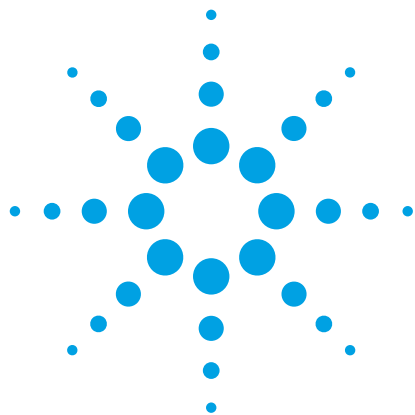




Bond Elut QuEChERS 抽出キットと Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート GC カラムを用いた米中の残留農薬の分析

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Andy Zhai, Yun Zou
Agilent Technologies Co., Ltd
412 YingLun Road
Waigaoqiao Free Trade Zone
Shanghai 200131 P.R.China

要約

このアプリケーションノートでは、米に残留した 57 種類の GC で測定可能な農薬の抽出とクリーンアップについて欧州委員会 (EN) が規定した前処理法である QuEChERS 法の使用方法を説明します。メソッドには、水/アセトニトリルシステムでの初期抽出、塩を添加した後の抽出/分離手順、および分散固相抽出 (分散 SPE) を使用したクリーンアップ手順が含まれます。米抽出物中の分析対象農薬は、Agilent J&W HP-5ms ウルトライナートキャピラリー GC カラムで分離し、SIM モードでガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (GC/MS) で分析しました。Agilent RTL 農薬ライブラリで GC/MS ファイルを迅速にスクリーニングおよび解析し、残留農薬を同定しました。回収率と再現性に関してメソッドを検証しました。回収率試験は 50、100、200 ng/g のレベルでスパイクして行いました。ほとんどの回収率は 80~110 % の範囲で、平均 RSD は 5.53 % でした。



Agilent Technologies

緒言

農業分析用の QuEChERS 法は、2003 年に USDA の科学者によって初めて紹介されました [1]。この方法は、問題のある農業に対応するためにバッファ付きシステムを組み込むことなどで修正されました [2]。EN メソッド 15662:2007 は、QuEChERS 法の欧州版です [3、4]。本方法では、アセトニトリル抽出を行なった後、無水硫酸マグネシウム (MgSO_4)、NaCl、およびバッファ用クエン酸塩を使用して液液分離を誘導することによりサンプル中の水の塩析を行います。1 級-2 級アミン (PSA) の充填剤を使用して他の成分から脂肪酸を除去し、無水 MgSO_4 を使用して抽出物中の残留水を除去することを組み合わせて、分散 SPE によるクリーンアップを実施します。混合して遠心分離した後で、上澄みを分析に使用します。

GC/MS は、農薬を検出および分離するのに信頼度の高いツールです。リテンションタイムロッキング (RTL) は、クロマトグラフの使用者がアジレントの GC 機器でリテンションタイムを再現できるようにする GC および GC/MS 用のシンプルな手法です [5]。アジレントは、962 種類の農薬、代謝物、および内分泌攪乱の疑いのある物質を含む GC および GC/MS RTL データベース (部品番号 G1672AA) を開発しました [6]。このデータベースにメソッドをロックすることで、複雑な食品抽出物中の農薬物質の同定がはるかに簡単になります。

GC 条件

カラム	Agilent J&W HP-5ms ウルトラインアート、30 m、0.25 mm、0.25 μm (部品番号 19091S-433UI)
注入口温度	250 °C
キャリアガス	ヘリウム、コンスタントプレッシャーモード
リテンションタイムロッキング	クロルピリホスメチルを 16.596 分に固定
注入モード	スプリットレス、0.75 分で 50 mL/min のパージフロー
注入量	1 μL
オープン	70 °C (2 分)、25 °C/min 70 °C→150 °C (0 分)、3 °C/min 150 °C→200 °C、8 °C/min 200 °C→280 °C (10 分)、ポストラン: 320 °C (5 分)

MS 条件

溶媒ディレイ	4 分
MS 温度	230 °C (ソース)、150 °C (四重極)
トランスファライン	280 °C
MS ライブラリ	Agilent RTL 農薬ライブラリ (G1672AA) および NIST08 質量分析ライブラリ
MS	EI、SIM/スキャン
スキャンモード	質量範囲 (50~550 amu)

他のパラメータについては表 1 を参照

表 1. 農薬、CAS 番号、分子式、およびターゲットイオン

化合物	CAS 番号	分子式	ターゲットイオン
フェナントレン-d10*	1517-22-2	C14D10	188
トリフェニルホスフェート*	115-86-6	C18H15O4P	326
メタミドホス	10265-9-26	C2H8NO2PS	94
ジクロルボス	62-73-7	C4H7Cl2O4P	109
オメトエート	1113-02-6	C5H12NO4PS	156
モノクロトホス	6923-22-4	C7H14NO5P	127
BHC α 異性体	319-84-6	C6H6Cl6	181
ヘキサクロロベンゼン	118-74-1	C6Cl6	284
ジメトアート	60-51-5	C5H12NO3PS2	87
BHC β 異性体	319-85-7	C6H6Cl6	219
リンデン	58-89-9	C6H6Cl6	181
ペンタクロロニトロベンゼン	82-68-8	C6Cl5NO2	237
ダイアジノン	333-41-5	C12H21N2O3PS	179
BHC δ 異性体	319-86-8	C6H6Cl6	181
プロバニル	709-98-8	C9H9Cl2NO	161
メチルパラチオン	298-00-0	C8H10NO5PS	263
クロルピリホスメチル	5598-13-0	C7H7Cl3NO3PS	286
ピンクロソリン	50471-44-8	C12H9Cl2NO3	212
ヘプタクロル	76-44-8	C10H5Cl7	272
メタラキシル	57837-19-1	C15H21NO4	206
フェニトロチオン	122-14-5	C9H12NO5PS	277
ピリミホスメチル	29232-93-7	C11H20N3O3PS	290
アルドリノ	309-00-2	C12H8Cl6	263
マラチオン	121-75-5	C10H19O6PS2	173
フェンチオン	55-38-9	C10H15O3PS2	278
クロルピリホス	2921-88-2	C9H11Cl3NO3PS	197
パラチオン	56-38-2	C10H14NO5PS	291
トリアジメホス	43121-43-3	C14H16ClN3O2	57
ヘプタクロル-exo-エポキシド	1024-57-3	C10H5Cl7O	353
ベンジメタリン	40487-42-1	C13H19N3O4	252
イソフェンホス	25311-71-1	C15H24NO4PS	213
キナルホス	13593-03-8	C12H15N2O3PS	146
トリアジメノール	55219-65-3	C14H18ClN3O2	112
メチダチオン	950-37-8	C6H11N2O4PS3	145
ブタクロール	23184-66-9	C17H26ClNO2	176
ディルドリン	60-57-1	C12H8Cl6O	79
イソプロチオラン	50512-35-1	C12H18O4S2	118
p,p'-DDE	72-55-9	C14H8Cl4	246
エンドリン	72-20-8	C12H8Cl6O	263
ミクロブタニル	88671-89-0	C15H17ClN4	179
p,p'-DDD	72-54-8	C14H10Cl4	235
o,p'-DDT	789-02-6	C14H9Cl5	235
エチオン	563-12-2	C9H22O4P2S4	231
p,p'-DDT	50-29-3	C14H9Cl5	235
イプロジオン	36734-19-7	C13H13Cl2N3O3	187
ホスメット	732-11-6	C11H12NO4PS2	160
ビフェントリン	82657-04-3	C23H22ClF3O2	181

フェンプロパトリン	64257-84-7	C22H23NO3	97
テトラジホン	116-29-0	C12H6Cl4O2S	159
ホサロン	2310-17-0	C12H15ClNO4PS2	182
シハロトリン(ラムダ)	68085-85-8	C23H19ClF3NO3	181
ベルメトリン I	52645-53-1	C21H20Cl2O3	183
ベルメトリン II	999046-03-6	C21H20Cl2O3	183
シベルメトリン I	52315-07-8	C22H19Cl2NO3	181
シベルメトリン II	65731-84-2	C22H19Cl2NO3	181
フェンバレレート	51630-58-1	C25H22ClNO3	167
デルタメトリン	52918-63-5	C22H19Br2NO3	181

* 内部標準

実験方法

実験は、5975C イナート MSD を搭載した Agilent 7890 ガスクロマトグラフおよび Agilent 7683 オートサンブラ (ALS) で実施しました。スプリット/スプリットレス注入口には、長寿命セブタム (部品番号 5183-4761) と、スプリットレス不活性化ライナ (部品番号 5181-3316) を取り付けました。化合物の分離は、Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート GC カラム (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) で行いました。抽出とクリーンアップは、Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キット (部品番号 5982-5650) および Bond Elut QuEChERS EN 分散 SPE キット (部品番号 5982-5156) で行いました。注入は、5 µL シリンジ (部品番号 5181-1273) を使用して行いました。機器の条件は先に示した通りです。

試薬

農業標準試料は全て Sigma-Aldrich (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。試薬および溶媒は全て HPLC または分析グレードを使用しました。

サンプル前処理

有機栽培された無農薬米は、地域のスーパーマーケットで購入しました。米は清潔なプラスチック袋に入れて、-20 °C で一晩冷凍しました。翌日、必要な量の冷凍米を取り出し、入念に混ぜ合わせました。可能な場合には粉碎時に乾燥米を追加しました。サンプルを完全に均質化するために、サンプルを入念に粉碎しました。最終サンプルに、目に見える米粒がないことを確認しました。

5 g (± 0.1g) の量の正確に均質化したサンプルを 50 mL 遠沈管に入れました。QC サンプルには、適切な QC スパイク溶液 100 µL を添加しました。対照ブランクを除くすべてのサンプルに 100 µL

の内部標準スパイク溶液を添加しました。遠沈管のキャップを閉めて 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌しました。

ディスペンサを使用して 5 mL の水を各遠沈管に添加し、30 分間放置しました。チューブのキャップを閉めてボルテックスミキサーで 1 分間攪拌しました。ディスペンサを使用してアセトニトリル 10 mL を各遠沈管に添加しました。遠沈管のキャップを閉めて手で 1 分間振り混ぜました。4 g の無水 MgSO₄、1 g の NaCl、1 g のクエン酸三ナトリウム、および 0.5 g のクエン酸二ナトリウム水和物を含む Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットを各遠沈管に直接添加しました。注入前に塩類のキットの袋を慎重に揉んで、塩の塊をほぐしました。遠沈管のスレッドやリムに粉末が残らないようにしました。遠沈管のキャップをしっかりと締め、手で 1 分間強く振り混ぜて、溶媒がサンプル全体とよく相互作用し、結晶の塊が十分に粉碎されるようにしました。サンプルチューブを 4,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

ACN 上清から 6 mL を Bond Elut QuEChERS EN 分散 SPE 15 mL チューブ (部品番号 5982-5156) に移しました。チューブのキャップをしっかりと閉めてボルテックスミキサーで 1 分間攪拌しました。標準的な遠心分離機でチューブを 5 分間 4,000 rpm で遠心分離しました。抽出液から 500 µL をオートサンブラバイアルに移し、GC/MS で分析しました。

表 2 に、QuEChERS EN サンプル前処理手順を示します。

表 2. Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出手順

- 1) 粉碎した米を 5 g 計量して 50 mL の遠沈管に入れ、5 mL の水を添加。
- 2) IS (内部標準) 溶液と、必要に応じて GC スパイク溶液を添加してから、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌。
- 3) 10 mL のアセトニトリルを添加し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌。
- 4) Bond Elut EN QuEChERS 抽出塩パッケージを添加。
- 5) キャップを閉めて、1 分間強く混合。
- 6) 4,000 rpm で 5 分間遠心分離。
- 7) ACN の上清 6 mL を Bond Elut EN 分散 SPE 15 mL チューブに移す。
- 8) 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌してから、4,000 rpm で 5 分間遠心分離。
- 9) 0.5 mL の抽出物をサンプルバイアルに移す。
- 10) GC-MS でサンプルを分析。

結果および考察

57 種類の農薬の 200 ng/mL でのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を図 1 に示します。これらの農薬には、有機塩素系、有機リン系、およびピレスロイド系の農薬が含まれます。図 1 は、Agilent J&W HP-5MS ウルトライナートキャピラリ GC カラムですべての対象農薬を良好に分離できることを示しています。

GC/MS システムでは、クロルピリホスメチルにリテンションタイムロッキング (RTL) を使用しました。各化合物のリテンションタイムを表 3 に示します。G1672AA GC および GC/MS RTL 農薬および内分泌攪乱物質データベースでは Agilent 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m HP-5ms が指定されていますが、HP-5ms ウルトライナートキャピラリ GC カラムは同じ寸法で HP5 ms の同じ選択性を示しました (表 3 を参照)。

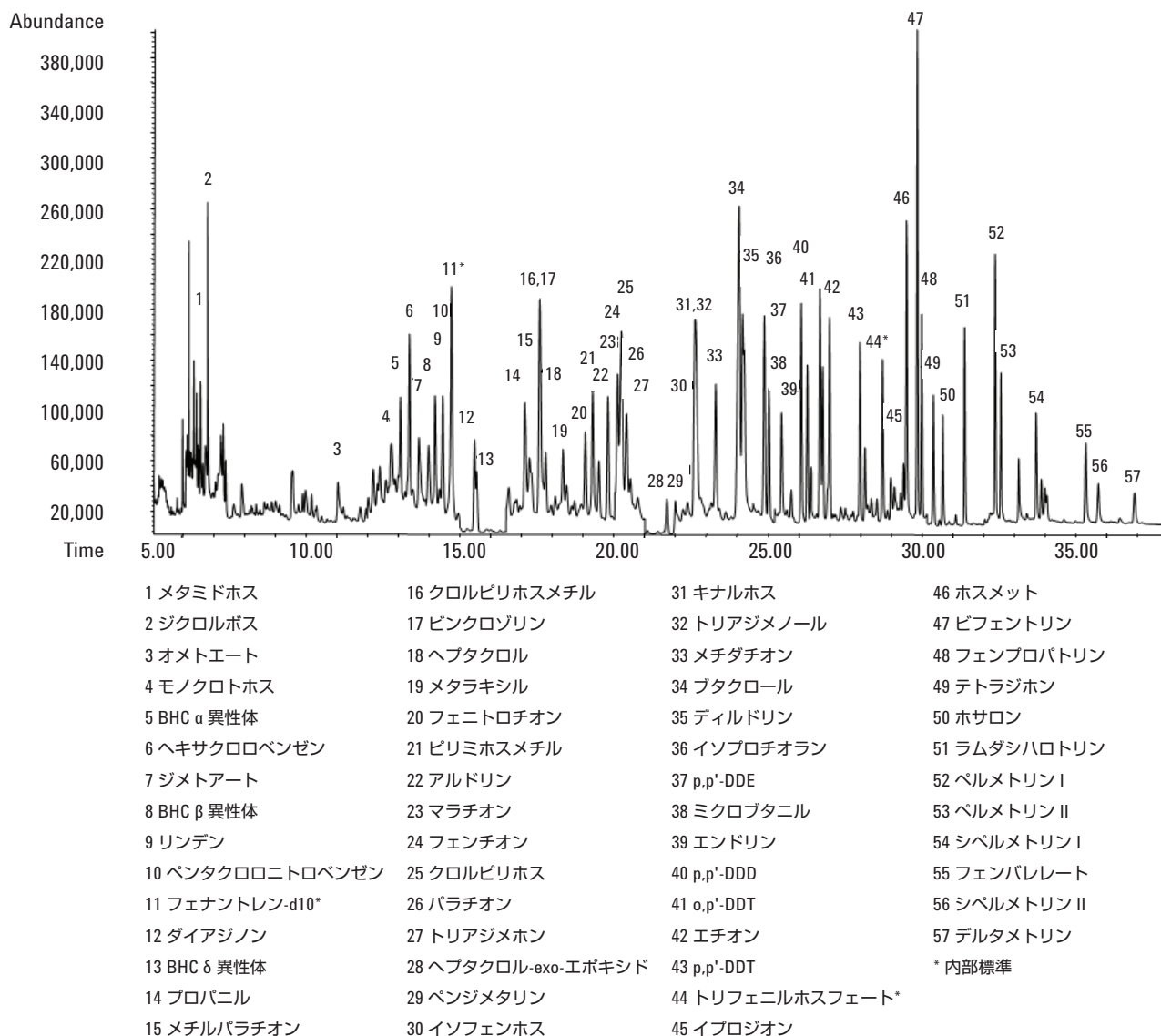


図 1. 200 ng/mL での農薬物質のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

米に含まれる対象農薬の直線性および回収率のテスト

直線性は、米のマトリクス溶液に標準物質をスパイクした試料から作成した検量線を使用して測定しました。検量線は、50、100、200、300、400 ng/L の濃度の標準試料を 1 μ L 注入することで取得したデータから作成しました。各標準溶液には、200 ng/mL の内部標準試料 (ISTD) が含まれます。対象のすべての農薬は、0.991 を超える相関係数 (R^2) で優れた直線性を示し、57 種類の農薬の平均 R^2 は 0.9990 でした。

サンプル前処理の前にさまざまなレベルの対象農薬を米にスパイクして、Bond Elut QuEChERS 抽出キットの精製効果を評価しました。米の抽出物と農薬標準物質をスパイクした抽出物の GC/MS TIC を図 2 に示します。農薬標準物質をスパイクしたサンプルは、サンプル前処理で説明した手順に従って処理しました。スパイクしたサンプルの回収率データを表 3 に示します。各スパイク濃度レベルで 5 回反復して試験を行いました。スパイク濃度レベルは 0.05、0.1、0.2 μ g/mL でした。ほとんどの農薬の回

収率は 80~110 % と良好な範囲にあり、平均相対標準偏差 (RSD) は 5.35 % でした。

結論

Agilent Bond Elut QuEChERS EN 抽出キットと分散 SPE キットは、米に残留する揮発性から半揮発性の代表的な農薬の精製と濃縮のためのシンプルで高速、効果的なメソッドを提供します。J&W HP-5ms ウルトライナートカラムと GC/MS により、分離と検出用の優れたメソッドが提供されます。Agilent DRS ソフトウェアと RTL 農薬ライブラリを使用して、55 種類の農薬を迅速かつ正確に同定および分析しました。米の不純物とマトリクスは、対象化合物の定量には干渉しませんでした。選択した農薬は幅広いクラスと特性を代表しているため、Agilent Bond Elut QuEChERS キットは同様の食品マトリクス中の他の農薬に対しても優れた選択肢となります。

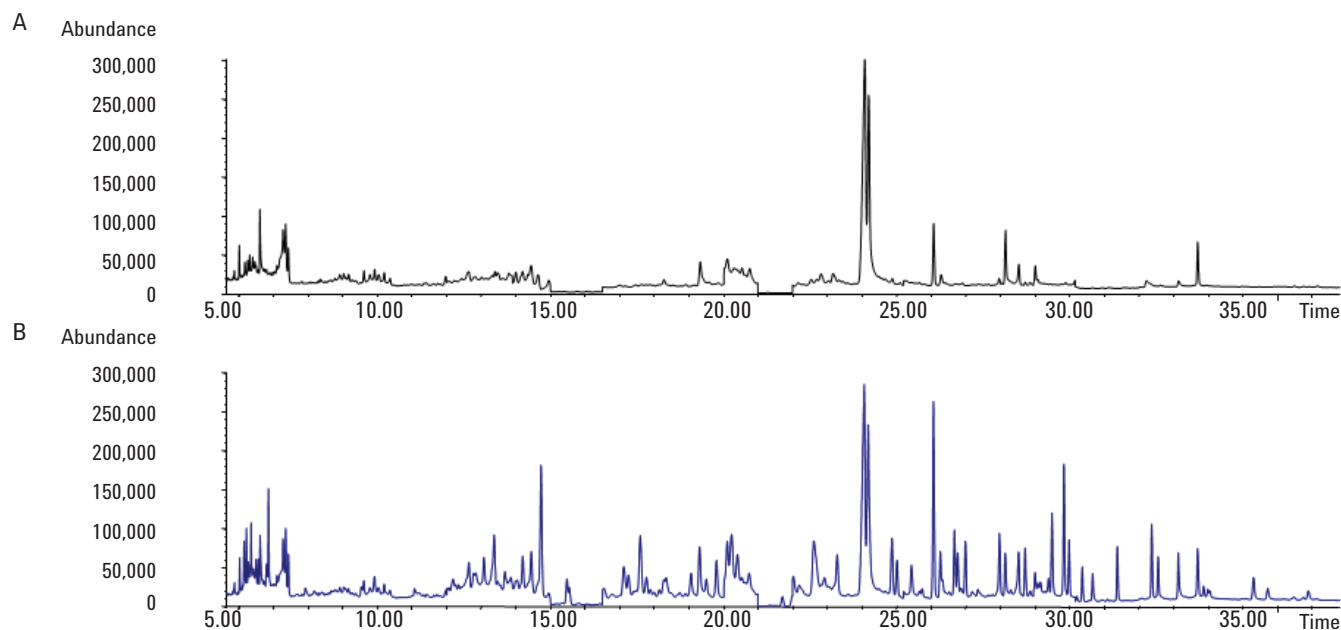


図 2. Agilent GC/MS システムと Agilent J&W HP-5MS ウルトライナート 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m カラムを使用した、米抽出物 (A) および農薬標準物質を 100 ng/mL の濃度でスパイクした米抽出物 (B) の TIC

表 3. 実サンプル中の 57 種類の農薬の回収率

化合物	リテンション タイム (分)	0.05 µg/mL (n = 5) 回収率 (%)	RSD%	0.10 µg/mL (n = 5) 回収率 (%)	RSD%	0.20 µg/mL (n = 5) 回収率 (%)	RSD%
メタミドホス	5.70	70.8	7.6	76.3	5.3	78.9	7.9
ジクロルボス	5.83	112.3	5.1	103.3	7.9	109.8	5.2
オメトエート	10.04	78.4	3.5	97.6	4.5	97.1	6.6
モノクロトホス	11.75	81.6	5.9	96.8	4.5	105.5	3.9
BHC α 異性体	12.08	103.4	6.5	94.7	9.3	112.0	3.3
ヘキサクロロベンゼン	12.37	100.5	2.1	99.3	3.4	92.3	2.0
ジメトアート	12.68	83.4	6.1	92.7	5.0	101.9	3.2
BHC β 異性体	13.21	95.0	6.0	100.9	7.2	87.5	6.2
リンデン	13.45	102.4	7.3	110.8	7.1	93.5	7.0
ペンタクロロニトロベンゼン	13.68	86.5	3.1	93.1	2.9	101.9	2.4
ダイアジノン	14.48	92.4	3.3	96.0	3.4	104.9	2.3
BHC δ 異性体	14.55	89.6	4.0	105.5	4.3	99.4	3.8
プロバニル	16.12	102.9	4.5	103.8	4.9	103.6	5.3
メチルパラチオン	16.59	87.5	7.7	102.8	7.4	103.2	3.2
クロルピリホスメチル	16.60	105.3	3.0	103.9	3.3	104.8	2.4
ピンクロゾリン	16.63	116.4	4.8	115.5	4.2	115.1	4.4
ヘブタクロル	16.79	102.8	1.6	96.6	3.9	96.9	3.2
メタラキシル	17.35	105.8	3.6	104.5	5.4	108.7	5.0
フェニトロチオン	18.08	81.9	2.7	92.7	6.7	106.9	4.2
ピリミホスメチル	18.31	108.9	2.7	107.3	3.2	107.8	3.4
アルドリン	18.51	106.0	2.3	105.0	3.5	99.9	1.4
マラチオン	18.81	97.6	5.0	95.1	7.4	111.8	3.3
フェンチオン	19.12	105.2	2.5	102.8	4.1	104.4	2.2
クロルピリホス	19.24	105.3	2.5	104.7	3.1	102.4	4.0
パラチオン	19.27	72.8	4.6	77.6	7.3	112.9	3.3
トリアジメホン	19.40	99.9	6.2	93.3	7.0	102.5	4.0
ヘブタクロル-exo-エボキシド	20.71	106.6	4.7	97.7	4.0	100.3	2.1
ベンジメタリン	20.99	117.8	4.6	92.0	4.6	102.5	2.6
イソフェンホス	21.60	109.2	5.8	102.2	8.2	106.9	3.9
キナルホス	21.64	111.0	6.0	110.3	7.8	105.7	4.1
トリアジメノール	21.71	96.6	6.2	107.3	6.4	92.0	9.4
メチダチオン	22.29	94.9	8.9	95.3	9.5	111.9	4.2
ブタクロール	23.23	117.6	5.8	110.2	8.5	102.9	3.6
ディルドリン	23.85	112.3	5.0	112.4	6.7	105.5	4.7
イソプロチオラン	23.88	123.7	3.9	100.5	6.6	108.5	2.4
p,p'-DDE	24.02	100.7	4.4	100.8	5.3	104.5	2.8
ミクロブタニル	24.44	100.5	5.1	89.8	7.9	106.2	3.7
エンドリン	24.74	108.6	5.2	97.2	5.9	107.4	5.6
p,p'-DDD	25.67	98.2	5.9	99.6	6.6	102.1	5.9

o,p'-DDT	25.76	90.9	5.2	90.6	6.3	108.9	3.0
エチオン	25.99	89.9	5.4	86.9	8.3	111.6	5.5
p,p'-DDT	26.98	87.0	5.8	88.6	7.4	106.0	3.4
イブロジオン	28.39	99.6	5.5	108.6	5.3	98.9	6.2
ホスメット	28.49	91.7	6.0	96.0	8.8	99.6	5.5
ビフェントリン	28.84	104.8	5.0	104.2	7.9	108.5	7.1
フェンプロパトリン	28.98	106.2	6.0	109.0	8.1	104.7	4.6
テトラジホン	29.36	114.3	5.1	107.5	7.1	109.2	6.7
ホサロン	29.66	97.2	6.7	91.4	8.7	105.2	4.0
シハロトリン (ラムダ)	30.37	84.0	6.5	91.0	8.1	105.9	5.3
ベルメトリン I	31.37	98.2	8.1	97.6	7.6	103.3	4.3
ベルメトリン II	31.55	100.1	5.7	96.7	8.1	101.0	5.2
シベルメトリン I	32.70	89.3	7.7	102.9	9.3	104.4	5.2
フェンバレート	34.30	75.0	9.1	93.3	9.0	107.5	5.3
シベルメトリン II	34.71	86.4	8.5	97.2	8.6	100.1	7.7
デルタメトリン	35.88	67.3	8.4	87.6	8.6	95.4	4.9

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 2003, 86, 412-431.
2. S. J. Lehotay, 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, 615-629.
3. European Committee for Standardization/Technical committee CEN/TC 275 (2007), Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS method. European Committee for Standardization, Brussels.
4. P. Payá, M. Anastassiades, Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection, Anal Bioanal Chem., 2007, 389, 1697-1714.
5. V. Giarocco, B. Quimby, and M. Klee, “Retention Time Locking: Concepts and Applications,” Agilent Technologies, publication 5966-2469EN, www.agilent.com/chem.
6. Philip L. Wylie, 「926 種の農薬と内分泌攪乱物質の GC/MS スクリーニング」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-5076JAJP, www.agilent.com/chem/jp.

詳細情報

本資料のデータは標準的な結果を表しています。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., 2011
Printed in Japan
May 16, 2011
5990-8108JAJP



Agilent Technologies