mL、透明、スクリュー、検定済 (p/n 5182-0714)
- スクリューキャップ、PTFE/赤シリコンセプタム、検定済 (p/n 5182-0717)
- ALS シリンジ、ニードル固定型、10 μL 、PTFE-チップ付きプランジヤ (p/n 5183-4730)
- ウルトラライナートライナー、スプリットレス、シングルテーパー、ガラスウール (p/n 5190-3167)
- Intuvo 用キャピラリーカラム HP-5ms UI、30 m \times 0.25 mm、0.25 μm (p/n 19091S-433UI-INT)
- Intuvo SSL ガードチップ (p/n G4587-60565)
- ガスクリーンフィルタキット。ブラケット、コネクティングユニットおよび、水、酸素、有機物除去用のキャリアガスフィルタを含む (p/n CP17975)
- さまざまな容量のピペット : Eppendorf (米国)

分析には Agilent Intuvo 9000 GC と 7010B トリプル四重極 GC/MS を組み合わせて使用しました。GC システムにはエレクトロニックニューマティクスコントロール (EPC) を搭載し 7693 オートサンブラを組み合わせた。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

分析条件

GC/MS/MS 機器の条件は評価済みの化合物に基づいて設定しました。表 1 に GC/MS/MS 測定の見終条件を示します。

表 1. Intuvo 9000C と 7010B の GC/MS/MS 条件

パラメータ	設定値
キャリアガス	ヘリウム 1.2 mL/min
注入量	2 µL (パルススプリットレスモード)
注入パルス圧力	50 psi
オープンプログラム	60 °C (1 分)、 40 °C/min で 170 °Cまで昇温、 10 °C/min で 310 °Cまで昇温、 3 分間維持
インジェクタ温度	280 °C
ガードチップ温度	初期 85 °C トラックオープンモード
バス温度	280 °C
トランスファーライン	290 °C
イオン源	HES (電子イオン化法)
イオン源温度	300 °C
MS1/MS2 温度	150 °C
測定モード	ダイナミック MRM (dMRM)
コリジョンガス	窒素、1.5 mL/min

表 2. 農薬リスト、定量イオンおよびコリジョンエネルギー MRM トランジション

化合物	MRM トランジション				RT (分)
	定量イオン (m/z)	CE (V)	定性イオン (m/z)	CE (V)	
アクリナトリン	228.9 -> 92.8	10	207.8 -> 181.1	10	14.762
アラクロール	188.1 -> 160.1	10	188.1 -> 132.1	20	9.224
アトラジン	214.9 -> 200.2	5	214.9 -> 58.1	10	8.069
カズサホス	158.8 -> 131.0	5	158.8 -> 97.0	15	7.183
クロルデン-cis	372.8 -> 300.9	10	372.8 -> 265.9	25	11.099
クロルフェナビル	328.0 -> 247.0	20	247.1 -> 227.1	20	11.914
クロルフェンピホス	294.9 -> 266.9	5	266.9 -> 159.0	20	10.438
クロルピリホス	313.8 -> 257.8	15	198.9 -> 171.0	15	9.881
クロルピリホスメチル	285.9 -> 93.0	25	124.9 -> 47.0	15	9.120
シハロトリン (λ)	208.1 -> 181.1	10	181.1 -> 152.1	30	14.657
エポキシコナゾール	192.0 -> 138.1	10	192.0 -> 111.0	25	12.919
エトプロホス	157.9 -> 114.0	5	157.9 -> 97.0	15	7.183
エトリムホス	292.1 -> 181.1	5	181.1 -> 153.1	10	8.560
フェニトロチオン	277.0 -> 260.1	5	125.1 -> 79.0	5	9.118
フェンプロピモルフ	128.1 -> 110.1	5	128.1 -> 86.1	10	9.990
フェンチオン	278.0 -> 109.0	15	124.9 -> 79.0	5	9.974
フィロニル	366.8 -> 212.8	25	350.8 -> 254.8	15	10.488
フルアジホップ-p-ブチル	382.9 -> 282.0	10	281.9 -> 238.0	15	12.049
フルキンコナゾール	340.0 -> 298.0	15	340.0 -> 107.8	40	15.798
HCH-α	218.9 -> 183.0	5	216.9 -> 181.0	5	7.766
HCH-β	218.9 -> 183.1	5	216.9 -> 181.1	5	7.866
ヘキサクロロベンゼン	283.9 -> 248.8	15	283.8 -> 213.9	30	7.834
インドキサカルブ	202.9 -> 134.0	15	202.9 -> 106.0	25	17.900
マラチオン	172.9 -> 99.0	15	157.8 -> 125.0	5	9.734
メチダチオン	144.9 -> 85.0	5	144.9 -> 58.1	15	11.033
メトラクロール	240.0 -> 162.2	10	238.0 -> 162.2	10	9.866
ベンジメタリン	251.8 -> 162.2	10	251.8 -> 161.1	15	10.449
ピリミカルブ	238.0 -> 166.2	10	166.0 -> 96.0	15	8.699
ピリミホスメチル	290.0 -> 125.0	20	232.9 -> 151.0	5	9.533
ピラソホス	232.0 -> 204.1	10	221.0 -> 193.1	10	15.031
ピリメタニル	198.0 -> 183.1	15	198.0 -> 158.1	20	8.451
キナルホス	157.0 -> 129.1	15	146.0 -> 118.0	10	10.757
スピロメシフェン	273.0 -> 255.1	5	272.0 -> 254.2	5	13.611
テルブホス	230.9 -> 175.0	10	230.9 -> 129.0	20	8.256
テトラコナゾール	336.0 -> 217.9	20	336.0 -> 203.8	30	10.049
トリフロキシストロピン	172.0 -> 145.1	15	116.0 -> 89.0	15	12.830
トリフルラリン	306.1 -> 264.0	5	264.0 -> 206.0	5	7.269
ピンクロソリン	212.0 -> 172.1	15	197.9 -> 145.0	15	9.158

サンプル前処理

サンプル前処理メソッドは、以前にサケ中の多環芳香族炭化水素 (PAH) の測定に使用した報告済みメソッドに基づいて確立しました²。サケサンプルは、ブラジルのリオグランデ・ド・スル州、サンタマリアにある地域の食料品店から購入しました。サンプルを小さく切ってホモジナイズし、冷凍庫に-10 °C 以下で保管しました。メソッドは、次の3つの主要セクションで実行しました。

1. 固液抽出
2. Captiva EMR-Lipid クリーンアップ
3. 脱水

ホモジナイズしたサンプルを 2.5 g 計量して 50 mL 遠心分離 (ポリプロピレン) チューブに入れ、必要に応じてスパイクし、1 分間ボルテックスし、15 ~ 20 分間平衡化しました。図 1 にサンプル前処理の手順を通して示します。

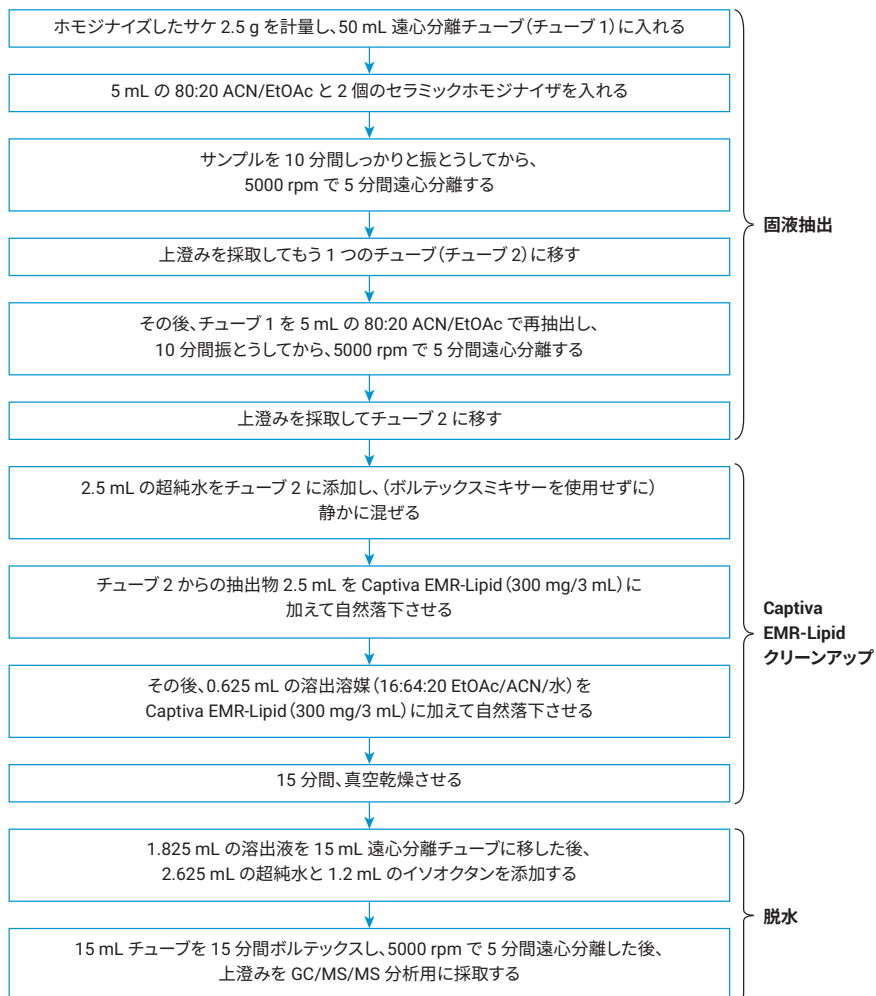


図 1. 固液抽出とその後の Captiva EMR-Lipid クリーンアップに基づく、サケサンプルのサンプル前処理の手順

メソッドバリデーション

定量下限 (LOQ)、直線性、精度、真度などのパラメータを評価しました。検量線標準は、5つの異なる点 (2、4、25、50、100 µg/kg) を含みます。3つのスパイクレベル (25、50、100 µg/kg) を回収率と RSD% (n = 3) について評価しました。成分の同定と定量化は、リテンションタイムと MRM トランジションから測定しました。

結果と考察

GC メソッド

ダイナミック MRM は多成分残留物を対象とするメソッドに有用なツールです。分析のための検出可能なリテンションタイムウィンドウ (デルタ RT) 内にあるリテンションタイム (RT) を基に MRM の自動テーブルを作成することによって、化合物をより高い精度で同定、定量化できます。さらに、ウルトライナート (UI) ライナおよびカラムを用いることで、有機リン系や有機塩素系などの不安定な農薬が GC 流路の表面の活性点と相互作用して不良な結果を招くのを回避しました。機器の流路内の活性点と非常に反応しやすい化合物のために、ピーク形状と再現性が損なわれ、感度が大幅に低下する可能性があります^{3, 4}。図 2 に、25 µg/kg レベルでサケのブランクサンプルにスパイクした合計 38 種類の化合物の MRM クロマトグラムを示します。

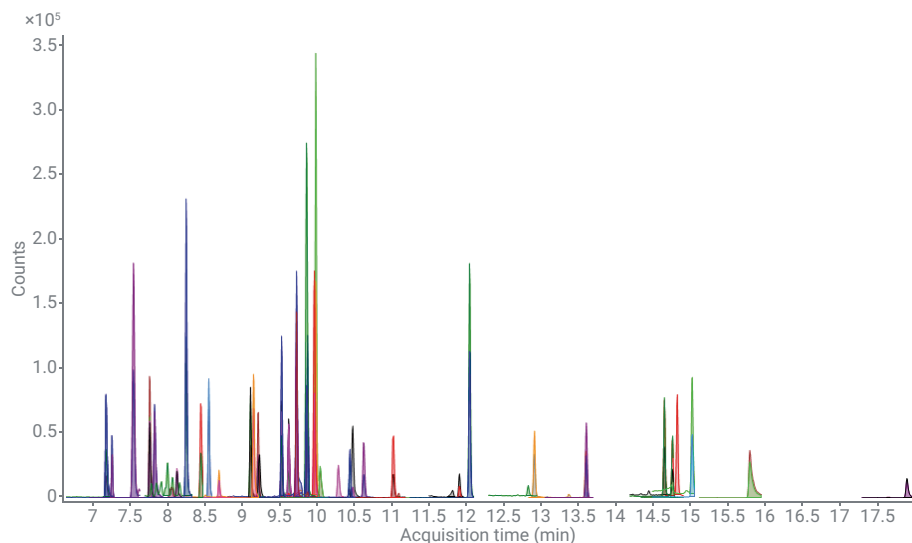


図 2. 20 分間で 38 種類の農薬の分離を示す、GC/MS/MS での MRM クロマトグラム

表 3 に、38 種類のすべての農薬に対する検証結果を示します。検量線の直線係数 R^2 は、すべての化合物で 0.9900 以上でした。50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のシハロトリン (λ) とフェンプロピモルフの 2 つの化合物を除くと、メソッドの定量下限 (LOQ) は 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でした。分析対象物の回収率は、濃度 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 80 ~ 125 % の範囲で、濃度 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 93 ~ 119 %、濃度 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では 83 ~ 107 % でした。相対標準偏差 (RSD) の精度は、3 種類のスパイク濃度すべてにおいて 25 % 未満でした。

表 3. すべての農薬の、メソッドの検量線の直線性、回収率と RSD (n = 3) および定量下限 (LOQ)

化合物	R^2	回収率 % (n = 3での RSD %)			LOQ % b
		25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
アクリナトリン	0.9922	92 (7)	101 (9)	101 (2)	25
アラクロール	0.9966	100 (5)	111 (8)	101 (9)	25
アトラジン	0.9959	113 (2)	106 (1)	92 (9)	25
カズサホス	0.9938	107 (9)	119 (8)	105 (13)	25
クロルデン-cis	0.9900	95 (5)	104 (3)	83 10	25
クロルフェナビル	0.9941	88 (1)	101 (7)	97 1	25
クロルフェンピホス	0.9918	109 (14)	114 (2)	95 14	25
クロルピリホス	0.9951	83 (9)	105 (14)	96 3	25
クロルピリフォスメチル	0.9973	93 (2)	107 (9)	96 14	25
シハロトリン (λ)	0.9986	125 (25)	104 (6)	94 (8)	50
エボキシコナゾール	0.9919	105 (1)	103 (5)	95 (9)	25
エトプロホス	0.9934	108 (9)	119 (9)	106 (13)	25
エトリムホス	0.9967	99 (3)	110 (9)	100 (8)	25
フェニトロチオン	0.9985	88 (4)	102 (12)	93 (13)	25
フェンプロピモルフ	0.9926	80 (25)	100 (8)	103 (15)	50
フェンチオン	0.9955	95 (3)	106 (4)	95 (5)	25
フィプロニル	0.9907	99 (7)	110 (5)	93 (15)	25
フルアジホップ-p-ブチル	0.9939	92 (5)	103 (7)	98 (1)	25
フルキンコナゾール	0.9917	108 (12)	113 (3)	97 (14)	25
HCH- α	0.9901	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
HCH- β	0.9930	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
ヘキサクロロベンゼン	0.9917	84 (13)	93 (5)	98 (7)	25
インドキサカルブ	0.9999	93 (5)	114 (4)	99 (12)	25
マラチオン	0.9981	97 (7)	106 (7)	88 (3)	25
メチダチオン	0.9968	97 (13)	107 (5)	92 (21)	25
メトラクロール	0.9909	98 (5)	109 (4)	96 (7)	25
ベンジメタリン	0.9946	94 (0)	109 (8)	100 (3)	25
ピリミカルブ	0.9937	114 (6)	112 (9)	103 (20)	25
ピリミホスメチル	0.9985	92 (2)	105 (4)	96 (5)	25
ピラゾホス	0.9954	91 (6)	114 (8)	97 (13)	25
ピリメタニル	0.9924	96 (3)	104 (9)	94 (9)	25
キナルホス	0.9909	92 (1)	106 (7)	95 (6)	25
スピロメシフェン	0.9970	92 (2)	108 (6)	97 (8)	25
テルブホス	0.9960	93 (3)	108 (10)	99 (2)	25
テトラコナゾール	0.9915	110 (12)	113 (2)	95 (14)	25
トリフロキシストロピン	0.9978	108 (9)	109 (8)	100 (11)	25
トリフルラリン	0.9920	96 (1)	113 (9)	107 (6)	25
ピンクロゾリン	0.9988	91 (3)	107 (7)	98 (5)	25

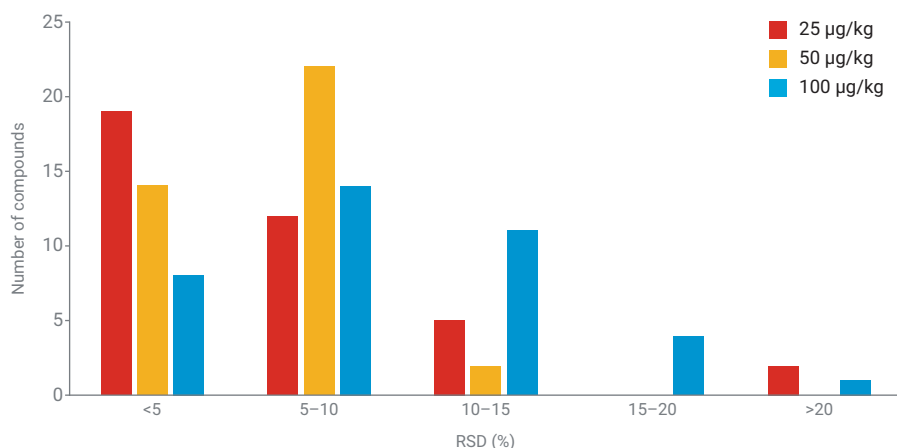


図 4. サケ中の各スパイクレベル、n = 3 での農薬分析のメソッド再現性 % RSD

結論

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップと Agilent Intuvo GC/MS/MS によるメソッドを開発し、サケ中の 38 種類の農薬の分析について検証しました。このサンプル前処理メソッドで、優れた分析結果が得られ、GC で検査可能な農薬の分析に適用できることが示されました。効率的なサンプルマトリックスクリーンアップによって、脂肪の多い食品マトリックスから多成分化合物を抽出する優れたメソッドであり、食品検査ラボ向けのシンプルなルーチンメソッドにつながります。特筆すべきは、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを LC/MS/MS 技法でも使用できる点です。

参考文献

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The state of world fisheries and aquaculture, **2018**. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
2. Determination of 19 Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Salmon and Beef, *Agilent Application Note*, publication number 5994-0553EN, **2019**.
3. Challenging Pesticide Analysis Using an Agilent J&W DB-35ms Ultra Inert GC Column, *Agilent Application Note*, publication number 5990-6595EN, **2010**.
4. Better Pesticide Analysis with Agilent J&W Ultimate Plus Tubing in an Inert Flow, *Agilent Application Note*, publication number 5991-5404EN, **2014**.

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. 2020

Printed in Japan, February 10, 2020

5994-1717JAJP

DE.5752546296