

複雑なマトリックス: 脂質を最小限に、回収率を最大限に

食品分析アプリケーション集: 第3巻



複雑なサンプルでも簡単に分析

高感度分析の実現のためには、マトリックス干渉を低減しなければなりません。
食品サンプルに対して複数の種類の多成分残留分析を実施する場合にはなおさらです。

最新の SPE、ろ過、QuEChERS サンプル前処理法を適用して、 複雑なサンプル中の干渉を最小限に抑制

効果的なサンプル前処理により、目的の分析対象物に影響を及ぼすことなく干渉を
選択的に取り除くことができます。そのため、以下のような利点を得られます。

- 結果の再現性とデータ真度の向上
 - ばらつきやエラーの低減
 - サンプル由来による機器メンテナンスの削減により、時間とリソースを節約
- さらに、サンプル前処理工程を標準化することで、ラボの生産性が向上します。



本書の内容

このアプリケーション集では、高脂質製品、魚、肉、乳製品などの分析困難な食品サンプルマトリックスに関する既存のアプリケーションと新規のアプリケーションをご覧いただけます。通常どおり、アジレントの製品やアプリケーションのエキスパートが、お客様の生産性と分析対象物の回収率の最大化のお手伝いをいたします。

食品分析に役立つサンプル前処理法

食品分析アプリケーションにおけるサンプル前処理は、必要なステップ数が多いために、時間がかかりエラーを起こしがちなものとして長い間認識されてきました。従来、目的の分析対象物は SPE 充填剤によって選択的に保持され、他のマトリックスコンポーネントが押し流されてから、目的の分析対象物が溶出されます。

分析を繰り返す必要性を低減し、結果を悪化させる可能性のある干渉を最低限に抑えるために、アジレントは食品分析アプリケーション集シリーズを作成しました。

第 1 巻: 食品分析で用いられる SPE 手法

サンプル前処理の予算、メソッドに必要な堅牢性、必須の選択性や感度のバランスをとることによって、適切なレベルのクリーンアップを達成することができます。

第 2 巻: QuEChERS 法

食品サンプルの複数種類の多成分残留分析の場合、QuEChERS 法を用いて、分析対象物の濃縮からマトリックス除去に焦点を切り替えることで、負担を大幅に軽減することができます。QuEChERS 法は現在のタンデム四重極技術とともに、業界全体で広く採用されています。

第 3 巻: Agilent Captiva EMR-Lipid

大量の脂肪/脂質を含む複雑なサンプルの場合、従来の QuEChERS 分散 SPE (dSPE) では、クリーンアップが不十分なため不正確な分析になってしまう可能性があります。Agilent EMR-Lipid は革新的な材料であり、主な脂質クラスをサンプルマトリックスから目的成分の損失なしに効率的に除去します。これはサイズ排除と疎水性相互作用という独自の組み合わせに基づいており、以下のフォーマットがあります。

- Bond Elut EMR-Lipid dSPE により、脂質の多いサンプルのための QuEChERS ワークフローを効率化することができます。
- Agilent Captiva EMR-Lipid では、「パススルー」クリーンアップワークフローが使用でき、サンプル前処理をさらに簡素化できます。

次ページ以降では、複雑な食品サンプルの前処理と分析における Agilent EMR-Lipid の使用に関するアプリケーションノートを紹介합니다。



食品品質の向上

アジレントの食品分析ワークフローにより、受入検査、新製品開発、包装など、食品製造チェーン全体にわたって一貫した品質を確保することが可能になります。

前処理

SPE products

Agilent Bond Elut SPE 製品は複雑なマトリックスから干渉物質を選択的に除去することができ、それぞれ機能性の異なる 40 種類以上の充填剤を 30 種類以上の形式からお選びいただけます。

QuEChERS

Bond Elut QuEChERS 抽出および SPE キットにより、さまざまな食品サンプルを簡単にクリーンアップすることができます。

Captiva EMR-Lipid

Captiva EMR-Lipid パススルー型クリーンアップカートリッジを用いることで、汚れたサンプルのクリーンアップの時間を短縮でき、精度が向上します。



分析

アジレントソリューションにより、混入異物を特定し、成分を認定して、製品品質を保証します。

複数ターゲットスクリーニング: Agilent 6400 シリーズトリプル四重極 LC/MS および 7000C QQQ GC/MS

ノンターゲット分析: Agilent 6500 シリーズ LC/Q-TOF および 7250 GC/Q-TOF

カラムと消耗品: Agilent J&W Ultra Inert GC カラムおよび InfinityLab Poroshell 120 LC カラムにより、検出下限がさらに向上し、より正確なデータが得られます。



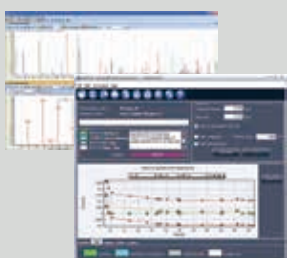
結果

MassHunter ワークステーション

高品質 MS データを生成し、そのデータをターゲット化合物および未知化合物の同定と定量に使用できます。

OpenLab

ライフサイクル全体を通じて、データの事業価値を最大限に高めます。



目次

インタラクティブファイルをご利用の場合: タイトルをクリックすると、該当ページに移動できます。

アプリケーションノート集内の語句を検索するには、検索ボタンをクリックし、Acrobat の検索ウィンドウを開きます。



農薬分析	6
Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS によるアボカド中の農薬残留物の分析	7
Agilent Bond Elut EMR-Lipid と GC/MS/MS によるアボカド中の残留農薬の分析	19
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	35
動物用医薬品分析	45
Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS によるウシ肝臓中の残留動物用医薬品の多成分同時分析	46
Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジクリーンアップおよび LC/MS/MS を用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析	64
Bond Elut QuEChERS dSPE EMR-Lipid と Poroshell 120 による豚肉中のマクロライド系抗生物質分析	76
マイコトキシン分析	82
EMR Lipid を用いた LC/MS/MS による乳児用調合乳中のアフラトキシン分析	83
Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップおよび LC/MS/MS を用いたチーズ中の複数の種類のマイコトキシンの分析	93
PAH 分析	101
Enhanced Matrix Removal (EMR) を使用したサケのPAH 分析	102

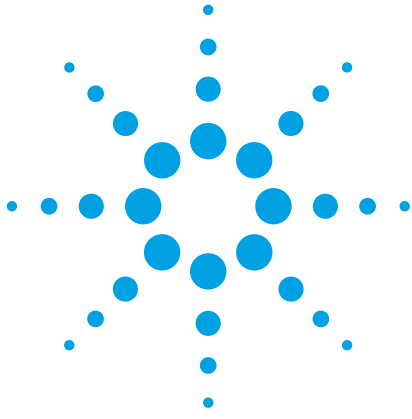
農薬分析



Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と
LC/MS/MS によるアボカド中の農薬残留物の分析

Agilent Bond Elut EMR Lipid と
GC/MS/MS によるアボカド中の残留農薬の分析

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



Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS による アボカド中の農薬残留物の分析

アプリケーションノート

食品検査・農業

著者

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

要約

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品で、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) で使用することにより、分析対象物の回収率に影響を与えずに、選択性の高いマトリックス除去を実現できます。今回の実験では、LC/MS/MS によるアボカド中の 44 マルチクラスの農薬の分析で、この新しい製品のアプリケーションを紹介します。手順は、QuEChERS AOAC 抽出、その後の EMR Lipid 分散キットおよび EMR Lipid 脱水キットを用いて、高速で効率的なサンプルクリーンアップを行いました。マトリックスクリーンアップについては、異なる dSPE クリーンアップ後にアボカド抽出からの非揮発性共溶出物の量を測定し、ターゲット化合物のクロマトグラフマトリックス効果を調べることによって評価しました。他のマトリックスクリーニング製品と比較すると、EMR Lipid dSPE では分析対象物の回収率に影響を与えずに、より効率的なマトリックスクリーンアップを実現できます。最適化されたメソッドは、LC/MS/MS によるアボカド中の LC で検査可能な 44 の農薬すべてに対して優れた真度と精度を提供します。EMR Lipid dSPE は使いやすく QuEChERS プロトコルに適しており、高脂質アボカドサンプルに含まれる農薬残留物の分析において高速かつ堅牢で効率的なサンプル前処理を実現します。



Agilent Technologies

はじめに

食品中の農薬残留物の分析は、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) メソッドを使用する多くのラボにとってルーチンワークとなっています [1, 2]。このメソッドを使用すると 1 回の抽出で低濃度の数百種類の農薬を分析できます。メソッドはさまざまな果物や野菜に対して適切に機能しますが、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課題を伴います [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。

分析では LC と GC を組み合わせて使用し、多数の農薬を一斉に分析し、揮発性、半揮発性、非揮発性の農薬に対応します [4]。多くの農薬は LC と GC の両方で検査できますが、一方で多くの農薬はいずれでも検査できません。それぞれの手法は、成分定量において固有の長所と短所を持ち、共溶出マトリックスから有害な作用を受けます。これらの共溶出物の除去は、複雑な食品マトリックス中での正確な定量にとって必須であり、C18、PSA、GCB などのマトリックス除去充填剤による処理が必要で [5]。ジルコニウムを含む他の材料は市販のもので、一般的なマトリックス除去充填剤と比べると脂質除去は概ね向上しています。しかし、すべての種類の脂質を除去ターゲットとしていない一方で、分析目的の成分を吸着してしまう場合があります [6, 7]。脂質含有量の高いサンプルでは、固相抽出カートリッジ (SPE) [7, 8, 9] またはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) [10] を使用したクリーンアップが必要となる場合もあり、時間とコストがさらにかかります。

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid は、最新の充填剤で、成分損失なしに主な脂質クラスをサンプルマトリックスから選択的に除去します。複雑なマトリックスからの脂質干渉の除去は、QuEChERS およびタンパク質沈殿などの手法では、大容量のマトリックスがターゲット化合物と共溶出するので特に重要です。今回の実験では、QuEChERS AOAC 抽出の後で EMR Lipid dSPE クリーンアップを使用して、アボカドに含まれる LC で検査可能な代表的な 44 の農薬を分析するためのサンプル前処理法を調査します。このアプリケーションノートに記載されていない成分についての効果を実証するために、これらの農薬は 12 の各種化学物質クラスから選択しました。表 1 は、LC で検査可能な農薬とクラスの一覧表です。こ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、44 の多様なクラスの農薬残留物に対して高い回収率と精度を示すことを 3 つのレベルに分けて紹介します。

表1. この実験で使用した LC で検査可能な農薬とそれに関連する化学物質クラス

代表的な農薬	化学物質クラス	農薬グループ
メタミドホス	有機リン	殺虫剤
アセフェート	有機リン	殺虫剤
オメトエート	有機リン	殺虫剤
ジメトエート	有機リン	殺虫剤
マラチオン	有機リン	殺虫剤
EPN	有機リン	殺虫剤
Tepp-A	有機リン	殺虫剤
モノクロトホス	有機リン	殺虫剤
メキサカルベート	カルバメート	殺虫剤
カルバリル	カルバメート	殺虫剤
プロボスキル	カルバメート	殺虫剤
カルボフラン	カルバメート	殺虫剤
メチオカルブ	カルバメート	殺虫剤
クロルプロファム	カルバメート	殺虫剤
プロファム	カルバメート	殺虫剤
アミノカルブ	カルバメート	殺虫剤
オキサミル	カルバメート	殺虫剤
メソミル	カルバメート	殺虫剤
アルジカルブ	カルバメート	殺虫剤
テルブチラジン	トリアジン	殺菌剤
シマジン	トリアジン	除草剤
セブチラジン	トリアジン	除草剤
モヌロン	尿素	除草剤
クロロトルロン	尿素	除草剤
ジウロン	尿素	除草剤
フルオメツロン	尿素	除草剤
イソプロツロン	尿素	除草剤
メトプロムロン	尿素	除草剤
シデュロン	尿素	除草剤
リニューロン	尿素	除草剤
ネブロン	尿素	除草剤
フェヌロン	尿素	除草剤
メトキスロン	尿素	除草剤
カルベンダジム	ベンズイミダゾール	殺菌剤
チアベンダゾール	ベンズイミダゾール	殺菌剤
チオファネートメチル	ベンズイミダゾール	殺菌剤
シプロジニル	アニリノピリミジン	殺菌剤
イマザリル	イミダゾール	殺菌剤
ペンコナゾール	トリアゾール	殺菌剤
イミダクロプリド	ネオニコチノイド	殺虫剤
メタザクロル	クロロアセトアニリド	除草剤
2,4-D	クロロフェノキシ酸	除草剤
ジクロルプロップ	クロロフェノキシ酸	除草剤
ベンタゾン	未分類	除草剤

実験方法

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) から入手しました。農業標準および内部標準は Sigma-Aldrich および AccuStandard (ニューヘブン、コネチカット州、米国) 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 1 % AA を含むアセトニトリルを調製しました。標準原液および内部標準 (IS) 原液は 2.0 mg/mL の ACN またはメタノール中に一部の農業用に作成しました。残りの農業標準は市販の混合標準原液で、標準作業用溶液を調製するために直接使用しました。混合作業溶液は 25 µg/mL の ACN 溶液として調製しました。25 µg/mL の TPP IS 作業用溶液は ACN 溶液として調製しました。

機器

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 (SPEX、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)
- エッペンドルフ小型遠心管 (Brinkmann Instruments、ウエストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Vortexer およびマルチチューブ Vortexer (WWR、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 (WWR、サウスプレインフィールド、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 QuEChERS EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010) および Agilent Bond Elut for QuEChERS EMR Lipid 脱水キット (部品番号 5982-0101)

使用機器

分析には以下で構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプ (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付き Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンプラ (G4226A)、および Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン源と iFunnel 技術を搭載した Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムに連結します。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

機器条件

HPLC 条件

カラム:	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 150 mm、1.8 µm (部品番号 959759-902)、Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 UHPLC ガード、5 × 2.1 mm、1.8 µm (部品番号 821725-902)
移動相:	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液
流量:	0.3 mL/min
カラム温度:	35 °C
オートサンプラ温度:	4 °C
注入量:	3 µL
ニードル洗浄:	1:1:1:1、ACN:MeOH:IPA:H ₂ O と 0.2 % FA
グラジエント:	時間 (分) %B
	0 10
	15 95
	15.01 100
ストップタイム:	16 分
ポストタイム:	3 分

MS 条件

ポジティブ/ネガティブモード

ガス温度:	120 °C
ガス流量:	14 L/min
ネブライザ:	40 psi
シースガスヒーター:	400 °C
シースガス流量:	12 L/min
キャピラリー:	3,000 V
iFunnel パラメータ:	ポジティブ ネガティブ
高圧 RF:	100 V 90 V
低圧 RF:	70 V 60 V

分析に関連する MS MRM の条件を表 2 に示し、
典型的なクロマトグラムを図 1 に示します。

表 2. この実験で使用した LC トリプル四重極 MRM パラメータと農薬のリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	デルタ RT (分)	極性	プリカーサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	CE (v)
メタミドホス	1.83	2	ポジティブ	142	94.1	9
アミノカルブ	2.03	2	ポジティブ	209.1	137.2	24
アセフェート	2.13	2	ポジティブ	184	143	9
オメトエート	2.54	2	ポジティブ	214	124.9	17
カルベンダジム	3.40	2	ポジティブ	192.1	132	33
チアベンダゾール	3.89	2	ポジティブ	202	131.1	41
メキサカルベート	3.99	2	ポジティブ	223.1	151.1	20
オキサミル	4.24	2	ポジティブ	237.1	72	12
モノクロトホス	4.46	2	ポジティブ	224.1	127	10
メソミル	4.64	2	ポジティブ	163.1	106	4
フェヌロン	6.17	2	ポジティブ	165.1	72	20
イミダクロプリド	6.43	2	ポジティブ	256.1	209.1	13
ジメトエート	6.63	2	ポジティブ	230	199	5
TEPP-A	7.69	2	ポジティブ	291.1	179	20
アルジカルブ	7.87	2	ポジティブ	213.1	89.1	15
メトキシロン	7.89	2	ポジティブ	229	46.1	12
イマザリル	7.99	2	ポジティブ	297.1	158.9	25
シマジン	8.31	2	ポジティブ	202.1	132	22
モヌロン	8.37	2	ポジティブ	199.1	46.1	16
チオファネートメチル	8.95	2	ポジティブ	343.1	151.2	4
プロボスキル	9.15	2	ポジティブ	210.1	111.1	9
カルボフラン	9.30	2	ポジティブ	222.1	123.1	30
クロトトルロン	9.54	2	ポジティブ	213.1	72	20
ジウロン	9.65	2	ポジティブ	233	72.1	20
カルバリル	9.73	2	ポジティブ	202.1	145.1	9
ベンタゾン	9.73	2	ネガティブ	239	132	15
イソプロツロン	9.96	2	ポジティブ	207.1	46.1	20
2,3-D	10.06	2	ネガティブ	219	161	15
フルオメツロン	10.10	2	ポジティブ	233.1	72	16
メトプロムロン	10.48	2	ポジティブ	259	148	10
シプロジニル	10.53	2	ポジティブ	226.1	93.1	41
メタザクロル	10.71	2	ポジティブ	278.1	134.2	15
プロファミ	10.80	2	ポジティブ	180.1	138.1	4
テルブチラジン	10.98	2	ポジティブ	230.1	174.1	15
ジクロルプロップ	10.99	2	ネガティブ	233	161	10
シデュロン	11.26	2	ポジティブ	233.2	137.1	12
セブチラジン	11.47	2	ポジティブ	230.1	174.1	16
メチオカルブ	11.47	2	ポジティブ	226.1	169	4
リニュロン	11.69	2	ポジティブ	249	160.1	20
クロルプロファミ	12.53	2	ポジティブ	214.1	172	5
ペンコナゾール	12.76	2	ポジティブ	284.1	70	17
馬拉チオン	12.85	2	ポジティブ	331	126.9	5
ネブロン	13.29	2	ポジティブ	275.1	57.1	20
TPP (IS)	13.99	2	ポジティブ	327.1	51.1	80
EPN	14.96	2	ポジティブ	324.1	296.1	8

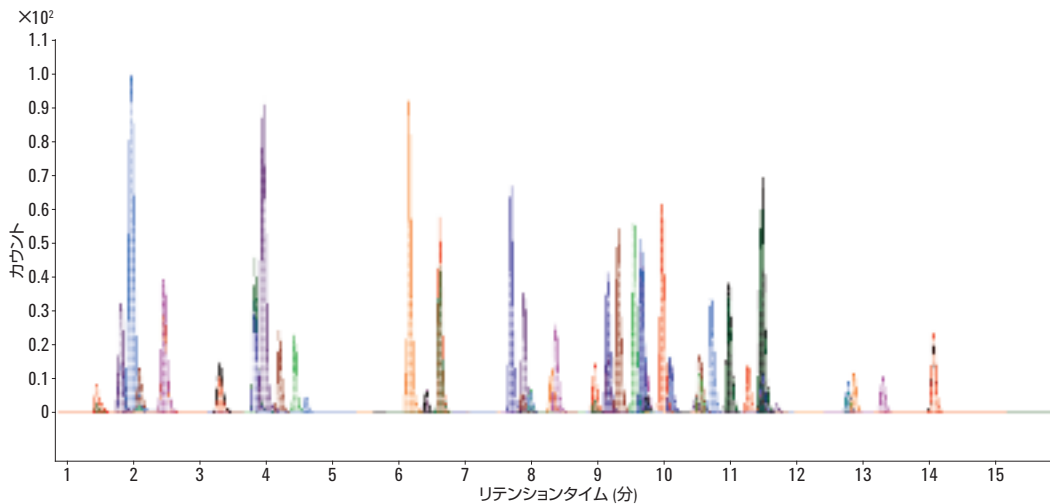


図 1. 50 ng/g の農薬を添加し QuEChERS で抽出した後、Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid でクリーンアップしたアボカドサンプルの典型的な LC/MS/MS クロマトグラム (MRM)

サンプル前処理

最終のサンプル前処理手順は、QuEChERS ワークフローと次のステップを使用して最適化されます。

1. ホモジナイズしたアボカド 15 g (± 0.1 g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
2. アセトニトリル (1% AA) 15 mL を加え 10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する
3. QuEChERS AOAC 抽出キットを 1 パッケージを加える
4. 振とう機で 2 分間混合する
5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
6. 水 5 mL を 15 mL EMR Lipid 分散キットに加える
7. 上澄み 5 mL を EMR Lipid 分散キットに移す
8. 直ちにボルテックスミキサーで攪拌してサンプルを分散した後、さらに 60 秒間マルチチューブ Vortexer にかける
9. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
10. 上澄み 5 mL を塩 (1:4、NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL EMR Lipid 脱水キットに移し 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
11. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
12. ACN 層の上部 200 μ L と水 800 μ L を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで攪拌する

LC/MS/MS 分析用のサンプルの準備が完了します。図 2 にサンプル前処理法の流路を示します。

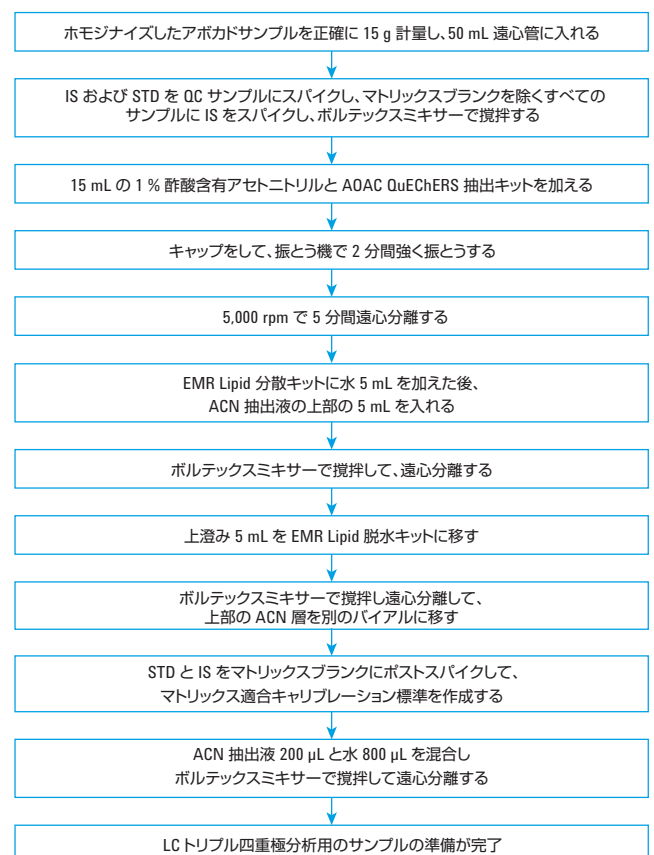


図 2. アボカド中の農薬の分析のための Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid を使用したサンプル前処理手順

キャリブレーション標準と品質管理サンプル

混合標準作業用溶液を相当量プレスパイクした QC サンプルを作成し、ステップ 1 以降を 6 回繰り返しました。QC サンプルはアボカド中の添加濃度 5、50、200 ng/g に相当します。IS 溶液をアボカド中の TPP 添加濃度 100 ng/g になるようにマトリックスブランク以外のすべてのサンプルにスパイクしました。

マトリックスキャリブレーションサンプルを標準および IS 作業用溶液を使用して調製しました。ステップ 10 以降のマトリックスブランクサンプル中の添加濃度が、1、5、10、50、100、150、200 ng/g と 100 ng/g IS (TPP) になるように作成しました。最終サンプル抽出液を水で希釈して、サンプルを LC/MS/MS グラジエントで分析できるようにし、早期の溶出成分に対してピーク形状の完全性を維持します。LC/MS/MS システムは、記載されているように必要な検出下限に適合する最終希釈液を使用して優れた感度を実現しました。サンプル希釈によって機器の感度より濃度が低くなってしまう場合は、理想的ではありませんが、サンプル濃縮ステップ (蒸発と再溶解) を検討する必要があります。

共溶出量の測定

共溶出の量を、C18/PSA、ジルコニア充填剤、EMR Lipid の 3 つの異なるクリーンアップ手法の重量測定法 [2] によって求めました。データを 2 回同じ方法で収集するためにサンプルは次のようにして調製しました。

1. ガラスチューブを約 1 時間以内 110 °C で加熱し湿気を除去する
2. チューブを室温まで冷やす
3. テストチューブの質量をあらかじめ計る
4. 初期マトリックスブランク抽出物 (クリーンアップなし) 1 mL とさまざまなクリーンアップありのマトリックスブランクをそれぞれ 2 回同じ方法で正確に移す
5. 濃縮遠心機を 50 °C にしてすべてのサンプルを 1 時間または乾燥するまで乾かす
6. 約 1 時間以内 110 °C でチューブを加熱し湿気を除去する
7. チューブを室温まで冷やす
8. チューブの質量をもう一度量る

ステップ 8 とステップ 3 の質量の差はサンプルの共溶出物の質量です。クリーンアップで除去された共溶出物の量はクリーンアップの前後のマトリックス共溶出物の平均質量差となります。

マトリックス効果の評価

さらに、成分応答 (ピーク面積) は、アボカド抽出液にポストスパイクした試料と同濃度で標準品を溶媒希釈した試料とで比較しました。ポストスパイクしたアボカド抽出液は、標準農薬溶液をブランクのアボカドマトリックス抽出液にポストスパイクすることによって、作成しました。応答の差 (ピーク面積) はマトリックス効果と直接関係します。

メソッドの比較およびバリデーション

現在、QuEChERS メソッドは、アボカドなどの高脂質サンプルでのクリーンアップ用に PSA、EC-C18、MgSO₄ を含む高脂質対応 dSPE を推奨しています。また、ジルコニア充填剤は、C18/PSA dSPE よりも脂質除去においてより効率的とされています。今回のメソッド比較では、EMR Lipid クリーンアップ手法と他のクリーンアップ手法に焦点を当てました。回収率データはアボカド中の 50 ng/g 相当のプレスパイクサンプルとポストスパイクサンプルを比較しました。抽出は AOAC QuEChERS 手順を実行し、次に EMR Lipid、C18/PSA dSPE、ジルコニア充填剤の各クリーンアッププロトコルにより dSPE を実行しました。EMR Lipid クリーンアップの場合、図 2 に示されたプロトコルに従いました。EMR Lipid dSPE は従来の dSPE 充填剤とは異なり、材料を活性化するために水を添加する必要がありますが、マトリックス除去性能が大幅に向上しています。EMR Lipid からの上澄みを EMR Lipid 脱水キットに移し、ACN/水を相分離し、溶解固形分を除去します。QuEChERS と C18/PSA およびジルコニアクリーンアップの場合は、未処理の ACN 抽出液 1 mL を高脂質対応の 2 mL dSPE チューブ (p/n 5982-5122) または 100 mg のジルコニア充填剤を含む 2 mL バイアルに移しました。次にサンプルを 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌して小型遠心機により 13,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄み 200 µL を水 800 µL を含むサンプルバイアルに移しました。C18/PSA dSPE およびジルコニア充填剤のクリーンアッププロトコルでは双方ともこの段階で沈殿物が生じ、サンプルを LC/MS/MS 分析の前に再生セルロース 0.45 µm フィルタバイアルでろ過する必要があります。沈殿の原因は、高脂質対応の dSPE およびジルコニアクリーンアップでは除去されなかった脂質によるものと考えられます。EMR Lipid による未処理の抽出液クリーンアップのケースではこの沈殿はなく、希釈することにより沈殿のない透明な溶液を得ることができました。このため、ろ過は必要ありませんでした。マトリックスキャリブレーションサンプルを調製するために、対応するマトリックスブランクでポストスパイクキャリブラントを作成することは重要です。回収率は、プレスパイクサンプルとポストスパイクサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

EMR Lipid メソッドは、アボカドで 5、50、200 ng/g の添加濃度レベルで 6 回、7 ポイントのマトリックス適合検量線を使用して分析することによって検証しました。定量には内部標準を使用し、データは真度と精度として報告しました。

結果と考察

共溶出の量

サンプルの共溶出物の重さを測定した結果を表 3 に示します。EMR Lipid dSPE が質量に関して最高のマトリックスクリーンアップ効果を実現していることは明らかです。

表 3. QuEChERS 抽出物およびさまざまなクリーンアップ方法によるアボカドの共溶出物の質量 (n = 2)

クリーンアップ手法	ACN 最終抽出 1 mL あたりの 共溶出物 (mg)	クリーンアップに よるマトリックス 共溶出物の除去効率 (%)
追加クリーンアップなし	14.7	-
EMR Lipid クリーンアップ	4.2	71.4
ジルコニアクリーンアップ	7.0	52.4
C18/PSA クリーンアップ	9.5	35.4

マトリックス共溶出の除去効率 (%)

$$\frac{(\text{クリーンアップなしでの共溶出の量} - \text{クリーンアップありでの共溶出の量})}{\text{クリーンアップなしでの共溶出の量}} \times 100$$

マトリックス効果の評価

マトリックス効果の評価のために、ポストスパイクマトリックスブランクと原液の希釈標準液との間の分析成分の応答を比較しました。共溶出された脂質の大部分は LC グラジエント (逆相、低~高 % 有機) の終わりに溶出するので、疎水性物質はサンプルマトリックスによって大きな影響をうけます。この効果は一般的にイオン抑制として知られ、分析成分の応答が低いことと相関します。C18/PSA とジルコニア充填剤では非効率なマトリックス脂質除去のために、きわめて多くのマトリックスイオン抑制が遅く溶出する化合物で観察されます。図 3 は EMR Lipid クリーンアップによるイオン抑制の低下の例として 3 つの化合物を示しています。3 つの農薬は、クロロプロファミ (Log P 3.6)、ペンコナゾール (Log P 3.7)、EPN (Log P 4.5) と Log P 値がかなり高い化合物です。Log P 値が高くなればなるほど、化合物はより疎水性が大きくなります。これらの農薬はマトリックス干渉、特に、脂質を原因とするイオン抑制は最大 80 % を示しています。つまり、C18/PSA dSPE およびジルコニア充填剤を使用して効果的に除去できなかったことを示しています。しかし、これらの化合物では、図 3 に示すように EMR Lipid ではほとんどマトリックス効果はありません。

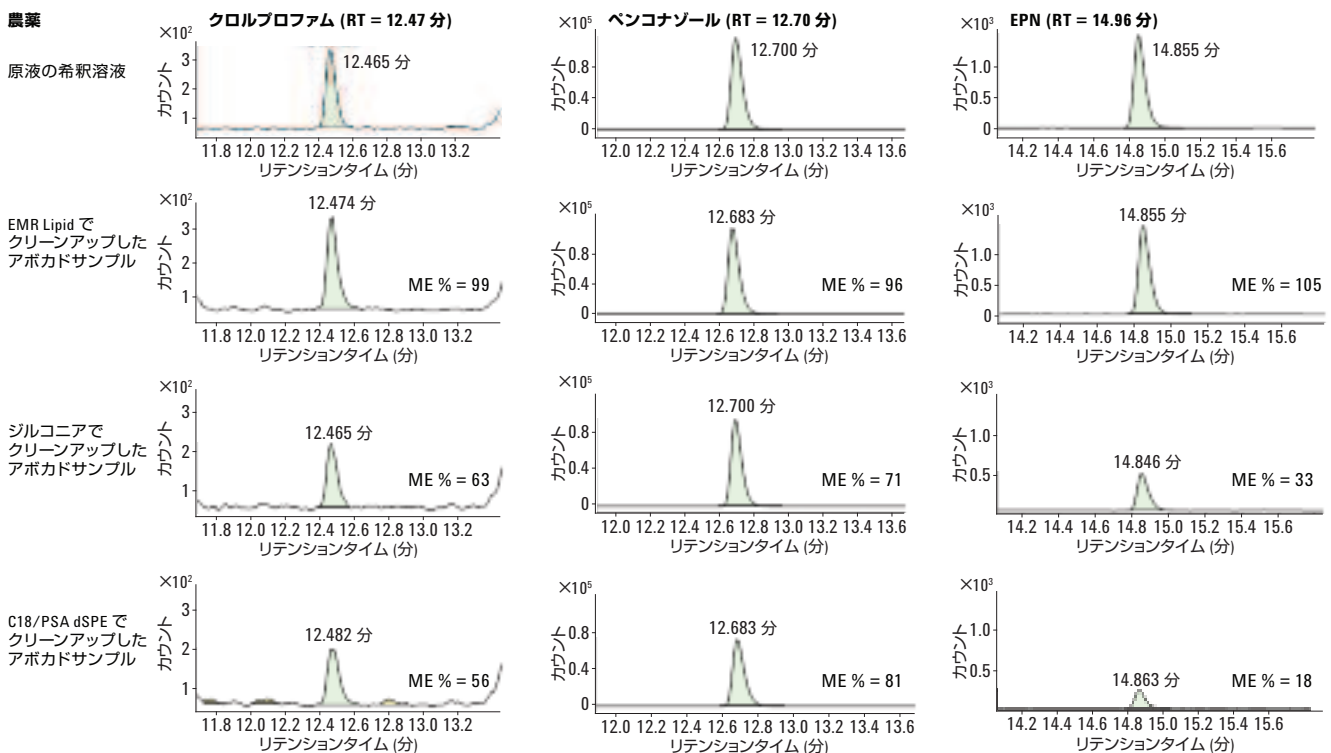


図 3. 疎水性物質でのマトリックス効果の比較マトリックスサンプルはマトリックスブランク内の農薬標準によって 50 ng/g でポストスパイクしました。

分析対象物の回収率についてのメソッドの比較

EMR Lipid dSPE クリーンアップによる最適化された QuEChERS メソッドを、C18/PSA および ジルコニア充填剤 dSPE クリーンアップによるものと比較します。図 4 は統計的に回収率を比較した結果を示しています。図 5 は問題のある分析対象物を選択して比較した結果です。

EMR Lipid は、ほとんどの農薬で全体的に優れた回収率と精度を示しました。2つの農薬についてのみ 70~120% の回収率枠から外れる値を示しました。これはシプロジニル (64%) および 2,4-D (65%) で RSD は 10% 未満でした。このため、SANCO のガイドライン [11] をベースとすると、許容可能な再現性基準に適合するため許容可能なものと考えられます。C18/PSA dSPE の回収率の結果は 2つの酸性化

合物を除くと良好でした。2,4-D およびジクロロプロップは PSA が原因で非常に低い回収率 (<10%) を示しました。ジルコニア充填剤の回収率の結果では分析対象化合物のより高い吸着性を示し、9つの農薬の回収率が 70% 未満でした。

メソッドバリデーション

全定量バッチを実行することによって、EMR Lipid プロトコルのバリデーションを行いました。手法はサンプル前処理法のセクションで説明しました。定量には内部標準 (TPP) を使用し、このため、定量結果は真度と精度として定義されます。しかし、IS (TPP) の絶対回収率は 90% を超えるため、真度の結果は絶対回収率に相当します。

表 4 に詳細なバリデーションの結果を示しています。QC プレスパイクを 3つの異なるレベルで合計 18 回繰り返した結果を基に計算した平均真度および精度を図 (図 6) にまとめました。真度の結果は、良好な RSD を示し 70% を少し下回る回収率を持つ 2,4-D、シプロジニルを除いて、44 の農薬のうちの 95% が 70~120% 枠に入ることが示されました。このメソッドの再現性は非常に優れており、RSD (n=6) が 10% 未満は 5 ng/g では農薬の 91%、50 ng/g では 100%、200 ng/g では 98% でした。EMR Lipid プロトコルを使用した場合のすべての他の RSD 値は 20% を大きく下回ります。機器検出下限 (IDL) は、より低いスパイクレベルで RSD が 10% 以上を示す化合物についてばらつきを大きくする原因にもなっているようです。緩衝液なしの EMR Lipid 脱水ステップ (NaCl、MgSO₄) もばらつきの原因になる可能性があり、緩衝液ありの脱水塩の場合を今後調べる必要があります。

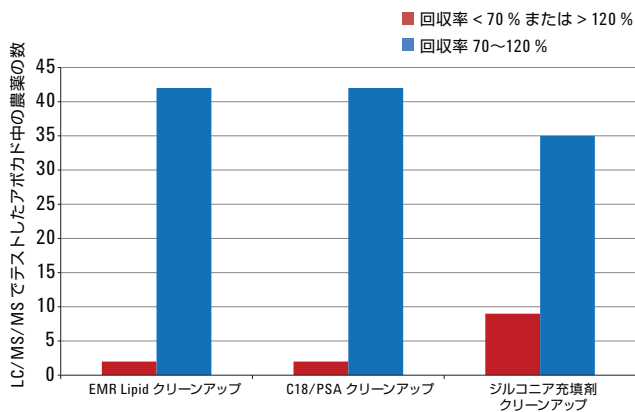


図 4. Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid、C18/PSA dSPE、ジルコニア充填剤の比較のための回収率の統計結果

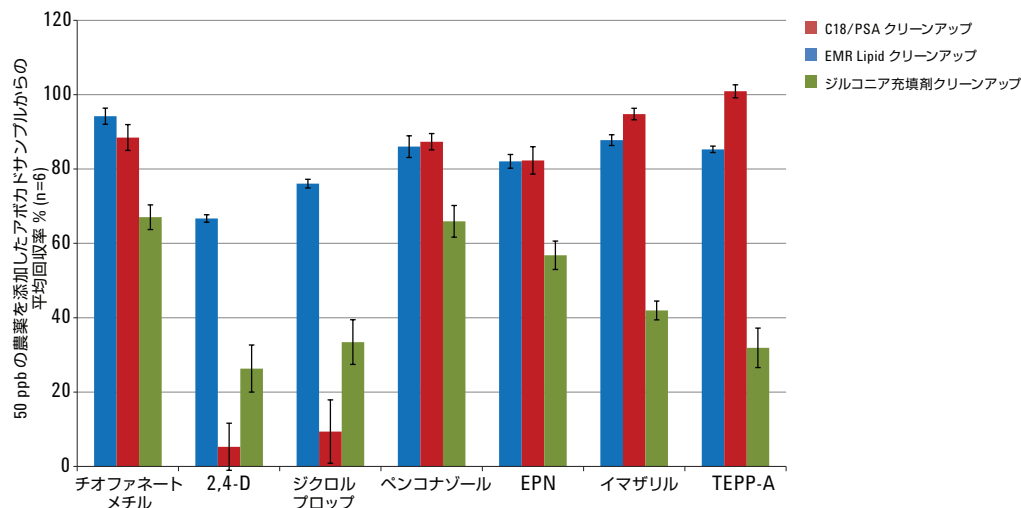


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid (青)、C18/PSA (赤)、ジルコニア充填剤 (緑) での dSPE クリーンアップの回収率の比較結果

表 4. アボカド中の 44 の農薬について 5、50、200 ng/g の各レベル (n = 6) での EMR Lipid プロトコルによるバリデーションの結果

帰属	検量線 適合/重み	R ²	キャリブレーションレンジ (ng/g)	メソッドの真度および精度					
				5 ng/g QCs		50 ng/g QCs		200 ng/g QCs	
				回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD
メタミドホス	二次曲線、1/x	0.9993	1-200	69.1	9.5	93.8	8.4	109.8	6.0
アミノカルブ	直線、1/x	0.9990	1-200	74.6	8.4	88.0	2.7	87.0	2.0
アセフェート	直線、1/x	0.9948	1-200	55.8	12.4	88.8	2.3	86.6	4.0
オメトエート	直線、1/x	0.9996	1-200	84.5	6.0	85.3	1.4	84.4	2.6
カルベンダジム	直線、1/x	0.9995	1-200	87.1	6.3	86.2	2.2	85.4	1.2
チアベンダゾール	直線、1/x	0.9995	1-200	49.4	24.3	76.7	1.7	79.0	2.0
メキサカルベート	直線、1/x	0.9993	1-200	83.6	7.8	90.4	3.3	89.0	2.1
オキサミル	直線、1/x	0.9991	1-200	81.1	7.6	96.7	2.6	94.4	3.5
モノクロトホス	直線、1/x	0.9979	1-200	85.2	6.1	85.1	1.9	101.5	4.6
メソミル	直線、1/x	0.9993	1-200	77.8	8.2	88.6	3.3	92.8	4.5
フェナロン	直線、1/x	0.9969	1-200	86.5	9.9	103.4	2.5	91.7	1.7
イミダクロプリド	直線、1/x	0.9996	1-200	81.7	5.9	94.1	2.6	87.9	2.5
ジメトエート	直線、1/x	0.9993	1-200	83.3	8.0	99.2	3.1	94.8	2.5
TEPP-A	直線、1/x	0.9989	1-200	50.2	6.5	88.3	1.6	78.4	3.1
アルジカルブ	直線、1/x	0.9989	1-200	88.6	5.6	101.2	3.5	76.2	1.9
メトキシロン	直線、1/x	0.9987	1-200	102.0	5.4	105.8	2.5	89.9	2.6
イマザリル	直線、1/x	0.9988	1-200	81.4	6.9	86.2	2.0	82.5	2.7
シマジン	直線、1/x	0.9984	1-200	91.8	5.4	93.8	1.9	85.4	1.6
モヌロン	直線、1/x	0.9990	1-200	82.5	9.9	96.0	3.7	88.4	1.8
チオファネートメチル	直線、1/x	0.9977	1-200	89.4	10.8	104.6	5.5	86.0	7.1
プロボスキル	直線、1/x	0.9993	1-200	84.7	8.1	97.6	1.4	94.5	2.2
カルボフラン	直線、1/x	0.9993	1-200	88.3	8.5	98.9	5.1	97.2	2.4
クロロトルロン	直線、1/x	0.9990	1-200	96.3	5.0	97.9	3.1	89.9	2.0
ジウロン	直線、1/x	0.9995	1-200	86.6	6.7	98.7	2.8	97.5	3.5
カルバリル	直線、1/x	0.9991	1-200	80.7	7.4	101.1	3.2	90.5	2.1
ベンタゾン	二次曲線、1/x	0.9993	1-200	111.2	5.5	102.3	4.7	97.4	7.9
イソプロツロン	直線、1/x	0.9993	1-200	98.7	4.1	98.9	2.3	92.1	2.6
2,3-D	直線、1/x	0.9985	1-200	64.3	7.6	65.4	5.1	65.6	2.6
フルオメツロン	直線、1/x	0.9975	1-200	86.2	5.7	87.8	3.9	88.0	3.0
メトプロムロン	直線、1/x	0.9977	1-200	96.0	6.6	100.3	4.6	92.4	4.5
シプロジニル	直線、1/x	0.9986	1-200	60.3	8.3	67.0	2.6	65.5	3.6
メタザクロル	直線、1/x	0.9992	1-200	99.8	5.7	99.4	3.4	94.3	2.8
プロファミ	直線、1/x	0.9985	1-200	85.8	9.7	89.3	3.8	87.0	3.8
テルブチラジン	直線、1/x	0.9993	1-200	90.7	6.5	91.1	2.6	85.8	2.0
ジクロルプロップ	直線、1/x	0.9992	1-200	75.6	9.7	73.3	4.6	76.9	2.3
シデュロン	直線、1/x	0.9990	1-200	90.2	8.6	92.4	3.5	91.5	2.2
セブチラジン	直線、1/x	0.9992	1-200	95.3	4.8	89.5	2.5	83.7	2.1
メチオカルブ	直線、1/x	0.9984	1-200	77.6	8.8	94.7	3.2	86.3	1.9
リニュロン	直線、1/x	0.9984	1-200	84.7	7.4	85.2	3.6	84.6	3.6
クロルプロファミ	直線、1/x	0.9994	5-200	91.6	10.0	84.3	9.3	81.1	3.8
ベンコナゾール	直線、1/x	0.9992	1-200	83.0	6.3	81.1	2.4	80.7	1.5
マラチオン	直線、1/x	0.9991	1-200	76.2	7.1	100.5	2.2	100.0	1.0
ネブロン	直線、1/x	0.9994	1-200	66.9	6.8	83.0	1.6	84.8	1.3
EPN	直線、1/x	0.9995	1-200	76.4	4.7	73.8	3.9	62.9	13.2

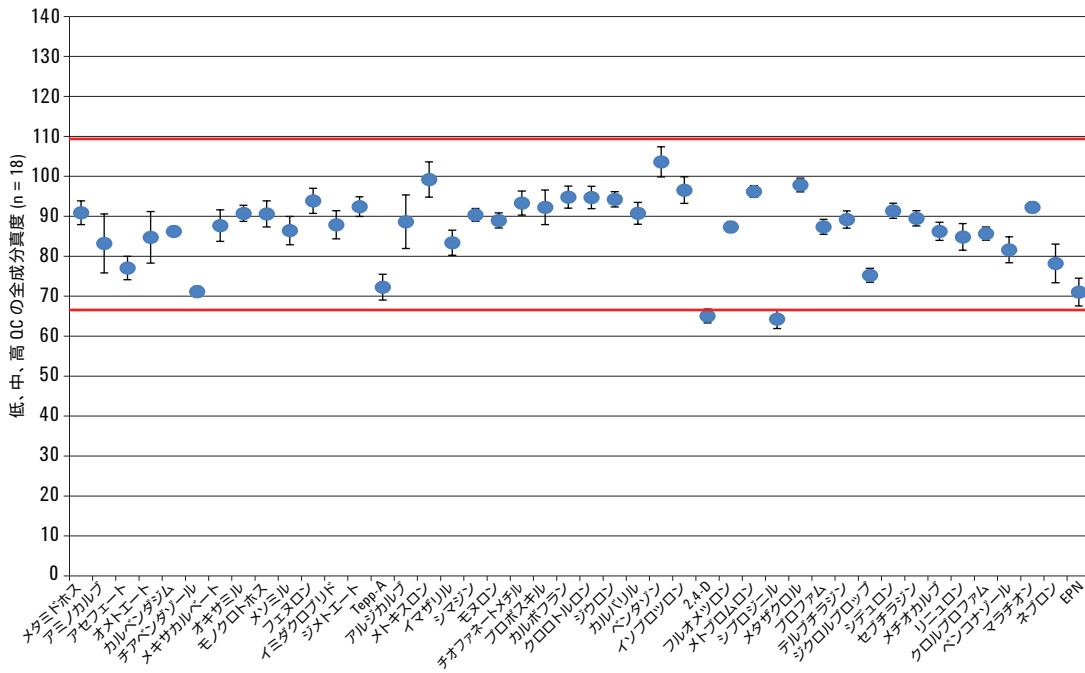


図 6. Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid ワークフローによるアボカド中の 44 の代表的な農薬の定量結果真度と精度のデータは、3 つの異なる濃度で合計 18 回繰り返した定量を基に計算されました。

結論

アボカドに含まれる LC で検査可能な 44 の農薬について、QuEChERS AOAC 抽出の後で Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE クリーンアップを使用する迅速で信頼性があり堅牢なメソッドを開発し検証しました。マトリックス効果を慎重に評価し、従来の C18/PSA dSPE およびジルコニア充填剤によるクリーンアップと比較しました。この結果、質量およびマトリックス効果から EMR Lipid は C18/PSA dSPE およびジルコニア充填剤よりも優れたマトリックスクリーンアップを提供することが示されました。分析対象物の回収率とメソッドの精度を、3 つの異なるクリーンアップ手法間で広範囲に比較しました。EMR Lipid クリーンアップは、劇的に少ない共溶出により、C18/PSA dSPE よりもかなり優れた分析対象物の回収率を提供します。EMR—Lipid と高脂質対応の dSPE クリーンアップは、ジルコニアの非選択的な成分相互作用のために、ジルコニア充填剤よりも大幅に優れた回収率を実現します。データから、EMR Lipid を使用すると、分析対象物の回収率に多大な影響を与えることなく、ほとんどのマトリックス、特に脂質を除去できることが示されました。

この実験は、EMR Lipid を dSPE 充填剤として QuEChERS ワークフローで使用して実現できる優れたクリーンアップを示しました。共溶出される脂質に対する充填剤の高い選択性により、脂質含有量やターゲット化合物のリストに関わらず、EMR Lipid は高脂質サンプルの分析に最適です。EMR Lipid は、アボカド中の農薬を定量するための高い回収率および精度、優れたマトリックス除去、使いやすさを実現します。複雑で高脂質のサンプルに含まれる残留物分析における活用が今後も期待されます。

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. J. *Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1–20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80–92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107–5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373–381.
11. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

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. 2015

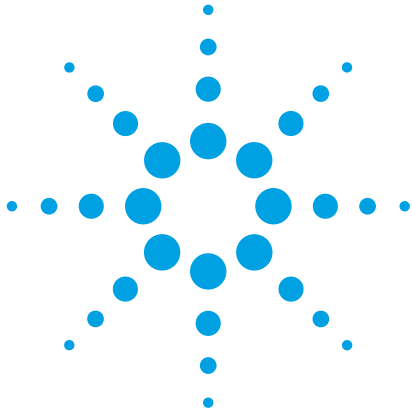
Printed in Japan

August 4, 2015

5991-6098JAJP



Agilent Technologies



Agilent Bond Elut EMR Lipid と GC/MS/MS によるアボカド中の 残留農薬の分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品で、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) で使用することにより、分析対象成分の回収率に影響を与えずに、選択性の高いマトリックス除去を実現できます。今回の実験では、GC/MS/MS を使用して、アボカドに含まれる GC で検査可能な 23 種類の農薬の分析にこの製品が適用できることを示しています。手順は、QuEChERS AOAC 抽出、その後の EMR Lipid 分散キットおよび脱水キットを使用します。EMR Lipid は、C18/PSA およびジルコニアベースの充填剤と比較して、質量、GC/MS フルスキャン、マトリックスの効果測定について非常に優れたマトリックス除去を実現しています。さらに、分析流路内に導入されるマトリックスの量も低減します。データは、C18/PSA や特にジルコニアと比較して、100 回の注入におよぶ分析でも再現性が非常に向上し、応答偏差が大きいことを示しています。EMR Lipid は脂質に対して非常に選択性が高く、分析対象成分の回収率を損ないません、分析対象成分の回収率は高く、精度も優れています。この実験は、EMR Lipid 分散キットが QuEChERS のワークフローに適しており、アボカド中の残留農薬分析で確実なマトリックスの除去を可能にし、迅速で堅牢、効率的なサンプル前処理が実現することを示すものです。



Agilent Technologies

はじめに

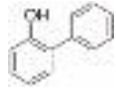
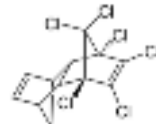
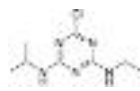
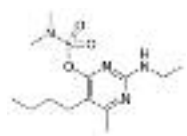
食品中の農薬残留物の分析は、QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) メソッドを使用する多くのラボにとってルーチンワークとなっています [1, 2]。このメソッドを使用すると 1 回の抽出で低濃度の数百種類の農薬を分析できます。メソッドはさまざまな果物や野菜に対して適切に機能しますが、アボカドやナッツなどの高脂質の食品および動物由来の食品に対しては課題を伴います [3, 4]。これらの課題に対処することは、食品の安全性を保証するために、政府機関が要求する厳しいバリデーション基準への適合を担うラボにとって最も優先するべきことです。

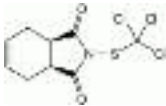
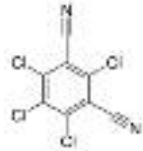
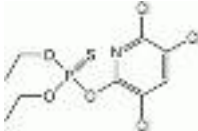
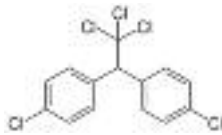
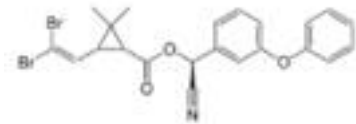
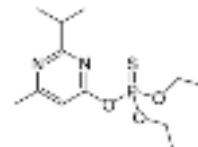
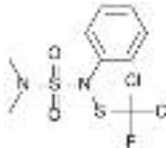
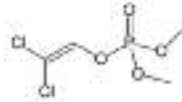
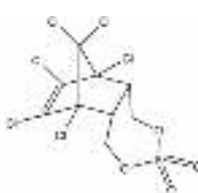
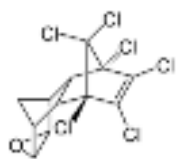
分析では LC と GC を組み合わせて使用し、多くのマルチクラス、複数残留物メソッドに関連する、揮発性、半揮発性、非揮発性の農薬に対応します [4]。多くの農薬は LC と GC の両方で検査できますが、一方で多くの農薬はいずれでも検査できません。それぞれの手法は、成分定量において固有の長所と短所を持ち、共溶出マトリックスから有害な作用を受けます。これらの共溶出物の除去は、複雑な食品マトリックス中での正確な定量にとって必須であり、C18、PSA、GCB などのマトリックス除去充填剤による処理が必要です [5]。ジルコニウムを含む他の材料は市販のもので、一般的なマトリックス除去充填剤と比べると脂質除去は概ね向上しています。しかし、すべての脂質クラスを除去ターゲットとしていない一方で、分析目

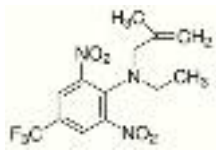
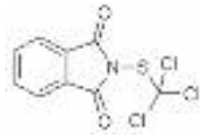
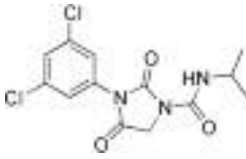
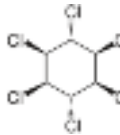
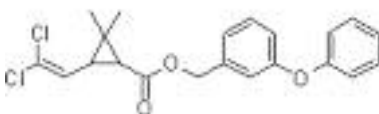
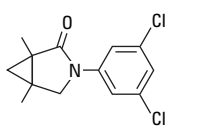

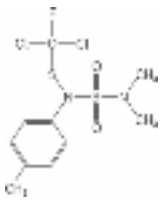
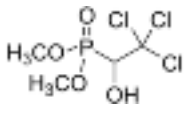
的の成分を除去してしまう場合があります [6, 7]。脂質含有量の高いサンプルでは、固相抽出カートリッジ (SPE) [7, 8, 9] またはゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) [10] を使用したクリーンアップが必要となる場合もあり、時間とコストがさらにかかります。

Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid は、最新の充填剤で、成分損失なしに主な脂質クラスをサンプル抽出物から選択的に除去します。複雑なマトリックスから脂質の干渉を除去することは、特に分析対象物質と同時に大量のマトリックスも抽出してしまう QuEChERS において非常に重要です。アボカドは、その脂質含有量の多さ (15~20 %) から難しいマトリックスとして知られています。そのため、今回は EMR Lipid の評価を目的として代表サンプルとして選択しました。この実験では、GC で検査できる 23 種類の農薬の分析でのサンプル前処理について、QuEChERS AOAC 抽出と EMR Lipid 分散キットおよび脱水キットの組み合わせを用いて調査します。適用範囲を広げるために、農薬は 10 種類の異なるクラス由来のものとし (表 1)。こ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量の多いサンプルに対して EMR Lipid が提供するきわめて優れたクリーンアップ性能と、23 種類のマルチクラスの農薬残留物に対して高い回収率と精度を示すことを 3 つのレベルも分けて実証します。

表 1. ターゲット化合物、クラス、Log P、水溶性、化学構造 [11]。

名前	カテゴリ	Log P	水への溶解度 (mg/L)	分子式	構造
2-フェニルフェノール	フェノール	3.18	560	C ₁₂ H ₁₀ O	
アルドリノ	有機塩素系	6.5	0.003	C ₁₂ H ₆ Cl ₆	
アトラジン	トリアジン	2.7	33	C ₆ H ₁₄ N ₅	
ピリメート	ピリミディノール	2.2	22	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	

名前	カテゴリ	Log P	水への溶解度 (mg/L)	分子式	構造
キャプタン	フタルイミド	2.5	5.1	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	
クロロタロニル	クロロニトリル	2.94	1.0	$C_8Cl_4N_2$	
クロルピリフォスメチル	有機リン系	4.0	2.74	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	
DDT	有機塩素系	6.91	0.006	$C_{14}H_9Cl_5$	
デルタメトリン	ピレスロイド	4.6	0.0002	$C_{22}H_{18}Br_2NO_3$	
ダイアジノン	有機リン系	3.69	60	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	
ジクロフルアニド	スルファミド	3.7	1.3	$C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$	
ジクロロボス	有機リン系	1.9	18,000	$C_4H_7Cl_2O_4P$	
硫酸エンドスルファン	有機塩素系	3.13	0.48	$C_9H_6Cl_6O_3S$	
エンドリン	有機塩素系	3.2	0.24	$C_{12}H_8Cl_6O$	

名前	カテゴリ	Log P	水への溶解度 (mg/L)	分子式	構造
エタルフルラリン	ジニトロアニリン	5.11	0.01	C ₁₃ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄	
フォルベット	フタルイミド	3.02	0.8	C ₉ H ₄ Cl ₃ NO ₂ S	
イプロジオン	ジカルボキシイミド	3.1	12.0	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃ O ₃	
リンデン	有機塩素系	3.5	8.52	C ₆ H ₆ Cl ₆	
ベルメトリン	ピレスロイド	6.1	0.006	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	
プロシミドン	ジカルボキシイミド	3.3	2.46	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	
スルホテップ	有機リン系	3.99	10	C ₈ H ₂₀ O ₅ P ₂ S ₂	
トリルフルアニド	スルファミド	3.9	0.9	C ₁₀ H ₁₃ C ₁₂ FN ₂ O ₂ S ₂	
トリクロルホン	有機リン系	0.43	120,000	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	

実験方法

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)、農薬標準試料、内部標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) 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、ACN 中 1 % 酢酸溶液を準備しました。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 µg/mL の ACN 溶液として調製しました (キャプタン、フォルペット、トリクロロホン、ブピリメートを除く)。これらの 4 つの化合物については機器に対する反応が比較的低いため、混合作業溶液中で 5 倍濃い濃度にするため 125 µg/mL で調製しました。ACN 中に調製した 25 µg/mL の混合 IS 作業溶液には、TPP、パラチオンエチル-D₁₀、¹³C-DDT が含まれます。

装置

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 (SPEX、メアチェン、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)
- エッペンドルフ小型遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、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、サウスプレインフィールド、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 QuEChERS EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010) および Agilent Bond Elut for QuEChERS EMR Lipid 脱水キット (部品番号 5982-0101)

使用機器

分析は、Agilent 7890A GC と、Agilent 7693B オートサンブラおよび 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 [12]。標準をスパイクしたサンプルの分析時間の合計は 23 分、カラムバックフラッシュの時間は 2 分でした。

機器条件

GC 条件

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 ポスト注入溶媒 A (アセトニトリル) 洗浄 3 回 サンプルポンプ 3 台 ポスト注入溶媒 B (イソプロパノール) 洗浄 3 回
カラム:	Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート、 0.25 mm × 15 m、0.25 µm (p/n 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)
注入ロライナ:	Agilent ウルトライナートシングルテーパーブリットレスライナ、ウール入り (部品番号 5190-2293)
注入口:	マルチモード注入口でバ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
注入パルス圧力:	36 psi、0.75 分まで
スプリットベントへの パーズ流量:	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
昇温プログラム:	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
ポストラ:	300 °C で 2 分間
キャピラリー・フロー・ テクノロジー:	UltiMetal Plus パージ付 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
Aux EPC ガス:	パージ付き Ultimate ユニオンに配管されたヘリウム
ブリードライン:	外径 0.0625 インチ x 内径 0.010 インチ x 100 cm、 316SS チューブ、オープンの上部に配置
Aux 圧力:	測定時 4 psi、バックフラッシュ時 75 psi
カラム 1 の接続:	注入口とパージ付き Ultimate ユニオンの間
リストリクタ:	不活性フューズドシリカチューブ、 0.65 m × 0.15 mm (部品番号 160-7625-5)
カラム 1 の接続:	パージ付き Ultimate ユニオンと MSD の間
MSD の条件	
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
チューニングファイル:	Atune.u
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
コリジョンガスフロー:	He クエンチガス 2.35 mL/min、N2 コリジョンガス 1.5 mL/min
MS 分離能:	MS1 および MS2 は 1.2 u

分析対象成分ごとの MRM パラメータは、Agilent 農薬および環境汚染物質 MRM データベース (G9250AA) を用いて、容易に最適化されます。このデータベースには、1,070 種類を超える化合物の MS/MS 条件とリテンションタイムの情報が収められています [13]。表 2 に、

この実験で使用したターゲット化合物の MRM トランジションをまとめています。調査対象の 23 種類の農薬に対する標準的な GC/MS/MS クロマトグラムを例を図 1 に示しています。

表 2. GC/MS/MS MRM 条件および農薬分析に対するリテンションタイム

分析対象成分	RT (分)	MRM			
		定量チャンネル	CE (V)	定性チャンネル	CE (V)
ジクロルボス	4.70	184.9 → 93	10	109 → 79	5
トリクロルホン	5.94	110.8 → 47	30	81.8 → 47	50
2-フェニルフェノール	6.39	169 → 115.1	25	170 → 141.1	25
エタルフルラリン	7.58	275.9 → 202.1	15	315.9 → 275.9	10
スルホテップ	7.83	237.8 → 145.9	10	201.8 → 145.9	10
アトラジン	8.69	214.9 → 58.1	10	214.9 → 200.2	5
リンデン	8.83	181 → 145	15	216.9 → 181	5
クロクタロニル	9.20	263.8 → 168	25	265.8 → 231	20
ダイアジノン	9.22	137.1 → 54	20	199.1 → 93	20
クワリピリフォスメチル	10.30	285.9 → 92.9	20	124.9 → 47	15
ジクロフルアニド	11.31	223.9 → 123.1	20	123 → 77	20
アルドリン	11.55	262.9 → 192.9	35	254.9 → 220	35
パラチオンエチル D ₁₀ (IS)	11.96	98.7 → 67	10	114.9 → 82.9	20
トリルフルアニド	12.80	136.9 → 91	20	136.9 → 65	30
キャプタン	12.96	151 → 79.1	15	149 → 79.1	10
フォルベット	13.13	259.8 → 130.1	15	261.8 → 130.1	15
プロシミドン	13.13	282.8 → 96	10	96 → 67.1	10
ピリメート	15.44	272.9 → 193.1	15	272.9 → 108	5
エンドリン	15.68	316.7 → 280.8	5	244.8 → 173	30
硫酸エンドスルファン	17.44	273.9 → 238.9	15	271.9 → 237	15
¹³ C-DDT (IS)	17.69	246.5 → 177.1	15	248.5 → 177.1	15
DDT	17.69	235 → 165.2	20	237 → 165.2	20
TPP (IS)	18.20	325.9 → 169	30	325.9 → 233	27
イブプロジオン	18.82	313.8 → 55.9	20	187 → 124	25
ベルメトリン	20.68	183.1 → 153.1	15	183.1 → 153.1	15
デルタメトリン	22.51	252.9 → 93	15	181 → 152.1	25

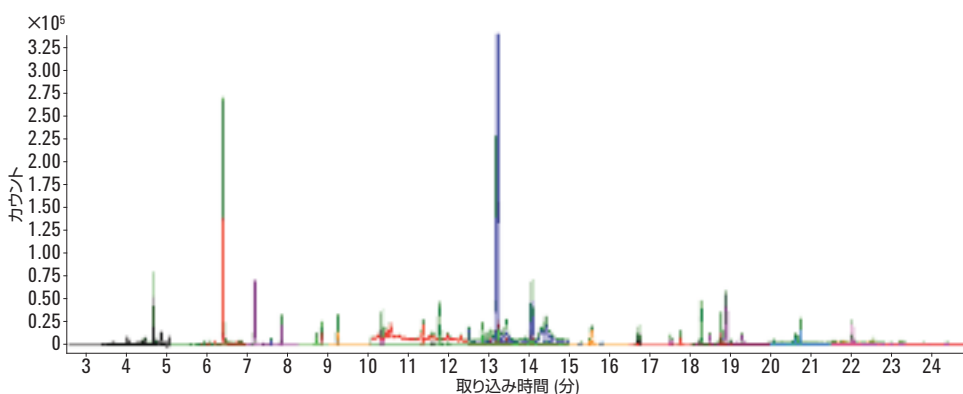


図 1. 農薬標準 50 ng/g を添加したアボカドサンプルの標準的な GC トリプル四重極クロマトグラム (MRM)。サンプル前処理は QuEChERS と Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップを組み合わせ実施

サンプル前処理

最終的なサンプル前処理手順は以下のように最適化しました。

1. ホモジナイズしたアボカド 15 g (±0.1 g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
 2. 15 mL のアセトニトリル (1% AA) を加え 10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する
 3. AOAC 抽出 QuEChERS キット (P/N 5982-5755) を加える
 4. 振とう機で 2 分間混合する
 5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
 6. 水 5 mL を 15 mL の EMR Lipid 分散キットに加え、上澄み 5 mL を EMR Lipid チューブに移す
 7. 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを攪拌した後、さらに 60 秒、Multitube Vortexer でバッチ全体をボルテックスミキサーで攪拌する
 8. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
 9. 上澄み 5 mL を、塩 (1:4、NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL の EMR Lipid 脱水キットに移し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
 10. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
 11. 上澄みの ACN 層を GC/MS/MS 注入用のサンプルバイアルに移す
- サンプル前処理全体のワークフローを図 2 に示します。

キャリブレーション標準と品質管理サンプル

混合標準作業溶液を相当する濃度で添加し、プレススパイクした QC サンプルを作成してステップ 1 以降を 6 回繰り返しました。QC サンプルはアボカド中の 5、50、300 ng/g に相当する濃度の農薬を添加してあります。キャプタン、フォルペット、トリクロルホン、ピリメートに対する QC サンプルは 25、250、および 1,500 ng/g 相当のものを作成しました。IS 溶液をマトリックスブランク以外のすべてのサンプルにアボカド中の 250 ng/g に相当する濃度でスパイクしました。

標準および IS 分析溶液を使用して、ステップ 10 の後、マトリックスブランクサンプルに追加し、アボカド中の 1、5、10、50、100、200、300、および 400 ng/g と、250 ng/g IS に相当するマトリックスキャリブレーションサンプルを作成しました。4 つの農薬については、5、25、50、250、500、1,000、1,500、2,000 ng/g でマトリックスキャリブレーションサンプルを作成しました。

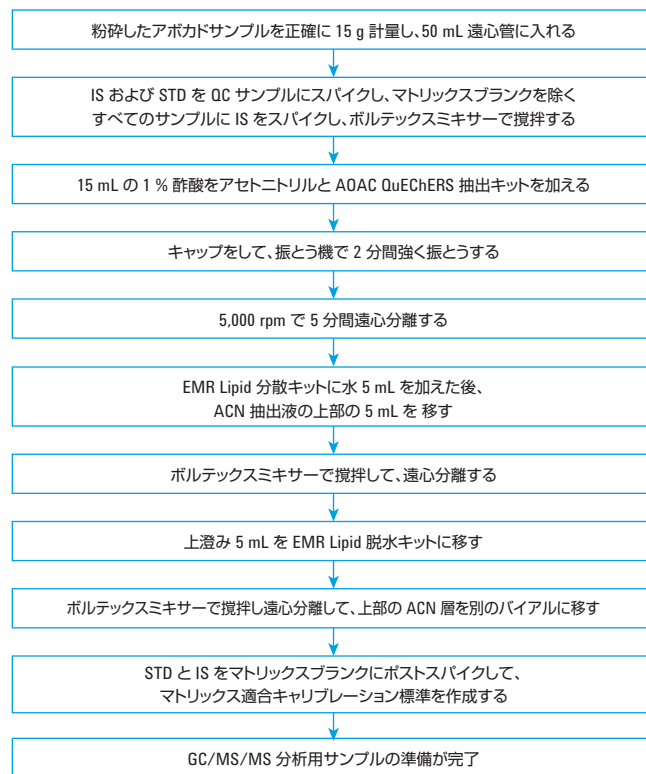


図 2. GC/MS/MS による、Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを用いたアボカド中の農薬分析のための QuEChERS 抽出を示すサンプル前処理ワークフロー

マトリックスクリーンアップの評価

アボカド抽出液を異なる 3 つのクリーンアップ材料、高脂質対応の dSPE (C18/PSA)、ジルコニア充填剤、EMR Lipid に適用しました。実験では、クリーンアップの前と後に最終抽出液の GC/MS フルスキャンプロファイルと比較しました。クロマトグラフバックグラウンドごとにマトリックスのクリーンアップ量を比較するためにクロマトグラムを重ね表示しました。マトリックスクリーンアップの効率を定量評価するために、GC/MS フルスキャンクロマトグラムを全体でマニユアル積分しました。マトリックス除去の効率については、方程式 1 に沿って計算しました。

$$\% \text{マトリックス除去} = \frac{\text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしないサンプル}} - \text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしたサンプル}}}{\text{総ピーク面積}_{\text{クリーンアップしないサンプル}}} \times 100$$

方程式 1

EMR Lipid、C18/PSA、ジルコニア充填剤による処理の後のアボカド抽出物の重量を比較する重量測定実験を公開しています [14]。

メソッドの比較およびバリデーション

分析対象成分の回収率実験では、アボカド中に 50 ng/g の濃度でポストスパイクおよびプレススパイクしたサンプルを比較しました。サンプルは QuEChERS AOAC 抽出手順に続き EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニアのクリーンアップを用いて処理しました。EMR Lipid クリーンアップの場合、図 2 に示されたプロトコルに従いました。C18/PSA とジルコニア充填剤の各クリーンアップについては、同じ QuEChERS 抽出手順を適用しました。続けて、未処理の ACN 抽出液 1 mL を 2 mL C18/PSA dSPE チューブ (部品番号 5982-5122) または 100 mg のジルコニア充填剤を含む 2 mL バイアルに移しました。すべてのサンプルを 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌して小型遠心機により 13,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。次に ACN 層を GC/MS/MS 分析用のサンプルバイアルに移しました。標準および内部標準をブランクのアボカド抽出にポストスパイクして、マトリックスキャリブレーションサンプルを調製しました。回収率は、プレススパイク済みサンプルとポストスパイク済みサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

EMR Lipid メソッドは、アボカドで 3 つのレベルで 6 回繰り返して、8 ポイントのマトリックス適合検量線を使用して検証しました。定量には内部標準 (IS) を使用し、データは真度と精度として報告しました。

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響を測定するために、複数回にわたるアボカドサンプルの注入における分析対象成分の結果の一貫性を評価しました。実験では、EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニア充填剤で処理したアボカド抽出物を複数回注入することで、GC/MS/MS 上の分析対象成分の結果を経時比較しました。各テストバッチにはマトリックスブランクおよびポストスパイクした 50 ppb QC サンプルを使用しました。シーケンスでは 4 回マトリックスブランクを注入した後 5 回目に QC サンプルを注入する操作を繰り返し、合計 100 回の注入を実施しました。これは、異なるクリーンアップオプションを使用することで、GC/MS 流路表面に蓄積される除去されないマトリックスが分析対象成分の機器反応に与える影響を特定するためのものです。各クリーンアップについて、分析対象成分反応 (ピーク面積) を使用して 100 回の注入における %RSD を計算しました。GC 流路の影響を排除するため、各クリーンアップメソッドに対し、Agilent イナートフローパス用消耗品に加え、新しい Agilent ウルトライナートライナおよびカラムを使用しました。

結果と考察

マトリックスクリーンアップの評価

複雑なマトリックスは GC/MS の性能に大きく影響を及ぼします。マトリックスが GC 流路の表面に活性点を形成し、質量分析計にマトリックス効果を誘発して、最終クロマトグラムに干渉をもたらすためです。GC/MS (SIM) および GC/MS/MS (MRM) では、ターゲットイオンに対する選択性の向上が認められますが、除去されないマトリックスは依然として干渉を引き起こし、時間と共に性能を低下させる場合があります。アボカドのような高脂質マトリックスによるこのような悪影響を是正するために、より徹底したサンプル前処理クリーンアップメソッドを適用して、GC/MS 分析に適したサンプルを作成する必要があります。

図 3A は、アボカドのマトリックスブランクの GC/MS フルスキャンクロマトグラムと、EMR Lipid、C18/PSA、およびジルコニアのクリーンアップメソッドで得たクロマトグラフプロファイルを重ね表示したものです。追加のクリーンアップを行わないサンプルのクロマトグラム (黒) ではマトリックス干渉が強いことが示されています。これはターゲット化合物の分析をする上で妨げとなります。C18/PSA (青) およびジルコニア充填剤 (緑) によるクリーンアップで処理した抽出物のクロマトグラムでは、それぞれ 36 %、55 % の効率でマトリックスが除去されています。これは方程式 1 の算出結果と一致します。一方、EMR Lipid トレース (赤) では、GC/MS フルスキャンクロマトグラムでこれらの干渉がベースライン近くまで除去されていることが示されています。これは 95 % のマトリックス除去に相当します。EMR Lipid の使用により大量のクリーンアップが成功したことで、アボカド中の農薬の分析に明確な影響が生じます。サンプル中のマトリックスが大幅に減少し、機器の性能に影響が及ぶからです。さらに、従来の QuEChERS ワークフローにおける単純な抽出と EMR Lipid の組み合わせによっても同様の結果が得られました。

図 3B は、農薬標準 50 ppb を添加したアボカドサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラムを重ね書きしたものを示しています。MS/MS システムの選択性が向上したため、GC/MS SIM またはフルスキャンクロマトグラムに比べマトリックスバックグラウンドの影響が小さくなります。C18/PSA (青) およびジルコニア (緑) については、分析対象成分に対する選択性が優れているにもかかわらず、クロマトグラム上の 11 分から 20 分の間で干渉ピークが残っていることがわかります。これらの干渉は、一部の分析対象成分の信号の正確な積分に影響を及ぼします。EMR Lipid 抽出では、図 3B の赤のトレースが示すようにバックグラウンドが大幅にクリーンアップされ、積分の真度が劇的に向上します。

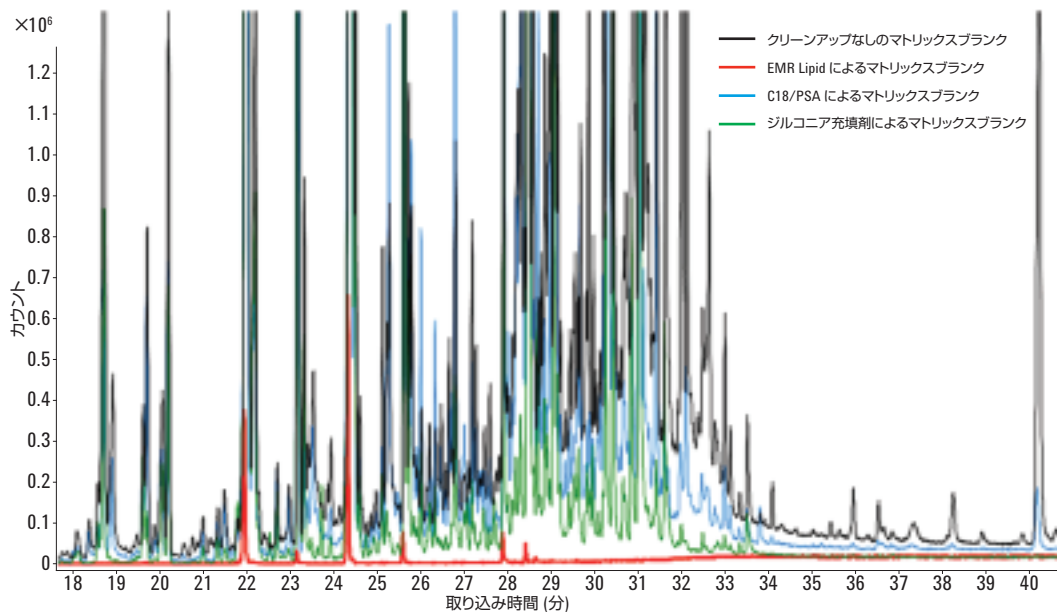


図 3A. QuEChERS AOAC 抽出後、Agilent Bond Elut EMR Lipid (赤)、ジルコニア (緑)、PSA/C18 (青)、クリーンアップなし (黒) で dSPE を実行して作成した、アボカドのマトリックスブランクの GC/MS フルスキャンクロマトグラムの重ね表示

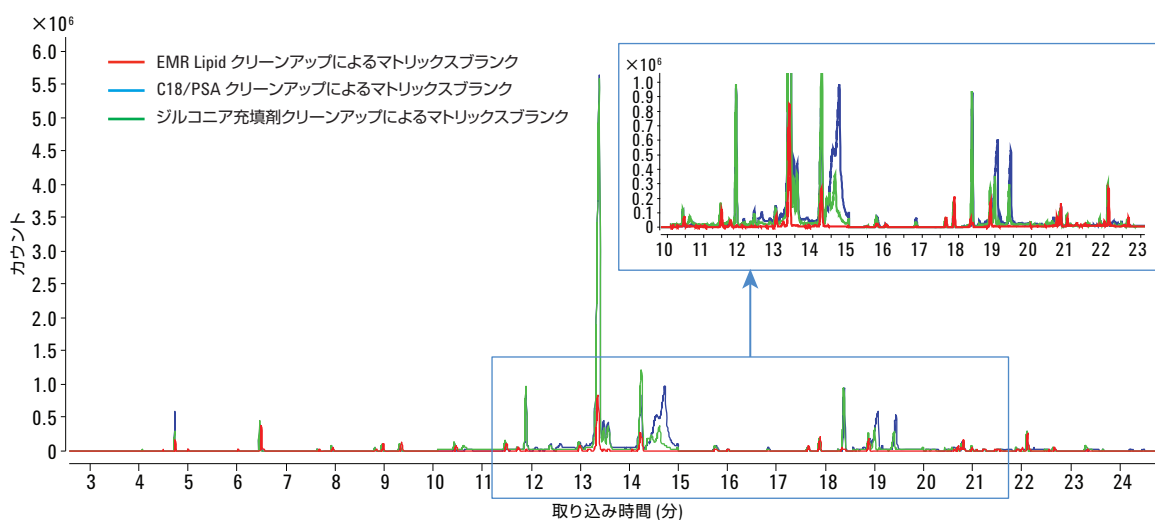


図 3B. QuEChERS AOAC 抽出後、Agilent Bond Elut EMR Lipid (赤)、C18/PSA (青)、ジルコニア充填剤 (緑) を使用して作成した、アボカドサンプルの GC/MS/MS MRM クロマトグラムの重ね表示。すべてのサンプルに農薬標準 50 ppb を添加

EMR Lipid のマトリックスクリーンアップの向上と、3 種類の分析対象成分に対する優れたマトリックス除去効果を図 4 で示しています。すべてのケースにおいて、EMR Lipid クリーンアップを使用したクロマトグラムでは干渉ピークが低減し、信号/ノイズ比が向上し、確実なベースライン積分が可能です。このような改善により、データの処理と確認が迅速化および簡素化され、分析メソッドにおいて高い信頼性が構築されます。

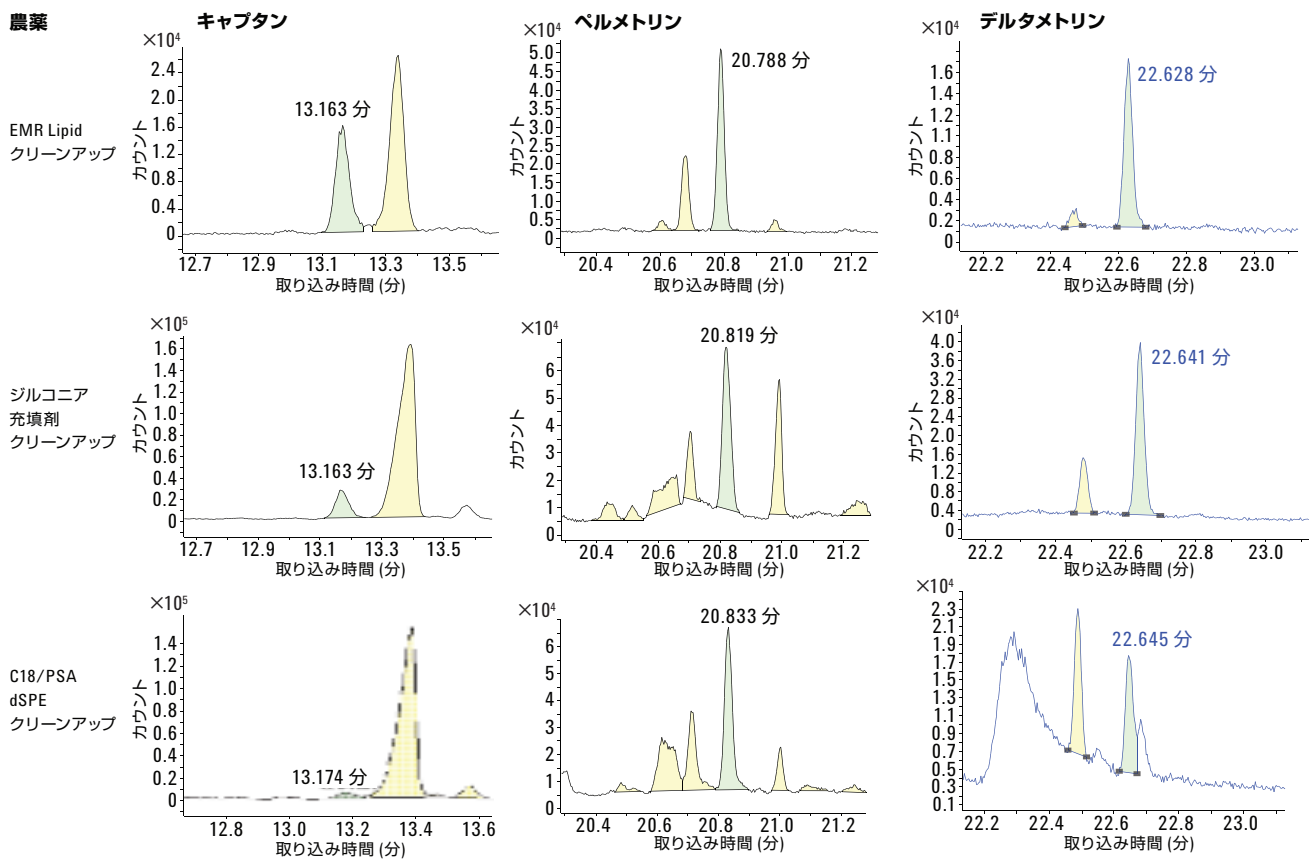


図 4. 分析対象成分と、MRM におけるマトリックスの影響を比較したクロマトグラム。

ブランクサンプルは Agilent Bond Elut EMR Lipid、ジルコニア、または PSA/C18 で処理し、最終サンプルには農薬標準 50 ppb をポストスパイク

分析対象成分の回収率についてのメソッドの比較

次に、最適化された EMR Lipid メソッドを、C18/PSA またはジルコニア充填剤を使用した従来の QuEChERS メソッドと比較しました。図 5 はこれらの異なるクリーンアップ方法を使用した 23 種類すべての農薬について回収率を比較したものです。結果は、EMR Lipid クリーンアップは分析対象成分の回収率の低下を引き起こさないため、C18/PSA クリーンアップと同等の回収率が得られることを示しています。しかし、すでに示したとおり C18/PSA およびジルコニア充填剤では、効率的にマトリックスを除去することはできません。

分析対象成分の一部には、クリーンアップメソッドに関係なく低い絶対回収率を示すものがあります。アルドリン、エンドリン、および DDT は回収率が 60 % を下回り、ペルメトリンとデルタメトリンの回収率はそれぞれ 63 %、75 % でした。C18/PSA クリーンアップの回収率は、EMR Lipid およびジルコニア充填剤での各クリーンアップに比べわずかに上回りました。これらの農薬は高い疎水性 (高 log P) と低い水溶性を備え、アボカドのような高脂質サンプルマトリックスに直ちに混和します。これはアセトニトリルのような極性溶媒による抽出を困難にします。強い溶媒を使用すれば、高脂質マトリックスからこれらの疎水性分析物を抽出する効率が向上し、絶対回収率も改善する可能性があります。高脂質マトリックスからの疎水性化合物抽出の効率と EMR については、今後研究の予定です。

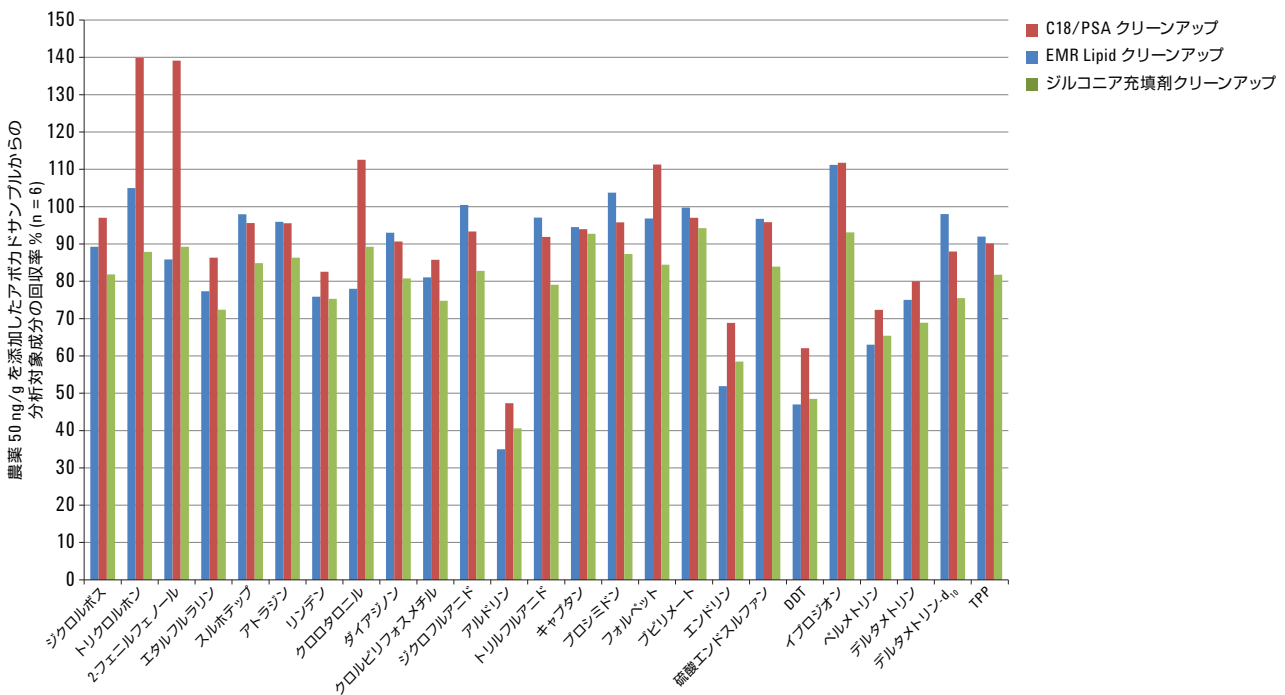


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid、C18/PSA、ジルコニアでの各クリーンアップ間における、アボカド中の 50 ppb 添加での回収率の比較

絶対回収率が低いこれらの化合物を補正するために、ラベル化された安定内部標準である ^{13}C -DDT を使用して、最終の定量結果における DDT、アルドリン、エンドリンの真度を改善しました。ペルメトリンとデルタメトリンの内部標準としては TPP の使用が定量に適していました。

メソッドバリデーション

完全な定量バッチを実行することで、EMR Lipid メソッドのバリデーションを行いました。定量には内部標準 (IS) を使用し、結果は真度と精度として報告しました。3 種類の内部標準 (パラチオンエチル- D_{10} 、 ^{13}C -DDT、TPP) を定量に使用しました。リテンションタイムが 12 分より短い対象分析物にはパラチオンエチル- D_{10} を、12 分より長い

ものには TPP を内部標準として使用しました。前述のとおり、アルドリン、エンドリン、DDT については ^{13}C -DDT を内部標準とし、抽出効率の低さによる成分の損失を補正しました。

バリデーション結果の詳細を表 3 に示しています。図 6 は、QC を合計 18 回繰り返して計算した真度と精度の平均を利用してまとめた概要です (3 レベル、 $n=6$)。農薬の真度は 1 つの成分 (67%) を除き 70% から 120% の間でした。精度についてはすべての対象分析物について 20% RSD を下回り、中でも 80% が 10% RSD を下回りました。アルドリンの真度は 70% をわずかに下回りましたが、精度は良好 (RSD が 6% 未満) で、SANCO ガイドラインの基準では許容範囲です [15]。

表 3. 5、50、300 ng/g の各レベルでスパイクし 6 回繰り返して分析したアボカド中の農薬の定量結果

分析対象成分	検量線		メソッドの真度および精度 (ng/g QCs ¹)						
	回帰適合/ 重み	R ²	キャリブ レーション レンジ (ng/g)	5 (25)		50 (250)		300 (1,500)	
				回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD
ジクロロポス	直線、1/x	0.9967	1-400	97	8.2	108	4.9	111	12.7
トリクロロホン	直線、1/x	0.9964	5-2000 ¹	98	7.8	95	7.3	84	4.7
2-フェニルフェノール	直線、1/x	0.9996	10-400 ²	97	14.0	104	1.7	105	5.1
エタルフルラリン	直線、1/x	0.9969	1-400	109	3.2	98	7.6	110	6.5
スルホテップ	直線、1/x	0.9958	1-400	96	5.8	76	3.9	85	9.8
アトラジン	直線、1/x	0.9967	1-400	91	5.0	80	2.1	76	3.9
リンデン	直線、1/x	0.9991	1-400	92	6.7	104	4.0	98	12.5
クロロタロニル	直線、1/x	0.9944	1-400	89	13.5	103	8.6	92	19.4
ダイアジノン	直線、1/x	0.9993	1-400	102	6.8	116	5.1	108	8.9
クロルピリフォスメチル	直線、1/x	0.9984	1-400	101	6.2	123	4.5	113	15.0
ジクロルアニド	直線、1/x	0.9989	1-400	96	10.2	85	5.1	91	4.3
アルドリン	直線、1/x	0.9982	1-400	76	4.8	59	2.3	65	5.1
トリルフルアニド	直線、1/x	0.9990	10-400	108	10.0	93	6.2	93	5.4
キャプタン	直線、1/x	0.9959	25-2000 ^{1,2}	89	8.2	109	11.0	87	18.1
フォルベット	直線、1/x	0.9897	5-2000 ¹	76	9.5	79	9.9	87	13.2
プロシミドン	直線、1/x	0.9977	1-400	87	5.0	76	1.9	79	7.2
ブピリメート	直線、1/x	0.9957	5-2000 ¹	101	6.5	100	5.6	85	10.3
エンドリン	直線、1/x	0.9967	1-400	75	10.8	88	6.7	80	13.6
硫酸エンドスルファン	直線、1/x	0.9996	1-400	96	9.9	97	6.4	95	4.9
DDT	直線、1/x	0.9995	1-400	103	4.5	105	2.6	107	4.6
イプロジオン	直線、1/x	0.9995	1-400	97	6.7	105	2.7	97	4.2
ペルメトリン	直線、1/x	0.9992	1-400	87	6.6	97	4.3	84	14.0
デルタメトリン	直線、1/x	0.9963	1-400	89	13.8	92	8.3	98	11.5

¹ 低反応のため、化合物は混合標準作業溶液の中で 5 倍濃い濃度で調製しました。そのため、その他の化合物に比べ、QC スパイクおよびキャリブレーション標準添加レベルが 5 倍高くなりました。

² 元の L00 では感度の低さ、またはマトリックス干渉ピークのどちらかが成分検出の妨げとなるため L00 を高くしました。

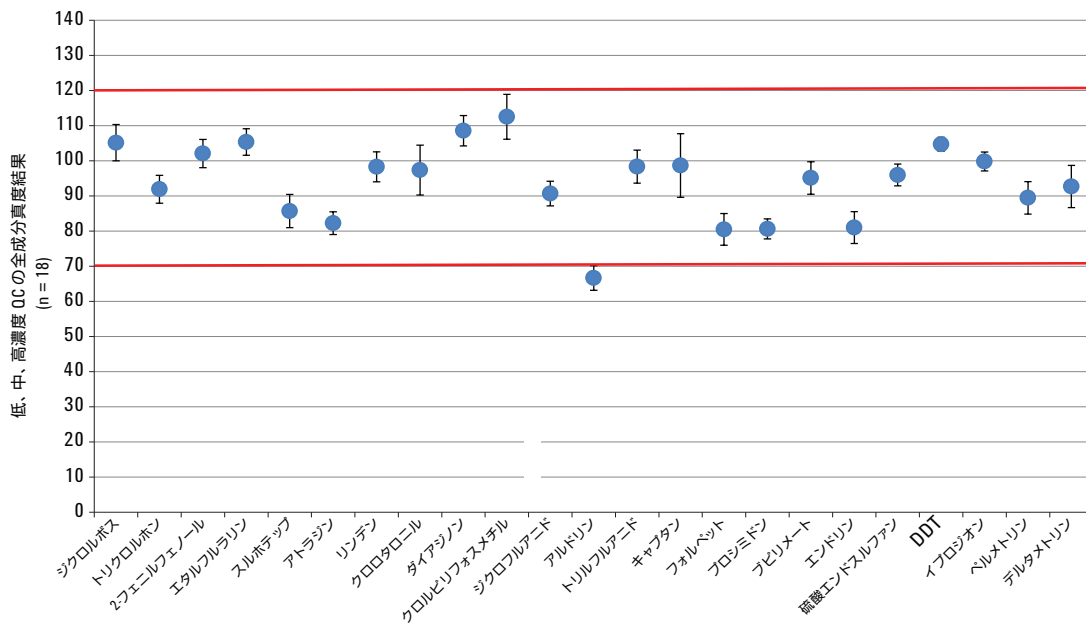


図 6. Agilent Bond Elut EMR Lipid を使用した QuEChERS 抽出により検出したアボカド中の 23 種類の農薬の定量結果
 データポイントは真度と精度を示すもので、3 つのレベルで 6 回繰り返して計算しました。エラーバー = 95 % CI。

GC/MS/MS システム性能に対するマトリックスの影響

マトリックス干渉は、多くのサンプルがシステムに注入される過程で、時間の経過とともに GC/MS/MS のシステム性能に影響を及ぼします。GC 流路の活性点は機器の性能にマイナスの影響を与える場合があります。Agilent イナートフローパスのコンポーネントにより GC 流路全体の確実な不活性化が実現します。これにより、成分の損失や分離の低下を招く、対象分析物と活性点の間の負の相互作用が大幅に低減します。ただし、マトリックスに高沸点化合物 (高脂質) が含まれると、流路表面に蓄積して新たな活性点が生成されます。これは、時間の経過とともに分析対象成分の反応の変化を招き、メソッドの信頼性に大きな影響を与えると同時にバッチごとの注入可能回数を低減させる場合があります。これを解決するために、ラボはライナの交換やカラムの調整/交換など機器のメンテナンスを頻繁に実施しなければならず、結果的にラボの生産性が低下することになります。

マトリックスのクリーンアップ評価および重量測定で示したとおり [14]、EMR Lipid で処理したサンプルはバックグラウンドが非常にクリーンで、GC/MS/MS システムに導入されるマトリックスの量も大幅に減少することが明らかです。GC/MS 流路に蓄積する活性点の数も減少するため、機器分析の一貫性が保たれます。GC/MS/MS で 100 回にわたるアボカドサンプルの注入を実施した場合の各成分の精度 (RSD) が良好なことが、これを裏付けています (表 4)。EMR Lipid で処理したサンプルでは、対象分析物の 91 % が RSD 15 % 未満を達成しました。ほとんどが 10 % 未満です。2 つの化合物、キャプタン (RSD 29.9 %) と DDT (RSD 21.6 %) については、100 回注入した結果高い RSD を示しましたが、最初の 50 回の注入での RSD はそれぞれ 11.1 % と 6.4 % でした。

表 4. GC/MS/MS を使用して Agilent Bond Elut EMR Lipid、C18/PSA、またはジルコニア充填剤で処理したアボカドサンプルを 50 回および 100 回注入した場合の分析対象成分の再現性 (RSD) の比較。50 ng/g でサンプルに添加。対象分析物のピーク面積を使用して RSD 結果を計算

農薬	100 回の注入での対象分析物の RSD (n = 20)			50 回の注入での対象分析物の RSD (n = 10)		
	EMR Lipid クリーンアップ	C18/PSA クリーンアップ	ジルコニア充填剤 クリーンアップ	EMR-Lipid クリーンアップ	C18/PSA クリーンアップ	ジルコニア充填剤 クリーンアップ
ジクロロボス	6.2	10.5	16.8	2.2	9.4	6.3
2-フェニルフェノール	7.0	13.6	19.5	5.0	12.4	8.4
エタルフルラリン	12.4	18.8	32.0	5.8	10.3	7.9
スルホテップ	7.1	11.8	17.2	3.1	6.4	10.8
アトラジン	6.8	12.2	19.1	3.2	12.2	5.2
リンデン	8.5	10.8	20.0	4.6	10.9	5.1
クロロタロニル	12.5	11.7	37.4	8.0	12.9	11.0
ダイアジノン	6.6	11.7	16.9	4.4	10.5	5.6
クローピリフォスメチル	8.4	8.9	14.9	3.8	8.6	6.6
ジクロフルアニド	11.7	9.0	25.9	5.4	9.9	5.5
アルドリノ	9.8	19.3	25.7	8.6	19.3	7.1
トリフルアニド	10.5	6.6	17.8	4.2	6.9	6.6
キャプタン	29.9	51.9	47.1	11.1	24.9	21.7
プロシミドン	6.8	14.3	22.5	5.6	13.8	4.8
ピリメート	6.8	10.4	20.7	7.6	11.0	6.2
エンドリン	8.3	12.6	24.1	5.9	13.8	5.4
硫酸	8.5	12.1	22.4	5.3	12.7	6.4
エンドスルファン	8.5	12.1	22.4	5.3	12.7	6.4
DDT	21.6	22.4	42.6	6.4	12.0	11.8
イプロジオン	11.0	10.7	40.0	8.2	10.9	16.3
ベルメトリン	6.8	11.8	18.8	5.2	11.2	8.6
パラチオンエチル ₁₀ (IS)	11.8	7.2	13.0	4.7	6.8	7.0
TPP (IS)	9.1	19.9	28.3	9.0	22.5	12.8

C18/PSA では分析対象成分の 74 % の RSD が 15 % 未満だったのに対し、ジルコニアは非常に低く、分析対象成分のわずか 9 % でした。ジルコニアで処理した抽出物は特に問題があり、100 回の注入で分析対象成分の 100% で RSD が 10 % を超え、57 % の RSD が 20 % を上回りました。これは、C18/PSA およびジルコニアによる各クリーンアップ抽出での高レベルの残存マトリックスが機器の性能に悪影響を及ぼし、その結果、分析対象成分反応に重大な変化が生じることを示しています。これらの結果は、EMR Lipid のマトリックス除去の卓越性を実証しています。EMR Lipid により GC 流路の活性点は減少し、複数注入に対する精度は向上し、機器メンテナンス頻度を下げることが可能になります。

結論

アボカドに含まれる GC で検査可能な 23 種類の農薬について、QuEChERS AOAC 抽出の後で Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用する迅速で信頼性があり堅牢なメソッドを開発し検証しました。マトリックス効果を評価し、従来の C18/PSA およびジルコニア充填剤によるクリーンアップと比較しました。EMR Lipid は C18/PSA およびジルコニア充填剤に比べ、GC/MS および GC/MS/MS の双方で優れたクロマトグラフクリーンアップを実現する結果となっています。EMR Lipid クリーンアップを導入すると、高脂質マトリックスのサンプル分析での GC/MS 使用が円滑になります。分析対象成分の回収率の比較では、EMR Lipid クリーンアップは C18/PSA と同等の結果が得られ、ジルコニア充填剤との比較ではより良好な結果となっています。優れたマトリックス除去性能はこのアプリケーションにおける EMR Lipid の最大の利点です。GC/MS/MS における 100 回の注入でも卓越した再現性を実証しました。C18/PSA 処理と、特にジルコニア処理によるサンプルの分析対象成分の精度は、100 回の注入実験で非常にばらつきがありました。そのため、EMR Lipid を dSPE クリーンアップ手段として QuEChERS ワークフローで使用すると、ラボの生産性向上、サンプルスループットの改善、データの処理と確認の簡素化、バッチ再実行の削減、機器メンテナンスの軽減が実現します。他の複雑で高脂質なサンプルやターゲット化合物での EMR の活用が今後も期待されます。

参考文献

1. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
2. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
3. Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Mercer, G. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 2315-2329.
4. Hildmann, F.; Gottert, C.; Frenzel, T.; Kempe, G.; Speer, K. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1403*, 1-20.
5. Lehotay, S. J. *Mass Spec. in Food Safety Methods in Mol. Biol.* **2011**, *747*, 65-91.
6. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *758*, 80-92.
7. Morris, B. D.; Schriener, R. B. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 5107-5119.
8. Wong, J. W. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 7636-7646.
9. Hayward, D. G.; Wong, J. W. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4686-4693.
10. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373-381.
11. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A. H. *PAN Pesticide Database; Pesticide Action Network, North America, Oakland, CA, USA, 2014.*
http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp
12. Szelewski, M. J.; Quimby, B. 「高マトリックス試料の残留農薬を高速分析するための新しいツール」アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-1716JAJP、**2004**.
13. Meng, C-K. 「GC/MS/MS アナライザと農薬および環境汚染物質 MRM データベース」アプリケーションノート、アジレント・テクノロジー、資料番号 5990-9453JAJP、**2011**.
14. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN, 2015.*
15. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.*

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

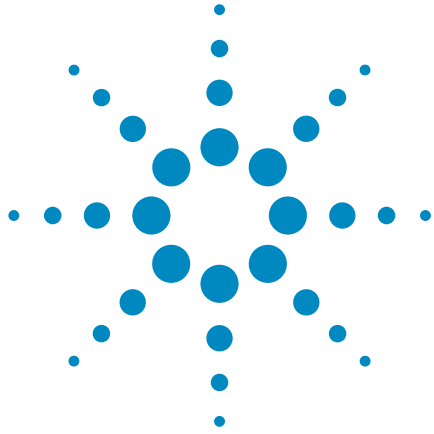
アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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. 2015
Printed in Japan
August 4, 2015
5991-6097JAJP



Agilent Technologies



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、ウェストベリー、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 オートサンブラおよび 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 パージ流量:	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 パージ付 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

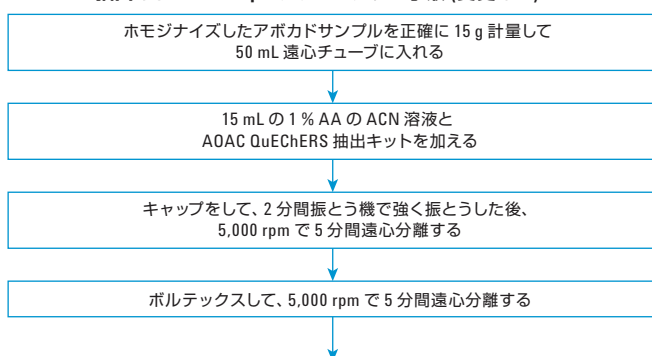
不安定な 分析対象物	RT (分)	MRM			
		定量 チャンネル	CE (V)	定性 チャンネル	CE (V)
キャプタホル	18.20	183 → 79	10	150 → 79	5
ホスメット	18.77	160 → 77.1	20	160 → 133.1	20
クマホス	20.67	361.9 → 109	10	210 → 182	10
ピラクロ ストロピン	22.03	132 → 77.1	20	164 → 132	15

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)

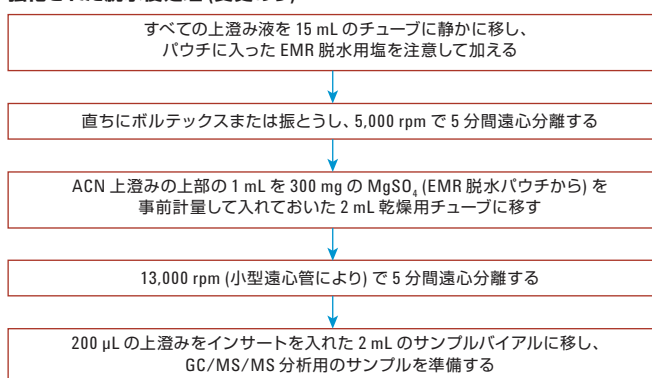


図 1. GC/MS/MS によるサンプル前処理ワークフロー。
変更のない QuEChERS 抽出法と EMR Lipid クリーンアップステップの後に強化された脱水手順を用いたアボカド中の農薬を分析するための推奨プロトコル。

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。

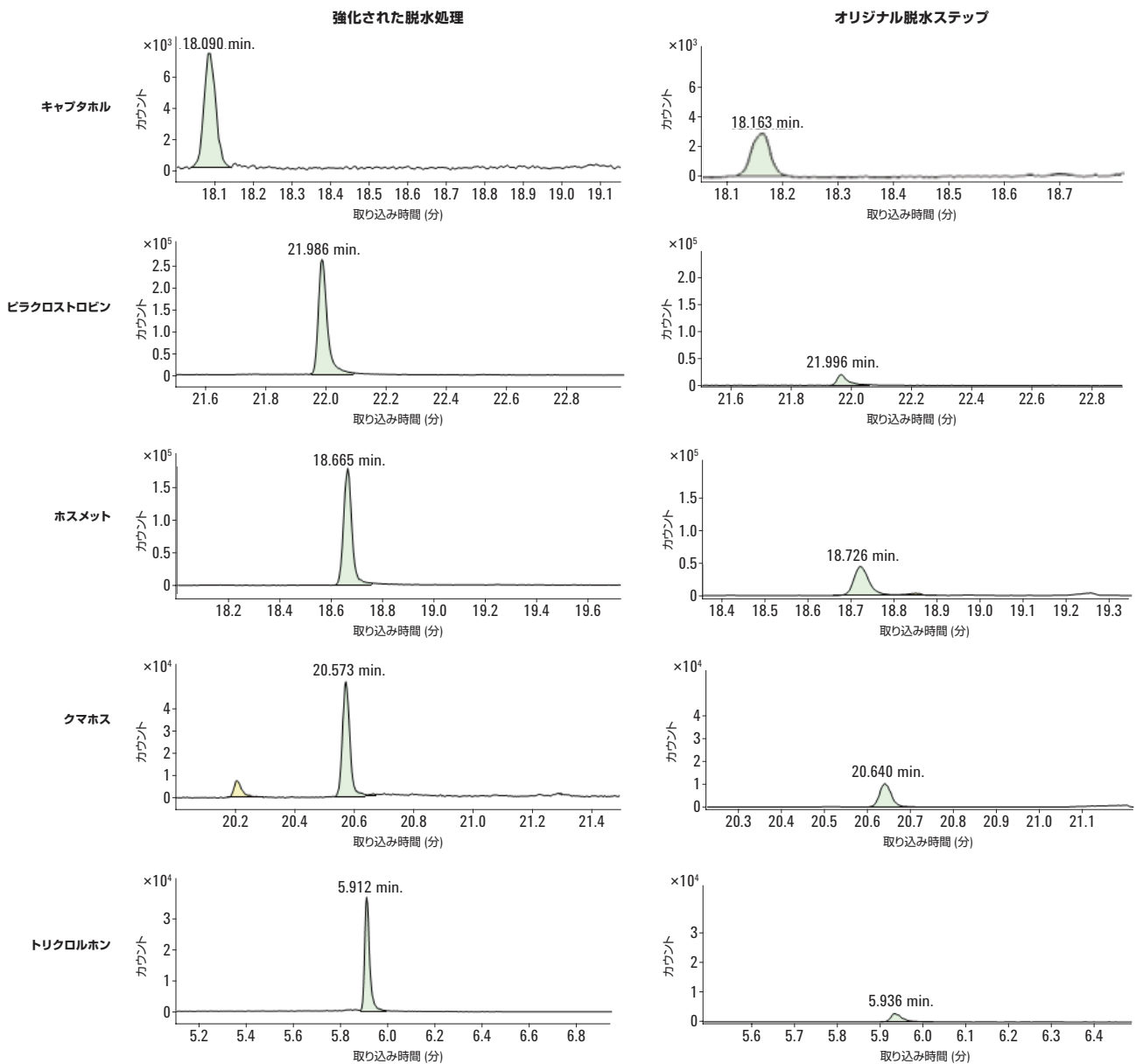


図 2. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理とオリジナル脱水ステップを用いて GC/MS/MS で分析したときの不安定な化合物のレスポンスおよびピーク形状についてのクロマトグラフィーの比較

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。

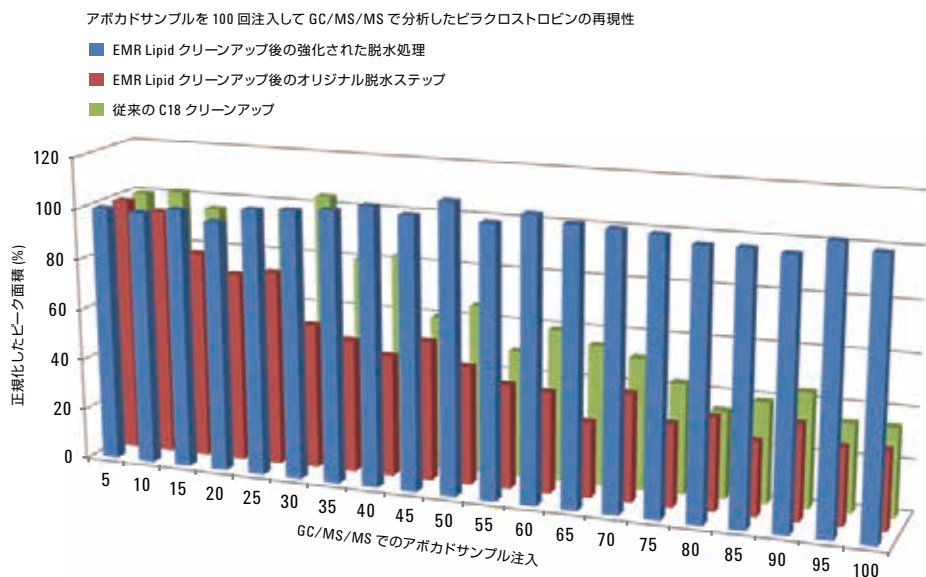


図 3. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いた場合、および従来の C18 クリーンアップを用いて調整したアボカドサンプルを 100 回注入した場合の不安定な化合物であるピラクロストロピンのレスポンスの GC/MS/MS での再現性。

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を示しています。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。

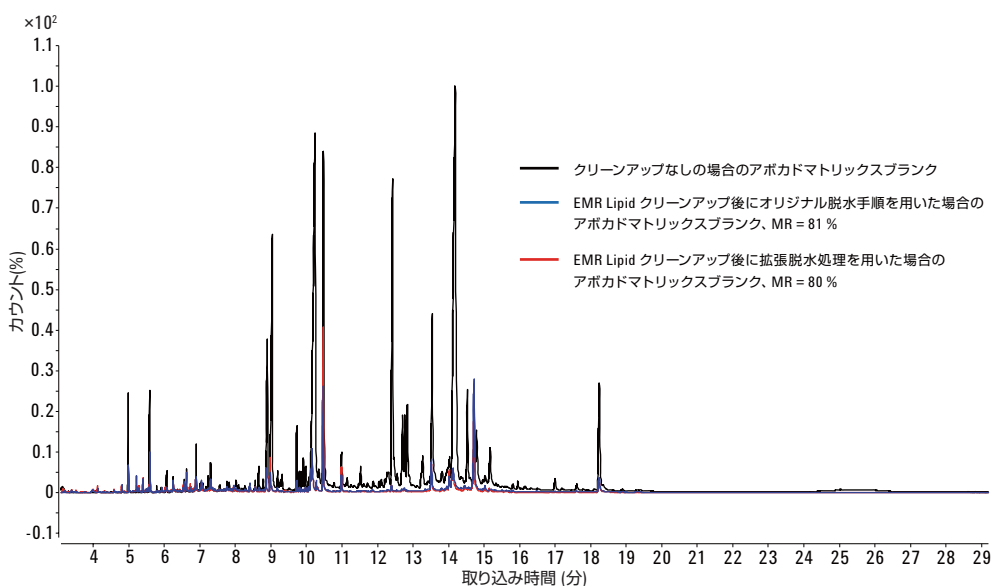


図 5. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理とオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いた場合の GC/MS フルスキャンでのクロマトグラフィーの比較により示された、同等のマトリックス除去の効率。

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。

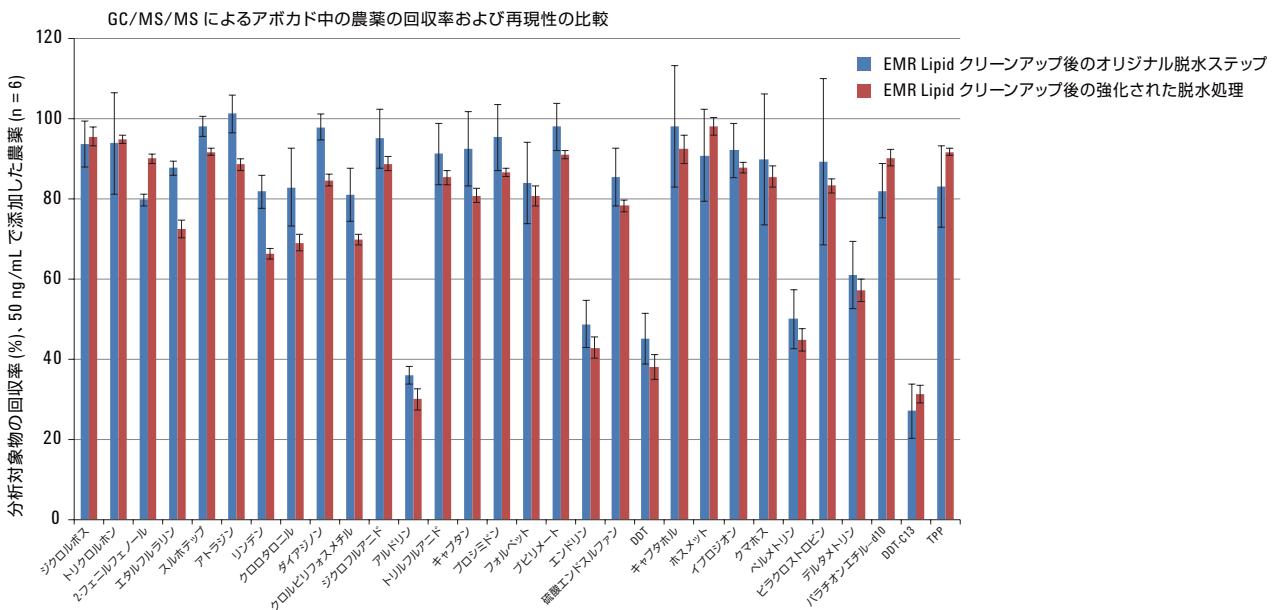


図 6. EMR Lipid クリーンアップ後に強化された脱水処理およびオリジナル脱水ステップをそれぞれ用いて調整し、50 ng/mL で添加したアボカドサンプルの農薬の回収率。

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

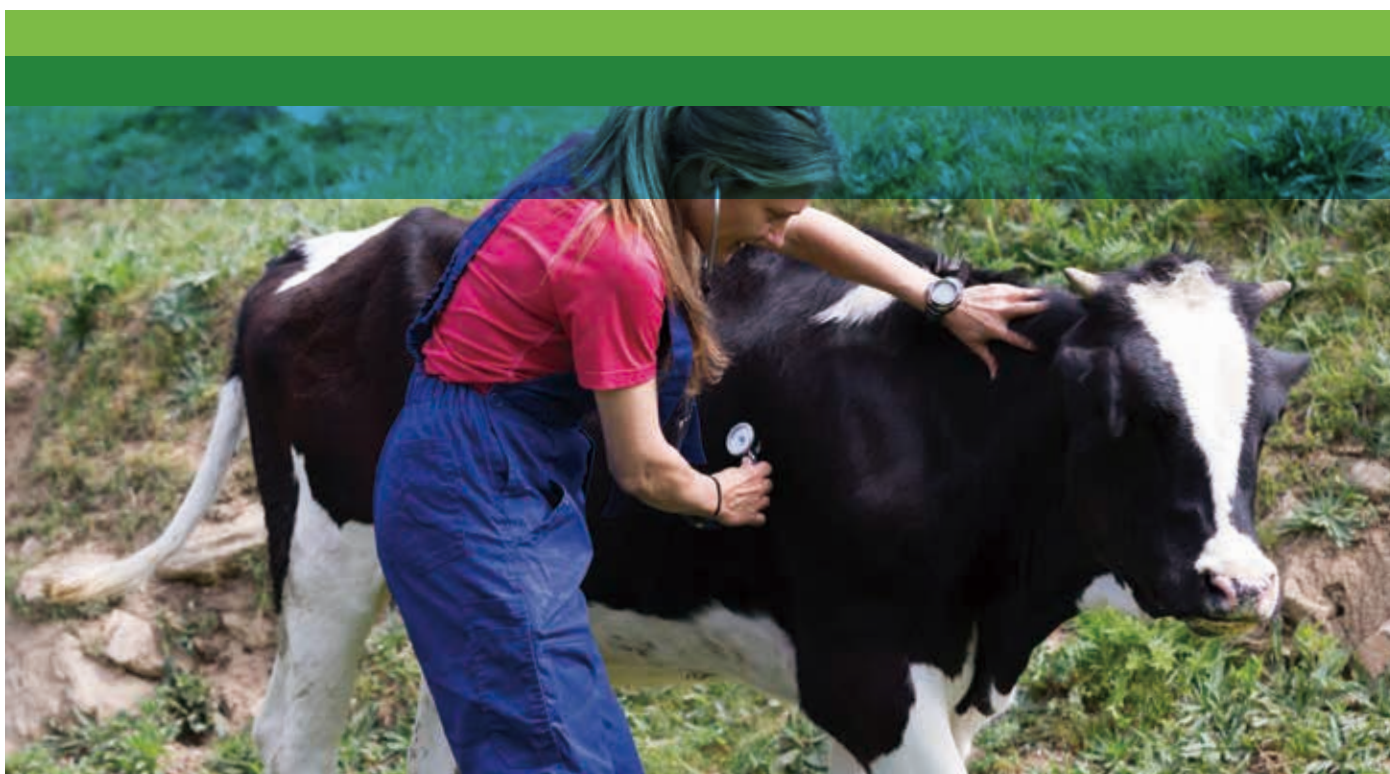
March 10, 2016

5991-6707JAJP



Agilent Technologies

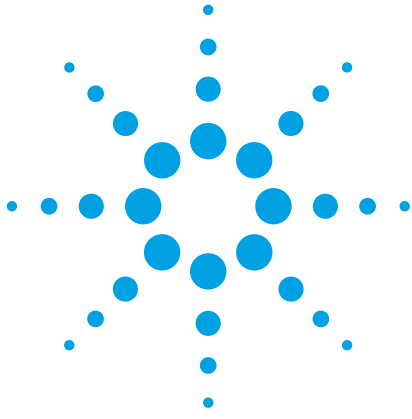
動物用医薬品分析



**Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS による
ウシ肝臓中の残留動物用医薬品の多成分同時分析**

**Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジクリーンアップおよび LC/MS/MS を
用いた牛肉中の残留動物用医薬品の多成分同時分析**

**Bond Elut QuEChERS dSPE EMR-Lipid と Poroshell 120 による
豚肉中のマクロライド系抗生物質分析**



Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid と LC/MS/MS によるウシ肝臓中の 残留動物用医薬品の多成分同時分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品であり、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) に使用できます。この充填剤は、共抽出されたマトリックスに対して非常に選択性が高くなっています。特に脂質の多いサンプル (脂肪含有量が 5 % を超える) で選択性があり、分析対象物の回収率に悪影響を与えることはありません。今回の実験では、ウシ肝臓中の 30 種の代表的な動物用医薬品の分析に、この新しい製品が適用できることを示しています。手順では、酸性アセトニトリルによって迅速かつ効率的なタンパク質沈殿抽出を実施し、続いて EMR Lipid dSPE と脱水キットを使用してさらにクリーンアップします。EMR Lipid プロトコルによって除去されたマトリックスの量は、共抽出物の質量と、ポストカラムインフュージョンの実験によって測定しました。他のマトリックスクリーンアップ製品と比較して、EMR Lipid dSPE では、より効果的にマトリックスを除去することができ、分析対象物の回収率が向上します。最適化された EMR Lipid メソッドにより、あらゆるレベルで、30 種の動物用医薬品すべてについて優れたクリーンアップと非常に高い真度および精度を実現し、高脂質サンプルの堅牢な分析を高速かつ効果的に実行します。



Agilent Technologies

はじめに

動物用医薬品は、病気の予防のため、または成長促進のために、食糧生産業界で動物に対して広く使用されています。これらの薬品は、動物の組織に蓄積します。不適切な使い方をすると、薬品の残留物が可食組織に蓄積する可能性があります。これは人間の健康に対するリスクになることが知られています。食品の安全性に対する注目度が高まったことから、ほぼすべての国で、食用動物の生産で使用される薬品を制限する規制が実施されています [1~4]。

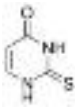
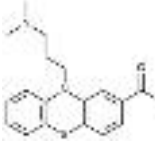
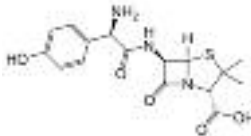
動物由来の食品 (筋肉、肝臓、卵など) は、通常、化学的に複雑であるため、一般的な抽出と効率的なクリーンアップを含む、効率的なサンプル前処理メソッドを適用することが非常に重要です。確立されたサンプル前処理メソッドとしては、従来から行われている溶媒抽出、固相抽出 (SPE)、または複数の手法の組み合わせなどがあります。それらのメソッドは、通常、作業量が多く、時間がかかり、限られたクラスの化合物のみに適しており、追加的なメソッド開発も必要とします。

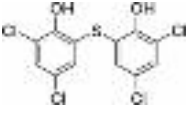
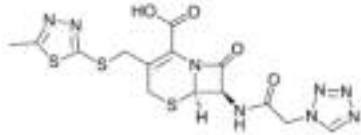
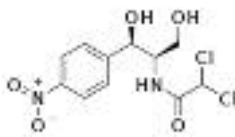
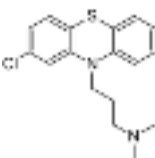
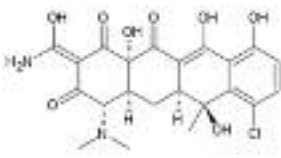
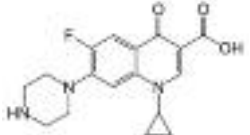
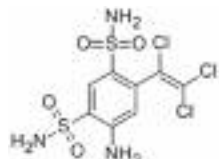
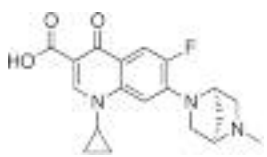
複数の種類の多成分残留物を対象とするメソッドが、法規制に基づく監視プログラムでますます使用されるようになってきました。分析範囲が広く、ラボの効率を向上させるためです。監視対象の動物用医薬品の数は、この数年間で増加しており、現在では 100 を超える薬品が報告されています [5~8]。サンプル前処理では、通常、アセトニトリルと水の混合液を使用した抽出が行われ、続いて C18 クリーンアップまたはその他のクリーンアップ手法、あるいはその両方が実施されます。C18 などの充填剤を使用した場合、共抽出され

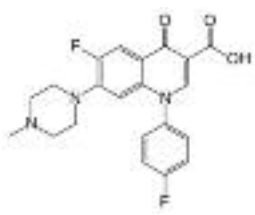
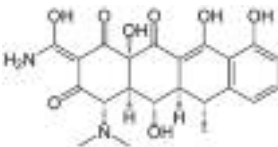
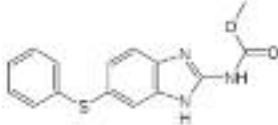
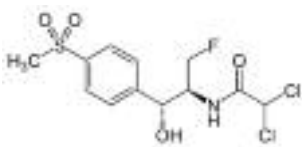
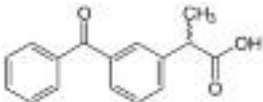
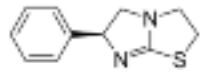
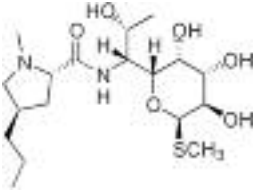
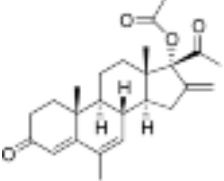
た脂質の除去は限られています。そのため、希釈時または再溶解時に最終サンプルで沈殿が見られる可能性があります。沈殿物が生成されると、LC/MS/MS 注入の前にサンプルろ過が必要になり、分析対象成分が失われる可能性があります。分散固相抽出 (dSPE) 中にヘキサンを追加して、共抽出された脂質を除去できますが、これは選択性に欠け、時間がかかり、また疎水性物質を除去することになります。シリコニア充填剤をクリーンアップに使用すると、C18 と比較してマトリックスのクリーンアップが改善されますが、フルオロキノロン、テトラサイクリン、およびマクロライドなどの、カルボン酸含有化合物やヒドロキシル含有化合物の場合は特に、分析対象成分が失われる量が増えます [7, 8]。

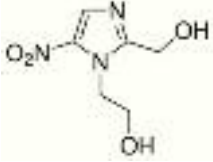
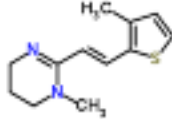
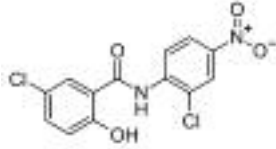
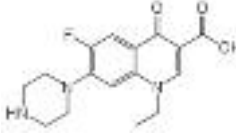
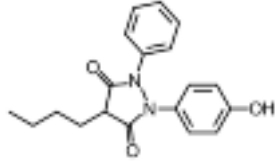
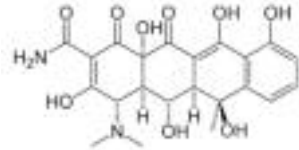
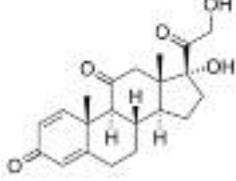
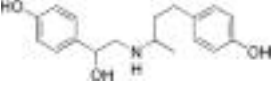
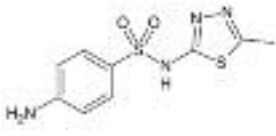
Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal Lipid (EMR Lipid) は、分析対象の不要な保持を発生させずに、サンプルから主要な脂質類を選択的に除去する、まったく新しい充填剤です。複雑なマトリックスから脂質の干渉を除去することは、QuEChERS やタンパク質沈殿などの手法で特に重要になります。これらの単純なサンプル前処理メソッドでは、脂質の大半を除去することはできないため、共抽出物は、ターゲット化合物を含む最終サンプル抽出に残ります。これにより、クロマトグラフに異常が見られたり、データの精度および真度が低下したり、メンテナンス上の問題が増加したりすることになります。この実験では、ウシ肝臓中の分析が難しい 30 種の代表的な動物用医薬品を分析するための、新しいサンプル前処理のアプローチを調査しています。その際に、単純なタンパク質沈殿抽出の後に EMR Lipid によるクリーンアップを使用します。親水性から疎水性、酸性、中性、塩基性の薬物など、17 個の異なるクラスから、代表的な動物用医薬品を選択しました。表 1 に、これらの動物用医薬品の化学情報および規制情報を示しています。

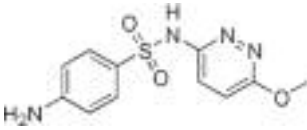
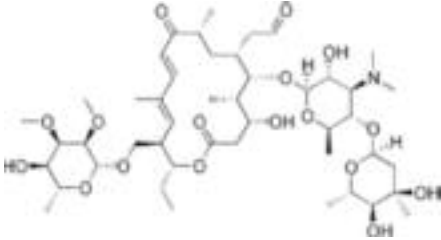
表 1. 動物用医薬品の化学的性質と物理的性質

名前	薬物クラス	Log P	pKa	分子式	構造	米国の許容値 (µg/g)
2-チオウラシル	Thyreostat	-0.28	7.75	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S		該当なし
アセトプロマジン	トランキライザー	3.49	9.3	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S		該当なし
アモキシシリン	b-ラクタム	0.86	2.4	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		0.01

名前	薬物クラス	Log P	pKa	分子式	構造	米国の許容値 (µg/g)
ピチオノール	フルキシド	5.51	4.82	C ₁₂ H ₆ Cl ₄ O ₂ S		該当なし
セファゾリン	セファロスポリン	-1.5	2.3	C ₁₄ H ₁₄ N ₈ O ₄ S ₃		該当なし
クロラムフェニコール	フェニコール	1.14	5.5	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₅		(c)
クロルプロマジン	トランキライザー	5.20	9.3	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S		該当なし
クロルテトラサイクリン	テトラサイクリン	0.24	3.3, 7.4, 9.3	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈		2 (d)
シプロフロキサシン	フルオロキノロン	0.28	6.09, 8.74	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
クロルスロン	フルキシド	1.25	-	C ₈ H ₆ Cl ₃ N ₃ O ₄ S ₂		0.1 (e)
ダノフロキサシン	フルオロキノロン	1.2	6.04	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃		0.02 (a, e)

名前	薬物クラス	Log P	pKa	分子式	構造	米国の許容値 (µg/g)
ジフロキサシン	b-ラクタム	2.78	5.85	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃		該当なし
ドキシサイクリン	テトラサイクリン	-0.54	3.4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈		該当なし
フェンベンダゾール	駆虫薬	3.75	10.27	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S		0.4 (e, h), 2 (b)
フロルフェニコール	フェニコール	-0.12	10.73	C ₁₂ H ₁₄ C ₁₂ FNO ₄ S		0.2 (b)
ケトプロフェン	トランキライザー	2.81	3.88	C ₁₆ H ₁₄ O ₃		該当なし
レバミゾール	駆虫薬	1.85	8.0	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S		0.1 (e)
リンコマイシン	リンコサミド	0.91	7.8	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S		0.1 (b)
酢酸メレンゲステロール (MGA)	その他	4.21	11.42	C ₂₅ H ₃₂ O ₄		0.025 (g)

名前	薬物クラス	Log P	pKa	分子式	構造	米国の許容値 (µg/g)
ミノニダゾール-0H	ニトロイミダゾール	-0.81	3.09	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄		(c)
モランテル	駆虫薬	1.97	>12	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S		該当なし
ニクロサミド	フルキシド	5.41	5.6	C ₁₃ H ₈ C ₁₂ N ₂ O ₄		該当なし
ノルフロキサシン	フルオロキノロン	0.82	6.32	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
オキシフェニルブタゾン	NSAID	2.72	4.87	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃		該当なし
オキシテトラサイクリン	テトラサイクリン	-1.5	3.27	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		2 (d)
ブレドニゾン	コルチコステロイド	1.57	12.58	C ₂₁ H ₂₆ O ₅		該当なし
ラクトパミン	b-アゴニスト	1.65	9.4	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃		0.03 (e)
スルファメチゾール	スルホンアミド	0.51	5.45	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		NA

名前	薬物クラス	Log P	pKa	分子式	構造	米国の許容値 (µg/g)
スルファメトキシピリダジン	スルホンアミド	0.32	6.7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S		該当なし
チロシン	マクロライド	3.27	7.7	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		0.2 (f)

a ウシ肝臓における許容値 (ツラスロマイシンの場合、マーカー残留物が規定されています)

b ブタの筋肉における許容値

c 適用外使用の禁止

d 許容値は、クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、およびテトラサイクリンを含む、筋肉中のテトラサイクリンの残留量の合計です。

e ウシ筋肉中の許容値

f 未調理のウシの脂肪、筋肉、肝臓、および腎臓における許容値

g ウシの脂肪における許容値

h ヤギの筋肉における許容値

実験方法

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) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。ジメチルスルホキシド (DMSO)、動物用医薬品標準液、および内部標準液は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。試薬グレードのギ酸 (FA) は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-86060)。酢酸アンモニウム (NH₄OAc) は Fisher Chemicals (フェアローン、ニュージャージー州、米国) から入手しました。

溶液および標準試料

ギ酸 (5%) のアセトニトリル溶液は、5 mL のギ酸を 95 mL のアセトニトリルに加えることによって、新しく調製しました。酢酸アンモニウムの原液 (1 M) は、19.27 g の NH₄OAc を 250 mL のミリ Q 水に溶解させて作成しました。この溶液は 4 °C で保管しました。5 mM の酢酸アンモニウム水溶液は、1 L のミリ Q 水に 1 M の酢酸アンモニウムを 5 mL 加えて作成しました。

標準原液および内部標準 (IS) 原液は、DMSO を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。ただし、DMSO を使用した 1.0 mg/mL のダノフロキサシン原液と DMSO を使用した 0.25 mg/mL のシプロフロキサシン原液は除きます。アモキシシリンおよびセファゾリンの原液は、水を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。プラスチックバイアルを使用したアモキシシリンおよびセファゾリンの原液を除き、すべての原液を、茶色ガラス

製バイアルで調製しました。すべての原液は -20 °C で保管しました。30 種の化合物は、機器の反応に基づいて G1 および G2 という 2 つのグループに割り振りしました。混合した 25/5 µg/mL (G1/G2) 標準作業用溶液は、1/1 のアセトニトリルと水で調製しました。フルニキシン-d₃ IS 作業用溶液 (25 µg/mL) は、1/1 のアセトニトリルと水で調製しました。

装置

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 (SPEX、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、ウェストベリー、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 EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010)、Agilent Bond Elut EMR 脱水キット (部品番号 5982-0101)

使用機器

分析には、以下で構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity クォータナリポンプ (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット (G1330B) 付き Agilent1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)、および Agilent1290 Infinity サーモスタットカラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソースと iFunnel 技術を搭載した Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムに連結しました。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

機器条件

HPLC 条件

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、2.1 × 150 mm、2.7 μm (部品番号 693775-902)、Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard、2.1 × 5 mm、2.7 μm (部品番号 821725-911)
移動相:	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液
流量:	0.3 mL/min
カラム温度:	40 °C
オートサンブラ温度:	4 °C
注入量:	3 μL
ニードル洗浄:	1:1:1:1、ACN:MeOH:IPA:H ₂ O と 0.2 % FA
グラジエント:	時間 (分) %B 0 10 0.5 10 8.0 100
ストップタイム:	12 分
ポストタイム:	3 分

条件、MS

ポジティブ/ネガティブモード

ガス温度:	120 °C
ガス流量:	14 L/min
ネブライザ:	40 psi
シースガスヒーター:	400 °C
シースガス流量:	12 L/min
キャピラリ:	3,000 V

iFunnel パラメータ:	ポジティブ	ネガティブ
高圧 RF	90 V	90 V
低圧 RF	70 V	60 V

分析対象成分に関連する MS DMRM 条件を表 2 に示し、典型的なサンプルクロマトグラムを図 1 に示します。

サンプル前処理

最終のサンプル前処理手順は、次のステップを使用して最適化しました。

1. ホモジナイズしたウシ肝臓を 2 g (±0.1 g) 計量し、50 mL の遠心管に入れる
2. 10 mL の酸性アセトニトリル (5 % の FA を含む) を追加する
3. サンプルを振とう機で 2 分間混合する
4. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
5. 5 mL の酢酸アンモニウム緩衝液 (5 mM) を 15 mL の EMR Lipid 分散キットに入れる
6. 上澄み 5 mL を EMR Lipid 分散キットに移す
7. 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを攪拌した後、さらに 60 秒間、マルチポジションボルテックステーブルで混合する
8. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
9. 上澄み 5 mL を塩 (1:4、NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL の EMR Lipid 脱水キットに移し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
10. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
11. アセトニトリル 層の上部 200 μL と水 800 μL を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで攪拌する

表 2.ターゲット化合物の LC/MS/MS DMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象成分	RT (分)	デルタ RT (分)	極性	プリカーサ		プロダクトイオン		
				イオン (m/z)	定量 イオン	CE (V)	定性 イオン	CE (V)
2-チオウラシル	1.41	2	ネガティブ	127	57.9	17	—	—
アモキシシリン	1.84	2	ポジティブ	366.1	349.2	5	114	25
ミノダゾール-OH	2.07	2	ポジティブ	188.1	123.1	9	126.1	13
レバミゾール	3.4	2	ポジティブ	205.1	178.1	21	91.1	41
リンコマイシン	3.35	2	ポジティブ	407.2	126.1	37	70.1	80
ノルフロキサシン	4.22	2	ポジティブ	320.1	302.2	21	276.1	17
オキシテトラサイクリン	4.24	2	ポジティブ	461.2	426.1	17	443.2	9
シプロフロキサシン	4.31	2	ポジティブ	332.1	231	45	314.3	21
ダノフロキサシン	4.42	2	ポジティブ	358.2	340.2	21	81.9	53
ラクトバミン	4.4	2	ポジティブ	302.2	107	33	77	77
モランテル	4.9	2	ポジティブ	221.1	123.1	37	76.9	80
セファゾリン	4.65	2	ポジティブ	455	323.1	9	156	13
スルファメチゾール	4.65	2	ポジティブ	271	156.1	13	92	29
スルファメトキシピリダジン	4.69	2	ポジティブ	281.1	92	33	65.1	57
ジフロキサシン	4.83	2	ポジティブ	400.2	382	25	356.3	17
クロルテトラサイクリン	5.11	2	ポジティブ	479.1	444.2	21	462.1	17
ドキシサイクリン	5.24	2	ポジティブ	445.2	428.1	17	410.2	25
フルルフェニコール	5.47	2	ネガティブ	300.1	268.1	25	159.1	41
クロラムフェニコール	5.68	2	ネガティブ	321	152	17	257.1	9
チロシン	5.85	2	ポジティブ	916.5	173.9	45	772.5	33
クロルスロン	5.86	2	ネガティブ	377.9	341.9	9	—	—
ブレドニゾン	5.88	2	ポジティブ	359.2	147.2	33	341.2	9
アセトプロマジン	5.93	2	ポジティブ	327.2	86	21	58	45
クロルプロマジン	6.49	2	ポジティブ	319.1	86	21	58.1	45
フェンベンダゾール	6.77	2	ポジティブ	300.1	268.1	25	159.1	41
ケトプロフェン	6.8	2	ポジティブ	255.1	208.9	13	77	57
オキシフェンブタゾン	7.27	2	ネガティブ	323.1	133.9	25	295	17
フルニキシン-d ₃ (NEG)	7.53	2	ネガティブ	298.1	254.2	17	192	37
フルニキシン-d ₃ (POS)	7.53	2	ポジティブ	300.1	282	25	264	41
酢酸メレンゲストロール	8.78	2	ポジティブ	397.2	337.4	13	279.2	21
ニクロサミド	8.82	2	ネガティブ	325	170.9	25	289.1	13
ピチオノール	9.49	2	ネガティブ	352.9	161	21	191.8	25

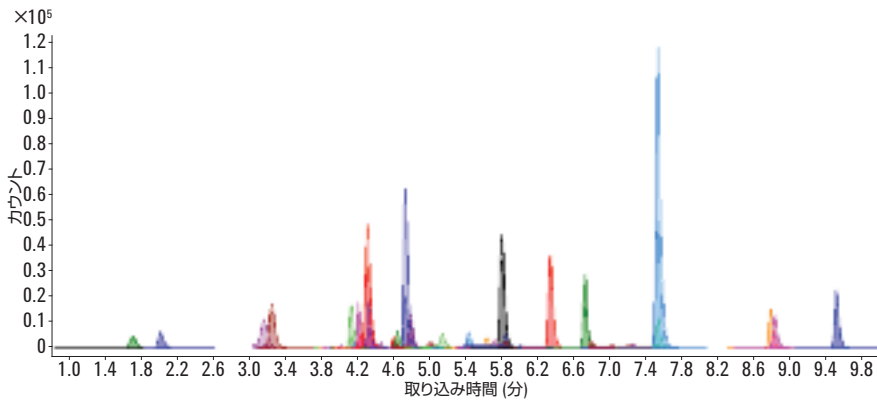


図 1. 50 ng/g の動物用医薬品標準液を添加し、タンパク質沈殿で抽出した後 Agilent Bond Elut EMR Lipid でクリーンアップしたウシ肝臓サンプルの典型的な LC/MS/MS サンプルクロマトグラム (DMRM)

これで、LC/MS/MS 分析の準備ができました。
図 2 にサンプル前処理法のフローを示します。

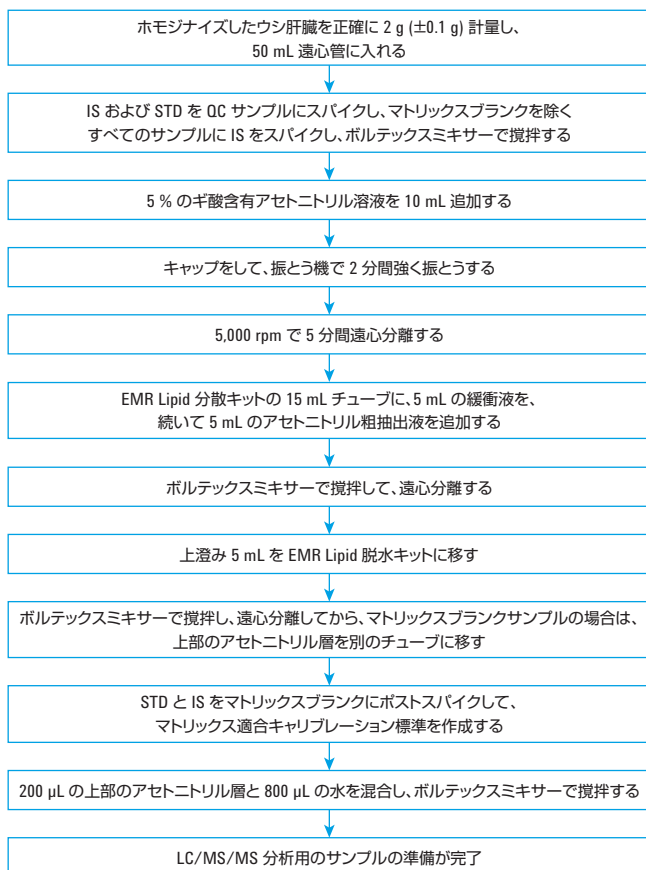


図 2. ウシ肝臓中の動物用医薬品の分析に Agilent Bond Elut EMR Lipid を使用するサンプル前処理手順

キャリブレーション標準と品質管理サンプル

プレススパイクした QC サンプルを混合標準作業用溶液に適切に添加し、ステップ 1 以降を 6 回繰り返しました。G1 の分析対象成分については、QC サンプルは肝臓中の 10、50、250、および 750 ng/g に相当します。G2 の分析対象成分については、QC サンプルは肝臓中の 2、10、50、および 150 ng/g に相当します。IS 溶液をマトリックスブランク以外のすべてのサンプルにスパイクしました。これは肝臓中の 200 ng/g のフルニキシン-d₃ に相当します。

マトリックスキャリブレーション標準を標準および IS 作業用溶液を使用して調製しました。ステップ 8 の後のマトリックスブランクサンプルでの濃度は、肝臓中の 5、25、50、250、750、および 1,000 ng/g (G1)、肝臓中の 1、5、10、50、150、および 200 ng/g (G2)、肝臓中の 200 ng/g (IS) に相当します。

共抽出物量の測定

共抽出物の量は、C18、ジルコニア充填剤、および EMR Lipid という 3 つの異なるクリーンアップ手法について、重量測定法 [7] によって測定しました。サンプルは、以下のようにして準備しました。

1. ガラスチューブを約 1 時間以内 110 °C で加熱し湿気を除去する
2. チューブを室温まで冷やす
3. テストチューブの質量をあらかじめ計る
4. 初期マトリックスブランク抽出物 (クリーンアップなし) 1 mL とさまざまなクリーンアップありのマトリックスブランクをそれぞれ 2 回同じ方法で正確に移す
5. 遠心濃縮機を 50 °C にしてすべてのサンプルを 1 時間または乾燥するまで乾かす
6. ガラスチューブを約 1 時間以内 110 °C で加熱し湿気を除去する
7. チューブを室温まで冷やす
8. チューブの質量をもう一度量る

ステップ 8 の後とステップ 3 の後の質量の差はサンプルの共抽出物の質量です。クリーンアップで除去された共抽出物の量はクリーンアップの前後のマトリックス共抽出の平均質量差でした。

マトリックス効果の評価

ポストカラムインフュージョンの実験により、クロマトグラフのマトリックス効果を評価しました。10 ppb の動物用医薬品の標準原液の同時ポストカラムインフュージョンを 60 μ L/min で実行して、マトリックスブランクサンプルを注入しました。化合物のすべてのトランジションを、LC サイクル全体にわたって監視しました。

さらに、分析対象成分の反応 (ピーク面積) を、ポストスパイクされた肝臓の抽出液と、同等の原液の間で比較しました。ポストスパイクされた肝臓の抽出液は、標準溶液をブランク肝臓マトリックス抽出液にポストスパイクすることによって作成しました。反応 (ピーク面積) の差は、マトリックス効果と直接関連しています。

メソッドの最適化、バリデーション、および比較

さまざまな最適化テストを評価しました。タンパク質沈殿については 5 % の FA のアセトニトリル溶液と 1 % の FA のアセトニトリル溶液、EMR Lipid クリーンアップについては酢酸アンモニウム緩衝液と水を比較し、EMR Lipid クリーンアップの実施後については脱水用塩を使用する場合と使用しない場合を比較しました。分析対象物の回収率、精度、およびその他の定量パラメータに基づいて、結果を評価しました。その後、再作成した検量線標準ですべての QC サンプルをひとつにまとめた完全な定量バッチを実行して、最適化された最終メソッドを検証しました。

回収率の比較データは、肝臓サンプルを 50 ng/g でプレスパイクおよびポストスパイクすることによって収集しました。その後、抽出物は、許容できるクリーンアッププロトコルを使用して処理されました。タンパク質沈殿を実施する EMR Lipid プロトコルには、図 2 で説明するクリーンアップ手順を採用しました。QuEChERS には、以下のように C18 またはジルコニア充填剤の dsPE によるクリーンアップを使用しました。

1. 2 g の肝臓を量り、50 mL のチューブに入れる
2. 8 mL のリン酸緩衝液 (pH 7.0) および 10 mL の酸性アセトニトリル (5% の FA) を追加する
3. サンプルを 30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する
4. 分離/抽出用の塩 (EN 法用) を追加し、振とう機で強く振とうする
5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する

さらにクリーンアップするために使用する未処理のアセトニトリルと肝臓の抽出液を、以下のように準備しました。

1. 1 mL の未処理のアセトニトリルと肝臓の抽出液を、25 mg の C18 と 150 mg の $MgSO_4$ が入っている 2 mL のバイアル (部品番号 5082-4021) に入れるか、100 mg のジルコニア充填剤が入っている 2 mL のバイアルに入れる
2. キャップをして 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
3. 13,000 rpm で 3 分間遠心分離する (小型遠心分離)
4. 上澄み 200 μ L を、800 μ L の水が入っている別のバイアルに移す
5. 再生セルロースの 0.45 μ m フィルタを使用して、ボルテックスミキサーで攪拌処理およびフィルタ処理を実施する

これで LC/MS/MS 分析用のサンプルの準備ができました。回収率は、プレスパイク済みサンプルとポストスパイク済みサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

結果と考察

共抽出の量

表 3 に、サンプル共抽出物の重量測定テストで得られた結果を示します。これは、C18 またはジルコニア充填剤を使用した dSPE と比較して、EMR Lipid dSPE のマトリックスクリーンアップの方が重量から見ると効率が良いことを明確に示しています。

表 3. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid、ジルコニア、および C18 によるクリーンアップによるウシ肝臓マトリックス共抽出物の重量測定結果

クリーンアップ手法	1 mL のアセトニトリル最終抽出物別の共抽出物 (mg) (n = 2)	クリーンアップによるマトリックス共抽出物の除去効率 (%)
追加クリーンアップなし	12.1	–
EMR Lipid dSPE	5.3	56.2
dSPE を使用したジルコニア分離	6.0	50.4
C18 dSPE	7.8	35.5

マトリックス効果の評価

未処理のアセトニトリル抽出液と、EMR Lipid、C18、およびジルコニア充填剤でクリーンアップした 3 つの最終アセトニトリル抽出液におけるマトリックス効果の評価のために、動物用医薬品標準液のポストカラムインフュージョン (PCI) を使用しました。すべての分析対象成分を、LC サイクル全体にわたって監視しました。PCI サンプルクロマトグラムは、ポジティブモードとネガティブモードで監視された分析対象成分のマトリックス効果を反映しています。最終のアセトニトリル抽出液は、注入の前に希釈されていません。アセトニトリルは直接注入されました。PCI プロファイルは図 3 に示してあります。

赤いトレース線で示すように、いずれのクリーンアップも実施していない未処理の肝臓マトリックスブランクの注入で、かなりのマトリックス抑制 (低い方のベースライン) とマトリックス向上 (大きいピーク) が観察されました。これらのマトリックス効果は、メソッドの信頼性とデータ品質に、極めて大きい悪影響を及ぼします。それに対して、青いトレース線で示すように、EMR Lipid クリーンアップを使用した場合は大幅な改善が見られました。マトリックス抑制およびマトリックス向上が縮小していることが分かります。

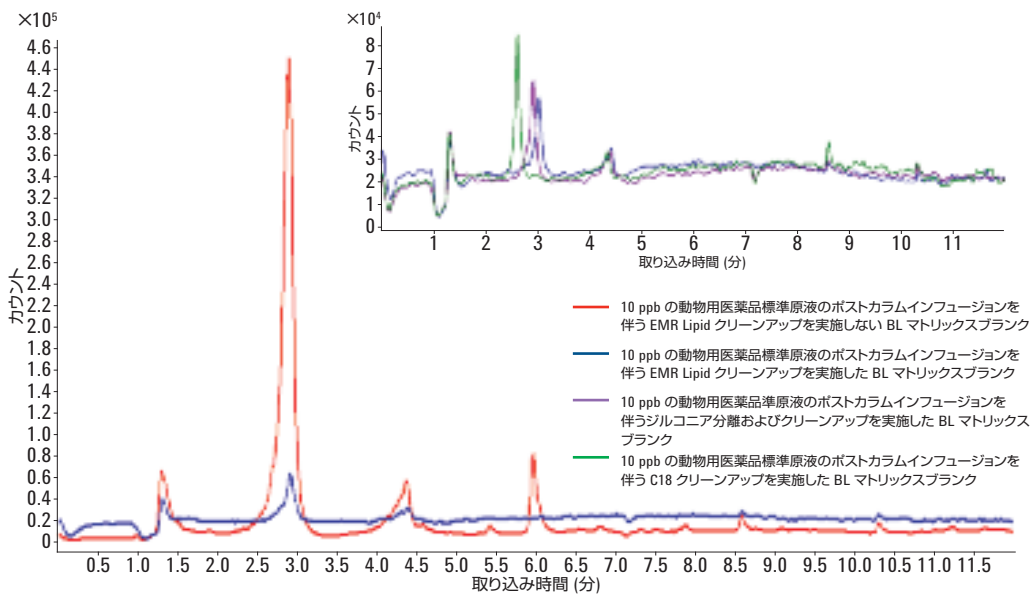


図 3. ポストカラムインフュージョンのプロファイルは、ウシ肝臓 (BL) マトリックスブランクサンプルを注入し、10 ppb の動物用医薬品標準溶液の同時ポストカラムインフュージョンを実施することによって生成しました。すべての分析対象成分を、クロマトグラフ分析のために監視しました。プロファイルは、監視されるすべての分析対象成分のトランジションを結合した全イオンクロマトグラムです。

図 3 のサンプルクロマトグラムのインサートは、異なるクリーンアップを使用してマトリックスブランクサンプルの注入を行った PCI プロファイルを示します。EMR Lipid のプロファイル (青) とジルコニア充填剤のプロファイル (紫) は似ています。C18 クリーンアップのプロファイル (緑) も、他の 2 つと似ていますが、マトリックス向上とマトリックス抑制の領域が大きくなっています。この比較は、重量測定の前抽出評価の比較 (EMR Lipid クリーンアップの方がジルコニア充填剤よりもややクリーンアップ効率が良いが、これらはどちらも C18 よりもクリーンアップ効率が良い) に相当します。

マトリックス効果を評価するために、ポストスパイクされたマトリックスサンプルと標準原液の間での分析対象成分の反応の比較も使用しました。ほとんどの分析対象成分について、分析対象成分の反応に目立った差はありませんでした。ただし、より疎水性のある、後から溶出した化合物については、C18 とジルコニア充填剤によってクリーンアップしたサンプルの方が、多くのマトリックス抑制が見られました。ほとんどの脂質夾雑物は遅く溶出されます。そのため、疎水性物質でのマトリックスイオン抑制が減少したことで、dSPE C18 およびジルコニア充填剤と比較して、共抽出された脂質を EMR Lipid が効率的に除去することが裏付けられています。図 4 では、EMR Lipid によるクリーンアップで、どのようにマトリックスイオン抑制効果が削減されたかについて、2 つの例を示しています。

メソッドの最適化

タンパク質沈殿ステップで使用した溶媒も調査しました。サンプルと有機物の比率が 1:3~1:5 である場合に、アセトニトリルがタンパク質を効率よく沈殿させること、および酸性アセトニトリルの方がタンパク質が沈殿しやすいことは知られています。BL は複雑なマトリックスであり、タンパク質の除去は、マトリックス除去のためだけでなく、効率的な EMR Lipid クリーンアップを促進するためにも非常に重要です。この調査では、1% および 5% の FA のアセトニトリル溶液を、タンパク質沈殿ステップとそれに続く EMR Lipid クリーンアップ、および LC/MS/MS による分析で評価しました。5% の FA のアセトニトリル溶液を使用すると、検量線に示すように精度が向上しました (図 5)。分析対象物の回収率も比較しました。ここでも 5% の FA のアセトニトリル溶液の方が精度が高くなっています。

水または緩衝液を追加して EMR Lipid 材料を活性化することは重要です。これにより、望ましくないサンプルマトリックス (特に脂質) との相互作用が改善され、効率的なマトリックス除去につながります。EMR Lipid によるクリーンアップ中に酢酸アンモニウム緩衝液 (5 mM) を使用した場合の効果も調査し、水を使用した場合と結果を比較しました。一般に、酢酸アンモニウム緩衝液を使用すると、テトラサイクリンを除く多くの分析対象物で、回収率が 5~10% 向上します。

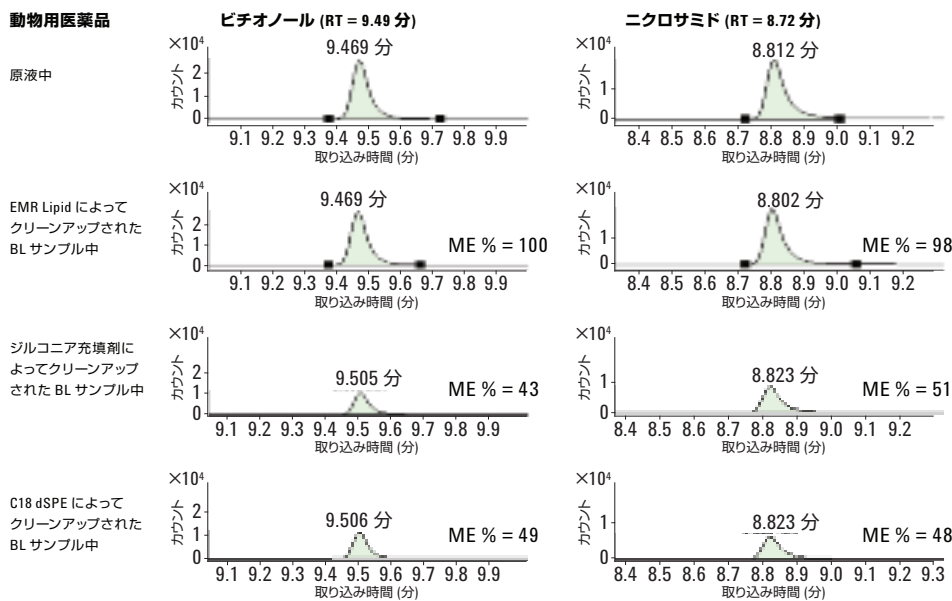


図 4. 疎水性物質でのマトリックスイオン抑制効果の比較マトリックス効果 (ME) は、ポストスパイク肝臓抽出物と、対応する標準原液におけるピーク面積の比率から計算しました。

タンパク質沈殿抽出で
使用された溶媒

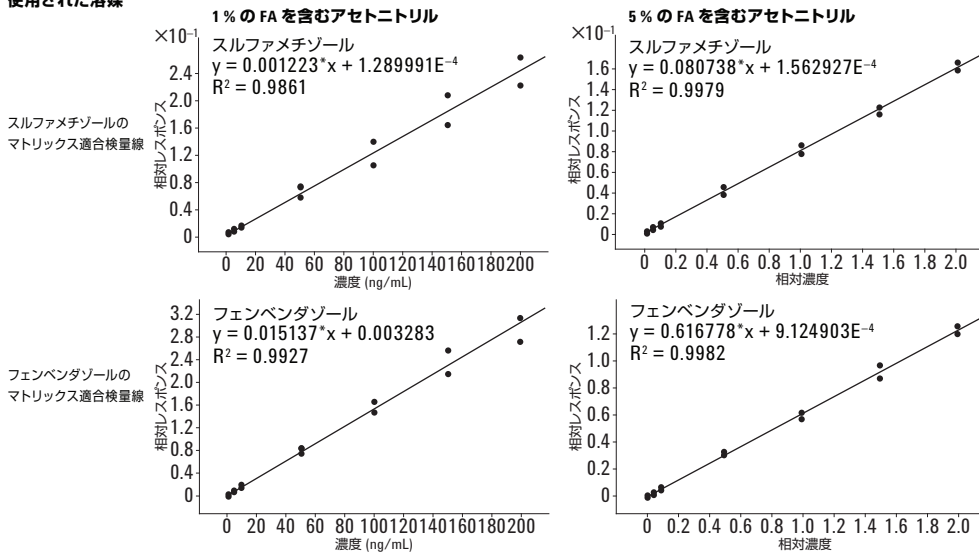


図5. タンパク質沈殿に1%のFAのアセトニトリル溶液を使用した場合と5%のFAのアセトニトリル溶液を使用した場合の検量線の直線性比較

これらの化合物の場合、緩衝液を使用すると、緩衝作用のない水を使用した場合と比較して、回収率が約5%低くなります。緩衝液を使用した場合と水を使用した場合に回収率に明らかな差がある分析対象成分を選択して、比較のために図6に示しています。緩衝液を使用すると分析対象物の回収率が向上することが多く、緩衝液を使

用したために失われるテトラサイクリンはごくわずかであるため、実験の残りの部分では5mMの酢酸アンモニウム緩衝液を使用しました。

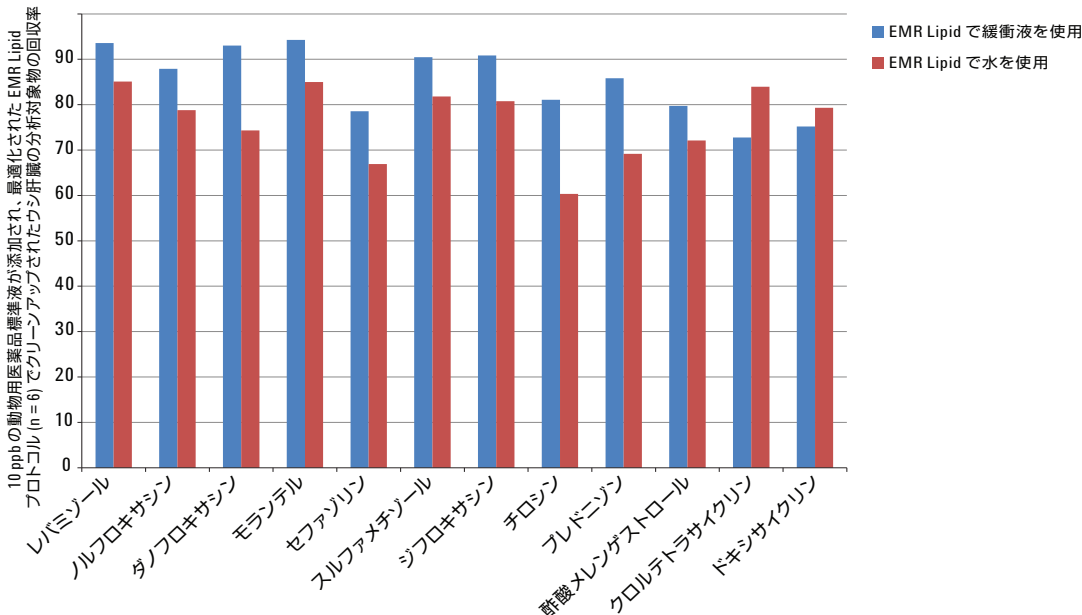


図6. Enhanced Matrix Removal dSPEによるクリーンアップのステップで5mMの酢酸アンモニウム緩衝液を使用した場合と水を使用した場合の分析対象物の回収率の比較

EMR Lipid によるクリーンアップ後は、上澄みはおよそ 1:1 のアセトニトリルと水性の混合物です。次に、5 mL の量の上澄みを、EMR Lipid 脱水キットに移します。脱水キットには、塩分配によって有機相と水性相を分離するために 2 g の塩混合物 (4:1 の $MgSO_4$ と NaCl) が入っています。このステップは、分離を実施するだけでなく、さらにマトリックスをクリーンアップすることを容易にし、また、溶解した余分な充填剤および塩を除去します。そのため、GC 分析と LC 分析の両方で、このステップを実行することを強くおすすめします。メソッド開発中に、テトラサイクリンを除くすべての分析対象成分で、良好な分析対象物の回収率と精度を達成しました。さらに調査して、テトラサイクリンの低い回収率 (45~68 %) は、塩分配ステップと関係していたことが分かりました。テトラサイクリンの逸失を減らすために、EMR Lipid の脱水用塩を使用しない代替プロトコル (図 7) を調査しました。手順は類似していますが、400 μ L の抽出物 (EMR Lipid dSPE から) と 600 μ L の水を小型バイアルで混合し、脱水ステップを使用せずに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した点は異なります。サンプルを、微小遠心管で 3 分間 13,000 rpm で遠心分離し、次に LC/MS/MS 分析のために上澄みを 2 mL のサンプルバイアルに移しました。混合と希釈のステップの前に、マトリックスブランクでの標準液と IS のポストスパイクが実施されました。分離用の塩が使用されなかったため、このプロトコルは分離を行わないものと見なすことができます。

図 8 に示す結果から、この代替プロトコルを使用するとテトラサイクリンの回収率を大幅に改善できることが分かります。ただし、テトラサイクリンに脱水プロトコルを使用した結果 (図 2 に示す) も許容できます。精度が定量の精度であるためです。適切な安定した標識内部標準を使用して、低い回収率を是正することができます。この実験では、EMR Lipid によるクリーンアップ後に、脱水なしの代替プロトコル用に抽出されたサンプルを分割しました。そして、テトラサイクリン (オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、およびドキシサイクリン) について、代替プロトコルによる 3 つの結果を報告しました。

メソッドの比較

次に、最適化された EMR Lipid メソッドを、従来からの QuEChERS メソッド (C18 dSPE によるクリーンアップおよびジルコニア充填剤によるクリーンアップ) と比較しました。QuEChERS は、分析対象または残留物抽出に頻繁に使用され、dSPE クリーンアップステップを使用します。図 9 に、統計的に回収率を比較した結果を示しています。図 10 には、問題のある分析対象成分を選択して比較した結果を示しています。最適化された EMR Lipid プロトコルは、特に、フルオロキノロン系とテトラサイクリン系での回収率の低いジルコニア充填剤と比較して、問題のある分析対象成分の回収率と精度を大幅に改善します。オキシテトラサイクリンおよびニコロサミドのみが、それぞれ 67 % および 68 % という絶対回収率を示します。ただし、6 回繰り返した場合

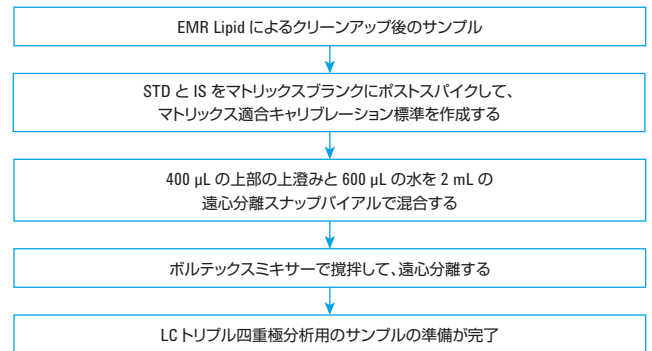


図 7. テトラサイクリンの回収率を改善するための、Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップ後のオプション手順

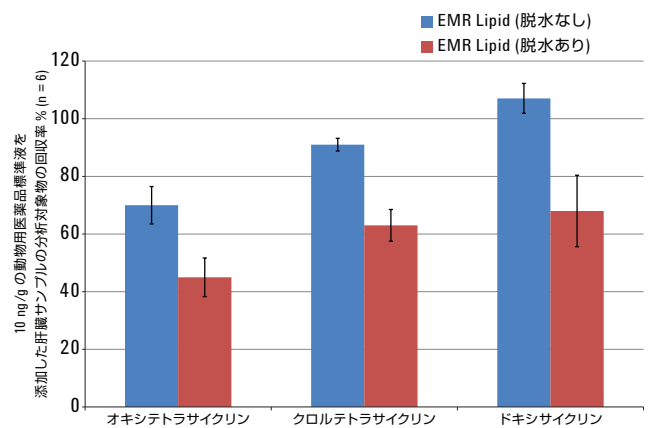


図 8. Agilent Bond Elut EMR Lipid によるクリーンアップの後に、脱水ステップを使用して調製した場合と脱水ステップを使用せずに調製した場合の、肝臓サンプルのテトラサイクリンの回収率と精度の比較

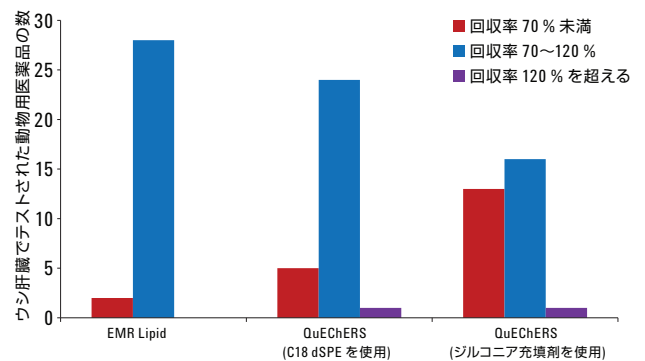


図 9. Agilent Bond Elut EMR Lipid プロトコルと従来からの QuEChERS プロトコルを比較するための統計的な回収率の比較

これらの2つの化合物の精度は、それぞれRSDが12.8%および2.0%であり、許容できるものでした。SANCO ガイドラインに基づいて許容できると見なされます [9]。これらの結果は、C18 およびジルコニア充填剤を使用する dSPE を採用した他の2つのプロトコルでの結果よりも優れています。

メソッドバリデーション

最適化された EMR Lipid メソッドは、サンプル前処理のセクションで説明されているメソッドを使用して、定量バッチ全体を実行することによって検証しました。真度と精度の定量的のために、内部標準 (ポジティブモードとネガティブモードのフルニキシン-d₃) を使用しました。フルニキシン-d₃ の絶対回収率は 90~100% でした。そのため、真度は絶対回収率と密接に対応しています。表 4 に定量の結果を示しま

す。真度の要約 (図 11) は、異なる 4 つのレベル (G1 では 10、50、250、および 750 ppb、G2 では 2、10、50、および 150 ppb、キャリブレーション標準のセクションを参照) でレベルごとに 6 回の分析を繰り返して、24 個の QC の真度および精度を測定することによって生成しました。93% の分析対象成分で、良好な RSD が得られ、許容できる真度 (70~120%) を達成しました。例外として 2 つの許容範囲外の値があり、回収率がわずかに 70% を下回っていました。各レベルでの 6 回の繰り返しの RSD 値は非常に良好で、ほとんどの化合物で 10% を下回りました。BL ブランクでラクトパミンおよびケトプロフェンが低いレベルで検出され、キャリブレーション範囲が修正されたことに注意してください。

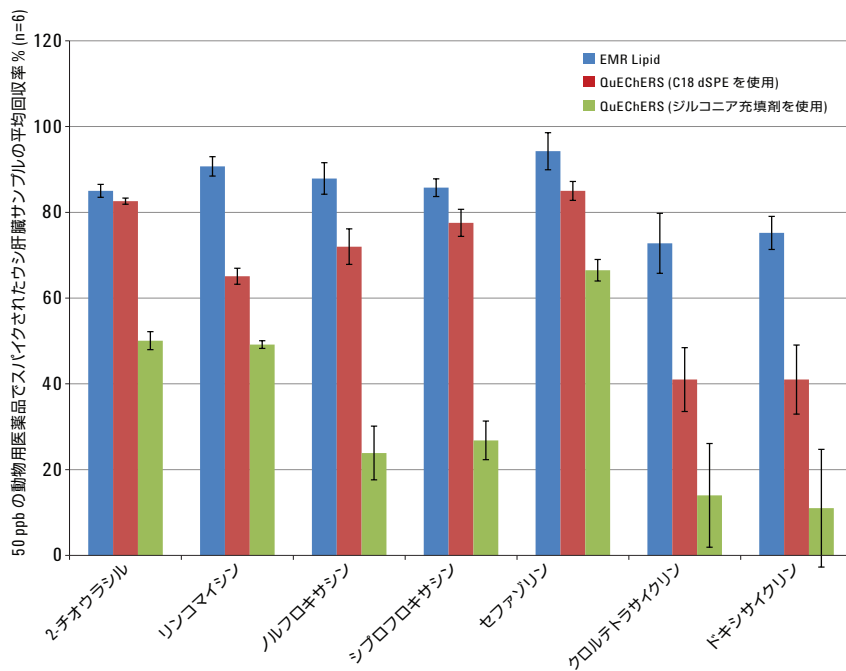


図 10. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid プロトコルを従来のプロトコルと比較した、選択された分析対象物の回収率の結果

クロルテトラサイクリンとドキシサイクリンの結果は、図 6 に示す代替プロトコルから生成されました。残りの化合物では、図 1 のプロトコルを使用。

表 4. Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid を使用したターゲット化合物の定量結果。各分析対象成分は、4つの濃度レベルで、レベルごとに6回繰り返して評価

グループ 番号	分析対象成分	検量線 帰帰適合/ 重量	R ²	キャリブ レーション 範囲 (ng/g)	メソッドの回収率および精度 (ng/g QCs)											
					2		10		50		150		250		750	
					回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD
1	2-チオウラシル	直線、1/x	0.9976	5-1,000	--	--	106.6	4.9	93.6	5.4	--	--	87.0	3.0	85.4	8.3
1	アモキシシリン	直線、1/x	0.9978	5-1,000	--	--	65.9	12.1	74.3	8.8	--	--	79.5	4.1	79.7	4.8
1	ミソニダゾール-OH	直線、1/x	0.9981	5-1,000	--	--	92.6	15.1	89.4	6.6	--	--	89.4	3.5	89.7	3.3
1	オキシテトラサイクリン	直線、1/x	0.9963	5-1,000	--	--	73.9	19.1	71.2	14.0	--	--	67.0	12.8	63.4	9.0
1	セファゾリン	直線、1/x	0.9966	5-1,000	--	--	72.1	9.4	81.2	2.7	--	--	86.7	3.8	82.9	3.0
1	ジフロキサシン	直線、1/x	0.9978	5-1,000	--	--	79.0	8.3	86.5	5.9	--	--	104.4	5.1	97.7	6.3
1	クロルテトラサイクリン	直線、1/x	0.9928	5-1,000	--	--	100.6	14.1	96.9	9.5	--	--	93.8	14.0	85.0	11.6
1	ドキシサイクリン	直線、1/x	0.9972	5-1,000	--	--	118.9	12.0	102.7	10.0	--	--	110.0	7.7	104.5	8.6
1	フルルフェニコール	直線、1/x	0.9942	5-1,000	--	--	103.4	6.2	107.9	6.0	--	--	115.2	13.5	107.0	4.0
1	クロラムフェニコール	直線、1/x	0.9962	5-1,000	--	--	103.6	6.6	107.1	7.9	--	--	113.7	9.8	100.9	5.2
1	クロルスロン	直線、1/x	0.9954	5-1,000	--	--	77.9	10.3	104.4	6.0	--	--	102.2	7.1	94.3	3.3
1	プレドニゾン	直線、1/x	0.9984	5-1,000	--	--	105.9	9.1	92.1	11.1	--	--	103.9	10.5	94.5	2.3
1	オキシフェンブタゾン	直線、1/x	0.9903	5-1,000	--	--	93.6	3.4	91.9	5.2	--	--	93.7	5.6	97.0	4.6
1	酢酸メレンゲストール	直線、1/x	0.9994	5-1,000	--	--	70.6	1.4	77.3	3.0	--	--	82.8	2.1	77.1	2.6
1	ビチオノール	二次曲線、1/x	0.9981	5-1,000	--	--	69.4	6.2	90.4	2.9	--	--	91.3	4.3	83.1	3.7
2	レバミゾール	直線、1/x	0.9967	1-200	84.5	11.3	95.5	5.1	103.8	5.2	89.4	9.7	--	--	--	--
2	リンコマイシン	直線、1/x	0.9950	1-200	89.5	16.4	79.6	10.6	74.1	4.5	74.8	11.2	--	--	--	--
2	ノルフロキサシン	直線、1/x	0.9960	1-200	89.5	9.7	89.2	4.7	95.8	7.4	93.5	7.2	--	--	--	--
2	シプロフロキサシン	直線、1/x	0.9980	1-200	81.0	5.6	83.6	6.9	96.9	4.1	99.5	5.9	--	--	--	--
2	ダノフロキサシン	直線、1/x	0.9985	1-200	78.2	7.8	86.2	5.8	99.5	7.8	96.9	4.8	--	--	--	--
2	ラクトバミン	直線、1/x	0.9961	10-200 ^b	--	--	98.1	15.5	105.0	10.4	102.5	6.8	--	--	--	--
2	モランテル	直線、1/x	0.9960	1-200	89.5	4.9	95.1	4.5	101.0	8.6	94.1	7.4	--	--	--	--
2	スルファメチゾール	直線、1/x	0.9928	1-200	85.7	14.6	89.2	8.1	93.9	4.9	88.0	10.4	--	--	--	--
2	スレファメトキシピリダジン	直線、1/x	0.9973	1-200	84.7	8.1	84.4	2.9	89.9	5.7	84.9	6.2	--	--	--	--
2	チロシン	直線、1/x	0.9967	1-200	80.6	11.2	75.6	2.7	71.0	4.5	65.3	2.3	--	--	--	--
2	アセトプロマジン	直線、1/x	0.9973	1-200	74.1	6.3	73.5	3.0	77.2	4.9	75.2	5.3	--	--	--	--
2	クオルプロマジン	直線、1/x	0.9967	1-200	66.1	6.1	67.8	3.8	73.4	4.3	72.7	6.5	--	--	--	--
2	フェンベンダゾール	直線、1/x	0.9988	1-200	74.6	7.7	82.3	4.6	97.9	9.9	84.9	3.5	--	--	--	--
2	ケトプロフェン	直線、1/x	0.9978	5-200 ^c	--	--	88.3	7.2	98.1	6.9	94.5	3.8	--	--	--	--
2	ニクロサミド	直線、1/x	0.9996	1-200	60.0	15.3	66.6	4.7	71.7	2.0	67.6	3.1	--	--	--	--

^a グループ1の分析対象成分では、キャリブレーション範囲は5~1,000 ng/g、QCスパイクレベルは10、50、250、および750 ng/gです。グループ2の分析対象成分では、キャリブレーション範囲は1~200 ng/g、QCスパイクレベルは2、10、50、および150 ng/gです。

^b BLコントロールブランクでラクトバミンが検出されたために修正されたキャリブレーション範囲。

^c BLコントロールブランクでケトプロフェンが検出されたために修正されたキャリブレーション範囲。

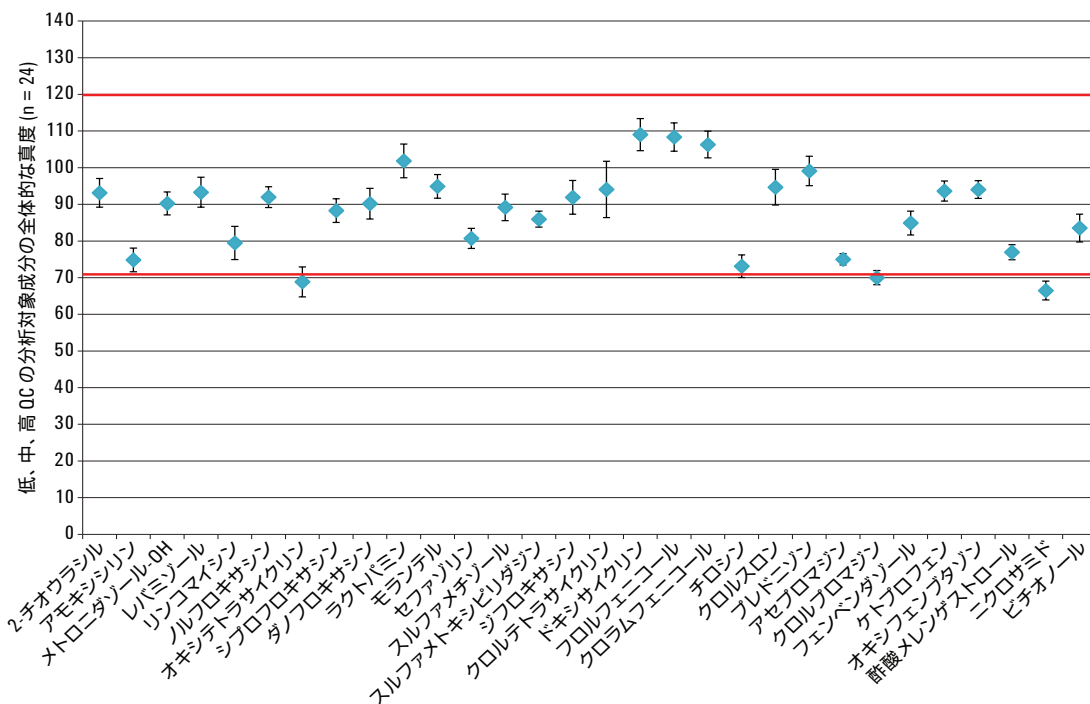


図 11. 最適化された Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal Lipid プロトコルを使用して BL 中で分析された 30 種の代表的な動物用医薬品の定量。真度および精度のデータは、4 つの異なるスパイクレベルで合計 24 回分析を繰り返して計算 (各レベルで n = 6)。エラーバー = 95 % CI。3 種のテトラサイクリン化合物の結果は、図 6 に示す代替プロトコルから生成。残りの化合物では、図 1 のプロトコルを使用。

結論

タンパク質沈殿抽出と、それに続いて Agilent Bond Elut EMR Lipid および EMR Lipid 脱水クリーンアップを使用する、迅速で信頼性が高く堅牢なメソッドを、BL 内の複数の動物用医薬品の残留の分析用に最適化して検証しました。マトリックス効果を慎重に評価し、従来の C18 dSPE およびジルコニア充填剤によるクリーンアップと比較しました。最適化された EMR Lipid メソッドにより、優れたマトリックスクリーンアップが実施され、このタイプの用途で非常に高い回収率と精度を実現したことが、結果に示されています。

注入の前に水で直接希釈することにより、LC/MS/MS でサンプルを検査できるようにして、早い段階で溶出する化合物のピークの完全性を維持したことに注目してください。この実験で使用した LC/MS/MS システムでは、検出限界要件を満たしたまま、直接サンプル希釈を使

用するために十分な感度が提供されました。乾燥して再溶解するという一般的な手法と比較して、このワークフローでは、大幅に時間と労力を節約し、また発生しうる偏差と分析対象成分の逸失を回避しました。機器の感度が、直接サンプル希釈で求められるニーズを満たしていない場合でも、最後にサンプルを濃縮するステップを検討する必要があります。これは通常、サンプルの蒸発と再溶解によって実現します。この応用例は、EMR Lipid を使用した選択的マトリックス除去を使用すると、BL などの複雑なサンプルの場合に非常に有利なることを示しています。サンプルがよりクリーンになり、動物用医薬品の多成分残留物について回収率と精度が向上するためです。

他の複雑で高脂質のマトリックスおよびターゲット化合物に関しても、EMR の利点を生かした活用が期待できます。

参考文献

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000*; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC. www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, May 2012*; Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. *J. Anal. Chem.* **2005**, 5, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggiane, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

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.,

2015 Printed in Japan

August 4, 2015

5991-6096JAJP



Agilent Technologies

Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ クリーンアップおよび LC/MS/MS を 用いた牛肉中の残留動物用医薬品の 多成分同時分析

著者

Limian Zhao and Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent EMR-Lipid の第 2 世代の製品である Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) カートリッジは固相抽出 (SPE) フォーマットになっており、分析対象物の回収率には影響を与えずに高い選択性で脂質を除去します。SPE カートリッジにより通過型クリーンアップワークフローが容易になるため、メソッド開発に必要な労力は最低限に抑えられます。チューブはハンズフリーの自然落下溶出が円滑にできるよう最適化されており、減圧や加圧をしなくても大容量のサンプルクリーンアップが実施できます。脂質の保持を効率化して疎水性化合物の回収率を増大させるために、20% の水を添加してクリーンアップ用の EMR 充填剤を活性化させる必要があります。この研究では、牛肉内の代表的な 39 種類の動物用医薬品の分析において、Captiva EMR-Lipid を使用する方法について説明します。親水性および疎水性の両方の化合物に対して十分な回収率を達成するために、2 ステップのサンプル抽出を用いました。次に、クリーンアップのために抽出物を混合して Captiva EMR-Lipid カートリッジに注入しました。マトリックス効果、分析対象物の回収率、および再現性でメソッドの評価をしました。Captiva EMR-Lipid カートリッジは、他社のカートリッジ通過型クリーンアップ製品と比較した場合、疎水性物質のマトリックスクリーンアップ効率が高く、回収率も良好でした。

はじめに

動物用医薬品は、動物の病気の予防のため、または成長促進のために動物性食品に対して広く使用されています。これらの薬品は、動物の組織に蓄積します。不適切な使い方をすると、薬品の残留物が可食組織に蓄積する可能性があります。これは人間の健康に対するリスクになることが知られています。食品安全性への関心が高まっているため、多数の国において動物性食品の生産で使用される動物用医薬品に規制が課されています^{1,2}。筋肉、肝臓、卵などの動物性食品は複雑なマトリックスであるため、機器による分析を実施する前のサンプル抽出、クリーンアップ、および濃縮（必要な場合）において、効率的な前処理メソッドを使用することが重要になります。確立されたサンプル前処理メソッドとしては、従来から行われている溶媒抽出、固相抽出 (SPE)、または複数の手法の組み合わせなどがあります。それらのメソッドは、通常、作業量が多く、時間がかかり、限られた種類の化合物のみに適しており、メソッド開発も必要となります。

複数の種類の多成分残留物を対象とするメソッドが、法規制に基づく監視プログラムでますます使用されるようになっていきます。分析範囲が広く、ラボの効率を向上させるためです。過去数年の文献では、100 種類を超える動物用医薬品に関する分析結果が報告されています³⁻⁵。サンプル前処理では、通常、アセトニトリル (ACN) と水の混合液を使用した前抽出が行われ、続いて C18 クリーンアップまたはその他のクリーンアップ手法を組み合わせたものが実施されます。ただし、現在のクリーンアップ手法では、脂質除去の効率が悪かったり、分析対象物を損失したりすることがあり、限界があります。ACN と水の混合液による直接抽出では、タンパク質除去効率と抽出ステップ時の疎水性物質の抽出効率が低下する場合があります。

Agilent Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) dSPE クリーンアップは、2015 年に発表されて以来大きな注目を集めています。EMR-Lipid 充填剤は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせたメカニズムを用いて、特に脂質化合物の枝分かれのない炭化水素鎖と相互作用します。この組み合わせメカニズムにより、ターゲット化合物には悪影響を与えずに高い選択性で脂質を除去します。この技術は、複雑なマトリックスの複数の種類の多成分残留物分析に使用されており、優れたマトリックスクリーンアップと最適な結果を達成しています^{6,7}。第 2 世代の製品である Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジでは、充填剤の活性化に必要な水の比率が低減されており、その後の最終精製ステップも必要ありません。これによりワークフローが簡素化され、クリーンアップ時の疎水性化合物の溶解度が向上します。

この研究では、牛肉内の代表的で分析困難な 39 種類の動物用医薬品の分析において、サンプル前処理時に Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを使用する方法について調査します。代表的な動物用医薬品は 17 の異なるクラスから選択しました。この中には、親水性および疎水性医薬品、酸性、中性、および塩基性医薬品、そして最も分析困難ないくつかのクラス（テトラサイクリン、 β -ラクタムなど）が含まれています。表 1 に、これらの動物用医薬品の分析における、薬物クラス、法規制情報、リテンションタイム、および MS/MS 条件を示します。

分析方法

試薬および薬品

試薬および溶媒はすべて 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) は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から入手しました。ジメチルスルホキシド (DMSO) とエチレンジアミン四酢酸、ジナトリウム塩、脱水剤 (NaEDTA) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。試薬グレードのギ酸 (FA) は Agilent から入手しました (部品番号 G2453-86060)。動物用医薬品標準と内部標準は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

溶液および標準試料

標準と内部標準 (IS) の原液は DMSO を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。ただし、次の例外があります。

- ダノフロキサシンの原液は DMSO を使用して 1.0 mg/mL で作成しました。
- シプロフロキサシンの原液は DMSO を使用して 0.25 mg/mL で作成しました。

すべての β -ラクタム医薬品とセファゾリンの原液は、水を使用して 2.0 mg/mL で作成しました。原液はすべて茶色ガラスバイアルで前処理しましたが、 β -ラクタム医薬品、セファゾリン、およびテトラサイクリン医薬品の原液については、ポリプロピレンプラスチックチューブで前処理しました。すべての溶液は -20°C で保管しました。39 種類の化合物は、機器での応答に基づいてグループ 1 (G1) およびグループ 2 (G2) という 2 つのグループに分けました。2 つの混合標準作業液 25:5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 5:1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G1/G2) は、1:1 ACN/水混合液で前処理しました。フルニキシン-d3 IS の 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作業液は、1:1 ACN/水混合液で前処理しました。

冷却した抽出溶媒は、2 mL のギ酸と 2 mL の DMSO を 100 mL の予冷 ACN に毎日添加して前処理しました。0.1 M の NaEDTA 溶液は、Milli-Q 水 50 mL 中に NaEDTA 1.8612 g を溶解して作成しました。この溶液は室温で保管しました。80:20 の ACN/水混合液は、ACN 80 mL と Milli-Q 水 20 mL を混合して作成しました。

表 1. 分析用に選択した動物用医薬品、薬物クラス、米国の許容値、リテンションタイム、および MRM 条件の一覧

分析対象物	薬物クラス	米国の許容値 (µg/g)	リテンションタイム (分)	極性	プリカー Сайオン (m/z)	プロダクトイオン			
						定量イオン	CE (V)	定性イオン	CE (V)
2-チオウラシル	Thyreostat	–	1.41	負	127	57.9	17	–	–
アモキシシリン	β-ラクタム	0.01	1.94	正	366.1	349.2	5	114	25
メトロニダゾール-OH	ニトロイミダゾール	^d	2.21	正	188.1	123.1	9	126.1	13
リンコマイシン	リンコサミド	0.1 ^e	3.80	正	407.2	126.1	37	70.1	80
レバミゾール	駆虫薬	0.1 ^f	3.90	正	205.1	178.1	21	91.1	41
ミノサイクリン	テトラサイクリン		4.14	正	458.2	440.9	17	282.9	49
アンピシリン	β-ラクタム	0.01	4.15	正	350.1	106	33	79.1	61
ノルフロキサシン	フルオロキノロン	^d	4.36	正	320.1	276.1	17	302.2	21
オキシテトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	4.42	正	461.2	426.1	17	443.2	9
シプロフロキサシン	フルオロキノロン	^d	4.43	正	332.1	231	45	314.3	21
テトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	5.37	正	445.2	409.9	17	153.9	33
ダノフロキサシン	フルオロキノロン	0.2 ^{h,f}	4.53	正	358.2	340.2	21	81.9	53
ラクトバミン	β-アゴニスト	0.03 ^f	4.55	正	302.2	107	33	77	77
セファゾリン	セファロスポリン	–	4.78	正	455	323.1	9	156	13
スルファメチゾール	スルホンアミド	–	4.88	正	271	156.1	13	92	29
スルファメトキシピリダジン	スルホンアミド	–	4.91	正	281.1	92	33	65.1	57
デメクロサイクリン	テトラサイクリン	–	4.94	正	465.1	429.9	21	448.0	13
ジフロキサシン	β-ラクタム	–	4.97	正	400.2	356.3	17	382.0	25
モランテル	駆虫薬	–	5.08	正	221.1	123.1	37	76.9	80
ガミスロマイシン	マクロライド	0.15	5.22	正	777.6	157.9	41	83.1	65
クロルテトラサイクリン	テトラサイクリン	2 ^e	5.24	正	479.1	444.2	21	462.1	17
ドキシサイクリン	テトラサイクリン	–	5.36	正	445.2	428.1	17	410.2	25
フロルフェニコール	フェニコール	0.2 ^e	5.69	負	356.0	336.0	5	185.1	13
クロラムフェニコール	フェニコール	^d	5.86	負	321	152	17	257.1	9
タイロシン	マクロライド	0.2 ^g	5.94	正	916.5	173.9	45	772.5	33
ブレドニゾン	コルチコステロイド	–	6.02	正	359.2	147.2	33	341.2	9
クロルスロン	フルキンド	0.1 ^f	6.09	負	377.9	341.9	9	–	–
アセトプロマジン	トランクライザー	–	6.09	正	327.2	86	21	58	45
クロルプロマジン	トランクライザー	–	6.69	正	319.1	86	21	58.1	45
ペニシリン V	β-ラクタム	0.05 ^a	6.70	正	351.6	160.1	9	113.9	45
オキサシリン	β-ラクタム	–	6.93	正	402.1	160.0	17	242.9	9
フェンベンダゾール	駆虫薬	–	6.98	正	300.1	268.1	25	159.1	41
クロキサシリン	β-ラクタム	0.01 ^a	7.20	正	436.1	159.9	9	276.8	13
ナフシリン	β-ラクタム	–	7.35	正	415.1	199.0	13	171.0	41
ケトプロフェン	トランクライザー	–	7.44	正	255.1	208.9	13	77	57
オキシフェンブタゾン	NSAID	–	7.47	負	323.1	295	17	133.9	25
フルニキシン-d3 (負)	–	–	7.81	負	298.1	254.2	17	192	37
フルニキシン-d3 (正)	–	–	7.81	正	300.1	282	25	264	41
酢酸メレンゲストロール	その他	0.025 ^b	9.05	正	397.2	279.2	21	337.4	13
ニコロサミド	フルキンド	–	9.07	負	325	170.9	25	289.1	13
ピチオノール	フルキンド	–	9.07	負	352.9	161	21	191.8	25

^a ウンの未調理の可食組織における許容値

^b ウンの肝臓における許容値

^c ブタの筋肉における許容値

^d 適用外使用の禁止

^e クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、筋肉内のテトラサイクリンを含むテトラサイクリンの残量物の合計における許容値

^f ウンの筋肉における許容値

^g 未調理のウンの脂肪、筋肉、肝臓、および腎臓における許容値

^h ウンの脂肪における許容値

装置と材料

分離には次の機器で構成される Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity サーモスタット付きカラムコンパートメント (G1316C)

UHPLC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオンソース付きの Agilent G6490 トリプル四重極質量分析装置に連結しました。データの取得と分析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理に用いたその他の装置

- 2010 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)
- Multi Reax 試験管シェーカー (Heidolph、シュヴァーバツハ、ドイツ)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ、6 mL、600 mg (部品番号 5190-1004) および 3 mL、300 mg (部品番号 5190-1003)
- Agilent Vac Elut SPS 24 マニホールド、16 × 100 mm 試験管用コレクションラック付き (部品番号 12234004)

分析条件

図 1 に、A) 牛肉抽出物マトリックスブランク、および B) 5:1 ng/g (G1/G2) 動物用医薬品標準が添加された牛肉抽出物 (定量下限レベル) のクロマトグラムを示します。

サンプル前処理

図 2 に、牛肉サンプルを前処理するための最終サンプル前処理手順を示します。牛肉サンプルに対して最適化した抽出とクリーンアップメソッドを実施するために、次の点を強調しておく必要があります。

- メソッド開発とバリデーションには、地域の食料品店で購入した牛肉を使用しました。サンプルはホモジナイズして -20 °C で保管しました。
- ホモジナイズした牛肉サンプルに標準物質と IS をプレスパイクした後、サンプルを室温で 20 分間置いたままにしました。これにより、スパイクした標準をサンプルマトリックスに浸潤させ、サンプル抽出の前に平衡化させました。
- 牛肉と均一に混合させるためにはサンプル抽出で水を使用する必要がありますが、これで極性医薬品化合物の回収率と安定性が保証されます。20:80 水 /ACN 混合液で 1 ステップ抽出する場合には、疎水性化合物の溶媒抽出効率とタンパク質除去効率が大幅に低減します。このため、2 mL 水性抽出後に 8 mL 溶媒抽出を実施するという 2 ステップの抽出プロトコルを使用しました。

HPLC 条件

パラメータ	設定値												
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、150 × 2.1 mm、2.7 μm (部品番号 693775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 UHPLC ガード、5 × 2.1 mm、2.7 μm (部品番号 821725-911)												
流量	0.3 mL/min												
カラム温度	40 °C												
オートサンブラ温度	4 °C												
注入量	3 μL												
移動相	A) 0.1 % FA 水溶液 B) 0.1 % FA アセトニトリル溶液												
ニードル洗浄	1:1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O と 0.2 % FA												
グラジエント	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> <th>流量 (mL/min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>10</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>10</td> <td>0.3</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>100</td> <td>0.3</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	流量 (mL/min)	0	10	0.3	0.5	10	0.3	8.0	100	0.3
時間 (分)	%B	流量 (mL/min)											
0	10	0.3											
0.5	10	0.3											
8.0	100	0.3											
ストップタイム	12 分												
ポストタイム	3 分												

MS 条件

パラメータ	設定値										
ポジティブ/ネガティブモード											
ガス温度	120 °C										
ガス流量	14 L/min										
ネブライザ	40 psi										
シースガスヒーター	400 °C										
シースガス流量	12 L/min										
キャピラリー	3,000 V										
iFunnel パラメータ	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>正</th> <th>負</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>高圧 RF</td> <td>90 V</td> <td>90 V</td> </tr> <tr> <td>低圧 RF</td> <td>70 V</td> <td>60 V</td> </tr> </tbody> </table>		正	負	高圧 RF	90 V	90 V	低圧 RF	70 V	60 V	
	正	負									
高圧 RF	90 V	90 V									
低圧 RF	70 V	60 V									

- キレート化によるテトラサイクリン化合物の損失を防ぐために、水性抽出には 0.1 M EDTA 緩衝液を使用しました。
- テトラサイクリン、β-ラクタム、フルオロキノロンなどの分析困難な医薬品化合物の溶媒抽出効率を向上させるために、2 % ギ酸と 2 % DMSO を抽出溶媒 ACN に加えました。
- 特に最初の水性抽出ステップでの固体残留物による相分離を向上させるために、冷却遠心分離 (4 °C) を使用しました。
- 分析対象物がカートリッジから完全に溶出するように、EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップ後に二次的溶出を実施しました。

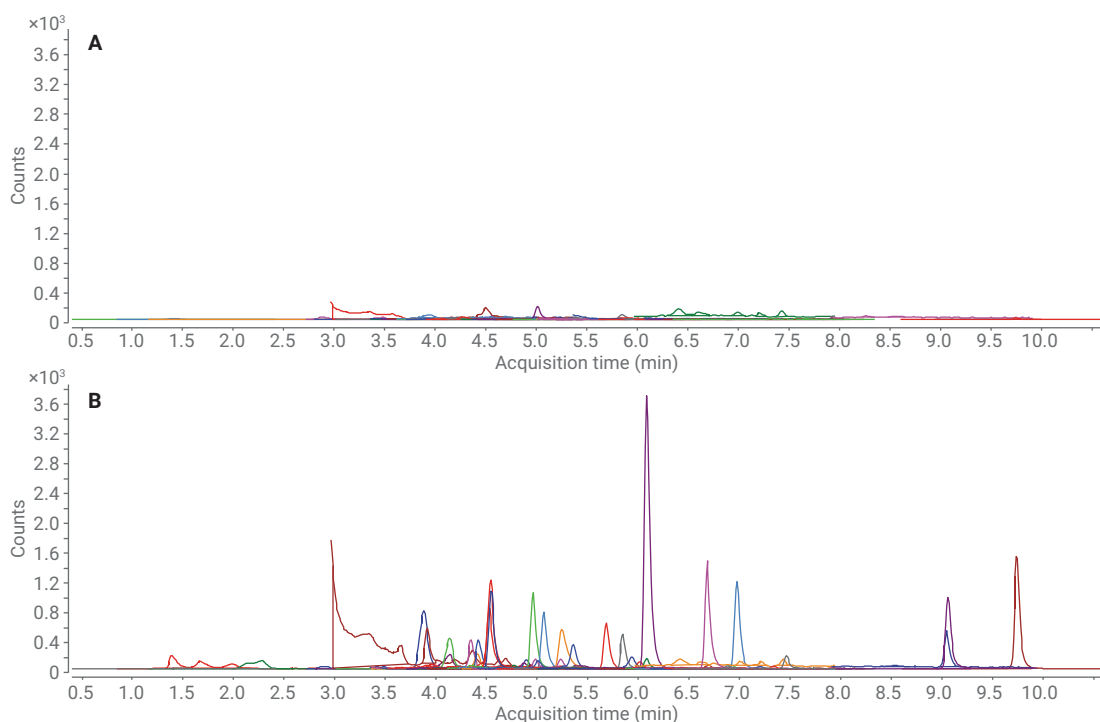


図 1. A) 牛肉抽出物マトリックスブランク、および B) 5:1 ng/g (G1/G2) 動物用医薬品標準が添加された牛肉抽出物の LC/MS/MS クロマトグラム。グループ 1 (G1) 分析対象物は 5 ng/g 添加レベルに対応し、グループ 2 (G2) 化合物は 1 ng/g 添加レベルに対応。溶出順序による分析対象物の同定については表 1、化合物のグループの同定については表 2 を参照

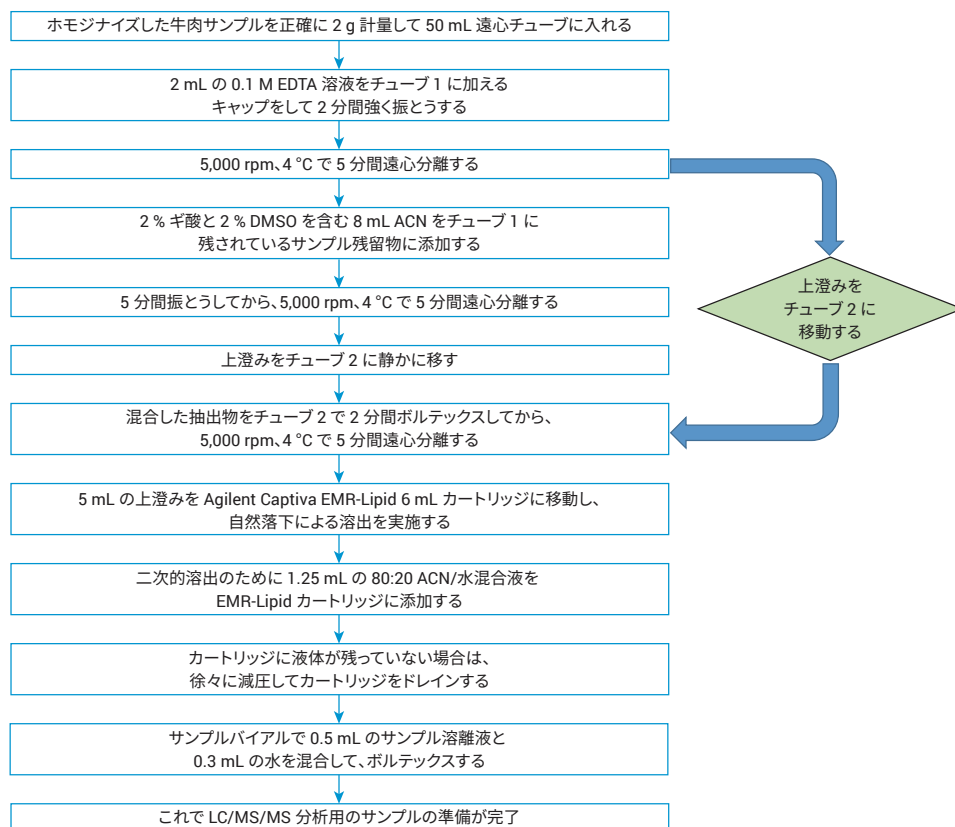


図 2. Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジを使用した牛肉のサンプル抽出とその後のクリーンアップ手順

キャリブレーション標準と品質管理 (QC) サンプル

適切な標準作業液を、低、中、高レベルでホモジナイズした牛肉サンプルにスパイクすることにより、プレススパイクした QC サンプルを 6 点ずつ作成し、繰り返し再現性を調べました。

- G1 分析対象物については、スパイクレベルを 10、50、および 750 ng/g に設定しました。
- G2 分析対象物については、スパイクレベルを 2、10、および 150 ng/g に設定しました。

高レベル QC サンプルのスパイクには標準 25:5 µg/mL (G1/G2) 作業液を使用し、低および中レベル QC サンプルのスパイクには 5:1 µg/mL (G1/G2) 標準溶液を使用しました。IS 溶液をマトリックスブランク以外のすべてのサンプルに、フルニキシン-d3 200 ng/g に相当する濃度でスパイクしました。

カートリッジによるクリーンアップ後に、適切な標準と IS 作業液をマトリックスブランク溶離液にスパイクすることにより、マトリックス適合検量標準およびポストスパイク QC サンプルを前処理しました。キャリブレーション標準のスパイク濃度は 5、25、50、250、750、および 1,000 ng/g (G1) または 1、5、10、50、150、および 200 ng/g (G2、牛肉内)、および 200 ng/g (IS) で、ポストスパイク QC サンプルのスパイク濃度は 10、50、および 750 ng/g (G1) または 2、10、および 150 ng/g (G2) でした。

共溶出量の測定

EMR-Lipid カートリッジおよび他社のカートリッジによるクリーンアップでの共溶出残留物を重量測定法で測定しました⁵。共溶出残留物の重量を 1 mL の ACN 最終抽出物に基づいて計量すると同時に、クリーンアップによるマトリックス共溶出除去効率を、カートリッジによるクリーンアップを実施した場合と実施しない場合の共溶出残留物の重量の差の割合を比較することにより計算しました。

マトリックス効果の評価

ポストカラムインフュージョンの試験により、クロマトグラフのマトリックス効果を評価しました。10 ng/mL の動物用医薬品の標準原液の同時ポストカラムインフュージョンを 90 µL/min で実行して、マトリックスブランクサンプルを注入しました。化合物のすべてのトランジションを、クロマトグラフウィンドウ全体にわたって監視しました。

カートリッジによるクリーンアップを用いた分析対象物の回収率の評価

カートリッジによるクリーンアップ前に標準を牛肉抽出物ブランクにプレススパイクし、カートリッジによるクリーンアップ後に標準を牛肉抽出物ブランク溶離液にポストスパイクすることにより、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響を評価しました。得られた回収率の結果は、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響のみを反映しており、抽出方法におけるその他の影響は除外されています。つまり、分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響が直接比較されています。EMR-Lipid カートリッジ 3 mL および 6 mL を対応する他社のカートリッジと比較しました。3 mL カートリッジの場合、サンプルロード量は 2.5 mL、二次的溶出量は 0.625 mL でした。

メソッドバリデーション

キャリブレーションの再現性を確認するために、QC サンプルの前後で実施した 2 つの別の検量線を用いた全定量バッチを実行することにより、開発したメソッドをバリデーションしました。

結果と考察

カートリッジクリーンアップの使いやすさ

複雑なサンプルマトリックスクリーンアップに Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用する重要なメリットは使いやすさです。EMR-Lipid 充填剤は、分析対象物ではなく不要な脂質干渉を対象としており、通過型手法が導入されています。サンプル混合物はカートリッジにロードされ、カートリッジ内に充填された Captiva EMR-Lipid 充填剤を通過します。脂質は充填剤内に取り込まれる一方、ターゲット化合物はカートリッジを通過するため、コンディショニング、洗浄、溶出など従来の SPE ステップが必要なくなります。このように、Captiva EMR-Lipid カートリッジは非常に簡単に使用でき、時間と溶媒を大幅に節約できます。通過型クリーンアップでは、洗浄および溶出ステップでの従来の SPE メソッド開発が不要になります。Captiva EMR-Lipid で可能なメソッド変更は、完全な溶出を達成するために二次的溶出ステップを使用することです。二次的溶出では、サンプルロード量の約 20 ~ 25 % において 20:80 水 /ACN 混合液を使用することが推奨されます (例えば、5 mL ロード後に 1 ~ 1.25 mL の二次的溶出を実施)。最後に、自然落下で溶出できる設計になっているため、サンプルを EMR-Lipid カートリッジにロードした後に、ハンズフリーの操作が実行可能になります。減圧または加圧を操作して、溶出流量を制御する必要はありません。これらの機能により、複雑な食品サンプルを前処理するために、Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを使用する際のラボの生産性が向上しました。

共溶出の量

表 2 に、サンプル共溶出の重量試験結果を示します。共溶出残留物重量に関する試験は、機器に注入される最終サンプルにおいて、タンパク質、脂質、塩、その他のマトリクス成分を含む、マトリクス共溶出残留物を、サンプル抽出とクリーンアップメソッドにより制御する効率を評価するための重要な 1 つのメソッドです。マトリクス共溶出残留物重量は、機器で検出可能かどうかには関係なく、共溶出物全体の量を示しています。共溶出残留物は、機器で検出可能かどうかには関係なく、マトリクス効果を引き起こして、メソッドの信頼性とデータ品質に影響を与え、カラムや MS イオン源など機器の流路に蓄積して、検出システムの長期的性能を低下させる場合があります。

マトリクス共溶出残留物が少ないほど、メソッドの信頼性と機器の性能は向上します。この結果から、Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップでは、他社のカートリッジによるクリーンアップと比較して、共溶出残留物重量が少ない高効率のマトリクスクリーンアップが達成できることが明らかになりました。

マトリクス効果の評価

Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した場合と実施しない場合の牛肉抽出物のマトリクス効果の評価のために、動物用医薬品標準のポストカラムインフュージョン (PCI) を使用しました。すべての分析対象物を、取り込みウィンドウ全体にわたって監視しました。PCI プロファイルは、ポジティブモードとネガティブモードの両方で監視された分析対象物のマトリクス効果を反映しています。図 3 は、PCI プロファイルを示しています。

表 2. カートリッジによるクリーンアップを用いた牛肉マトリクス共溶出残留物量とマトリクス除去

クリーンアップ手法	ACN 最終抽出 1 mL あたりの共溶出物 (mg)	クリーンアップによるマトリクス共溶出物の除去効率 (%)
クリーンアップなし	7.68	–
Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL カートリッジ	4.38	43
Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジ	4.03	48
他社の 3 mL カートリッジ	5.91	23
他社の 6 mL カートリッジ	6.30	18

$$\text{マトリクス共溶出の除去効率 (\%)} = \frac{(\text{クリーンアップなしでの共溶出の量} - \text{クリーンアップを実施した際の共溶出の量})}{\text{クリーンアップなしでの共溶出の量}} \times 100$$

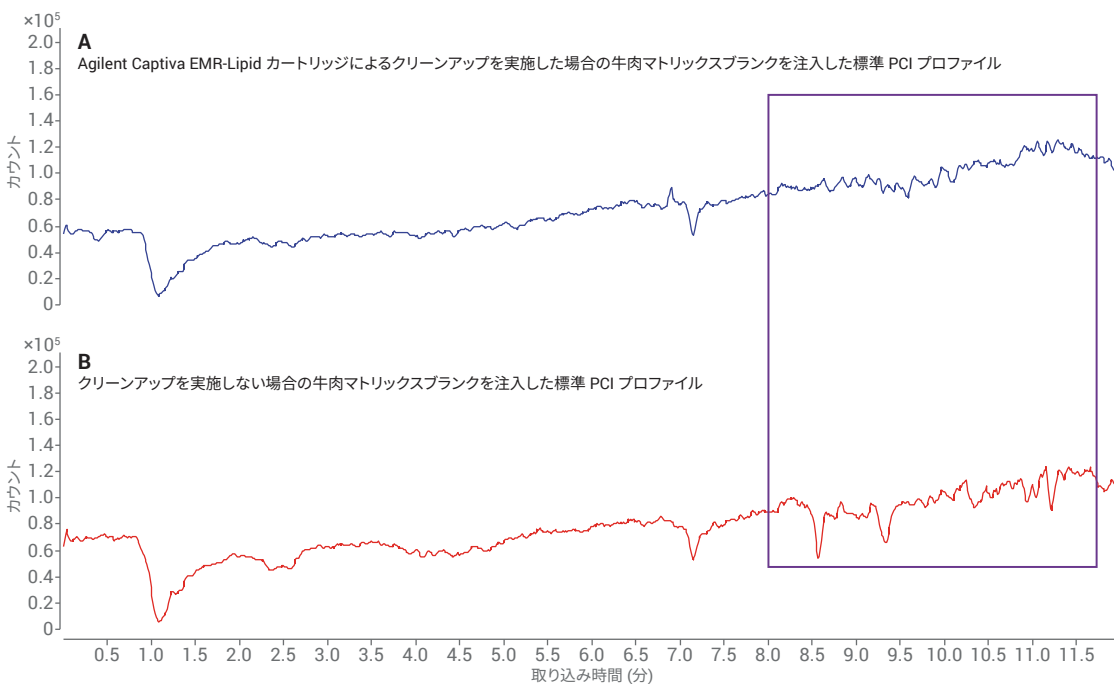


図 3. Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した場合 (A) と、いずれのクリーンアップも実施しない場合 (B) に、牛肉マトリクスブランクを注入した標準 PCI によるマトリクス効果の結果

図 3B は、クリーンアップを実施していない牛肉抽出物を注入した際に観察されたマトリックスイオン抑制 (全体的に低いベースライン) の PCI プロファイルを示しています。マトリックスイオン抑制は、共溶出ウィンドウ内の分析対象物のメソッド感度、信頼性、およびデータ品質に大きな影響を与える場合があります。反対に、図 3A は、EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施した牛肉抽出物を注入した際に、PCI プロファイル (青) の谷間が少なくなり、滑らかで一貫性があることを示しています。図 3 で強調表示されている RT ウィンドウは、マトリックスイオン抑制が低減したことを比較して示しています。

カートリッジによるクリーンアップ時の回収率

脂質除去の従来のメカニズムは、脂質と充填剤の間の疎水性相互作用に基づいています。このメカニズムは、特に脂質を取り込んで除去するための主要な充填剤機能として強力な疎水性相互作用を使用する際に効率的です。ただし、この相互作用メカニズムは選択的ではなく、サンプルにおいて不要な脂質と必要な疎水性物質が識別されません。このため、充填剤は脂質の取り込みでは機能しますが、疎水性物質とも強力に相互作用するため、カートリッジによるクリーンアップ時に分析対象物が大幅に損失してしまいます。さらに、疎水性相互作用では、すべてのクラスの脂質が効率的に除去できるとは限りません (例えば、リン脂質) 。

Captiva EMR-Lipid 充填剤は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせた新しいケミストリを使用して、脂質除去の選択性を大幅に向上させています。直線的で枝分かれのない炭化水素鎖 (できれば 6 つを超える炭素を持つ) を含む脂質に似た分子のみが、EMR-Lipid 充填剤の細孔に行き着きます。脂質は EMR-Lipid 充填剤に流入すると、強力な疎水性相互作用によって内部に取り込まれます。脂質に類似しておらず、EMR-Lipid 充填剤に流入するにはかさばりすぎているその他の疎水性分子は、その後の分析でも溶液内に残ります。このように、EMR-Lipid 充填剤は脂質を他の疎水性分子から効率的に識別できるため、選択性が大幅に向上し、クリーンアップ時の疎水性化合物の損失が大幅に低減します。

このメカニズムは、カートリッジクリーンアップを用いた回収率に関する試験によって、適切に実証されています。この研究では、カートリッジによるクリーンアップ前に、標準を牛肉ブランク抽出物にプレスパイクし、カートリッジによるクリーンアップ後に、標準をブランク溶離液にポストスパイクしました。回収率のデータから、カートリッジによるクリーンアップは分析対象物にのみ影響を与えることがわかります。比較試験では、次の 4 種類のカートリッジを用意しました。Captiva EMR-Lipid 3 mL (300 mg) および 6 mL (600 mg) カートリッジ、および他社の 3 mL (60 mg) および 6 mL (500 mg) カートリッジ。図 4 は、この試験の結果を示しています。比較して示されている分析対象物は疎水性の高い化合物で、C18 カラムでの溶出が遅くなっています。EMR-Lipid 3 mL および 6 mL カートリッジは、疎水性が中から高の化合物において、カートリッジクリーンアップでの回収率が一貫して優れた結果となりました。一方、

他社のカートリッジによるクリーンアップの場合、大部分の脂質除去で疎水性相互作用が使用されており、疎水性の高い (溶出の遅い) 分析対象物の回収率は低くなりました。6 mL カートリッジ (500 mg) に含まれている同等の充填剤量を使用した場合、疎水性が中から高の化合物が大量に保持されました。例えば、疎水性が最も高い最後の 2 つの化合物であるニコロサミドとピチオノール (log P >5) では、他社の 6 mL カートリッジによるクリーンアップでの回収率は 1 桁であり、カートリッジでの分析対象物の損失が大きいのを示しています。他社の 3 mL カートリッジでは、疎水性物質の損失を相殺するために、使用される充填剤が非常に少なくなっています。つまり、60 mg の充填剤が入れられた他社のカートリッジクリーンアップチューブは、カートリッジマトリックスクリーンアップの効率が犠牲にされており、量が多くなると疎水性化合物の回収率が許容できないほどのレベルに低下しています (< 40 %)。この試験では、EMR-Lipid 充填剤を使用すると脂質に対して選択性の高い相互作用メカニズムが作用し、特に疎水性物質であるターゲット化合物の回収率が許容できる値になることが明確に示されています。

メソッドバリデーション

完全な定量バッチを実行することで、最適化した抽出およびクリーンアップメソッドのバリデーションを行いました。手法は分析方法のセクションで説明しています。定量のために、内部標準 (ポジティブモードとネガティブモードの両方に対してフルニキシン-d3) を使用しました。ただし、新たなサンプル前処理メソッドを評価する際の最大の課題は絶対回収率であるため、3 つのレベルでプレスパイクおよびポストスパイクした QC をバリデーションの実行に含めました。表 3 は詳細な定量結果を示しており、各レベルで平均回収率と精度を使用して要約した図 (図 5) を作成しました。3 つのレベルにおいて大部分の分析対象物 (94 %) で許容できる回収率 (60 ~ 120 %) が達成されていますが、例外として 2 つの外れ値がアセトプロマジンとクロロプロマジンで発生しました。確認試験により、プロトコルの抽出ステップ時にこれらの化合物で分析対象物が損失した可能性があることがわかっています。ただし、各レベルにおけるこれら 2 つの化合物の 6 回の繰り返し分析の RSD 値は例外的であり、分析対象物の 91 % において < 10 % RSD、および残りの 9 % において 10 ~ 20 % RSD を示しました。

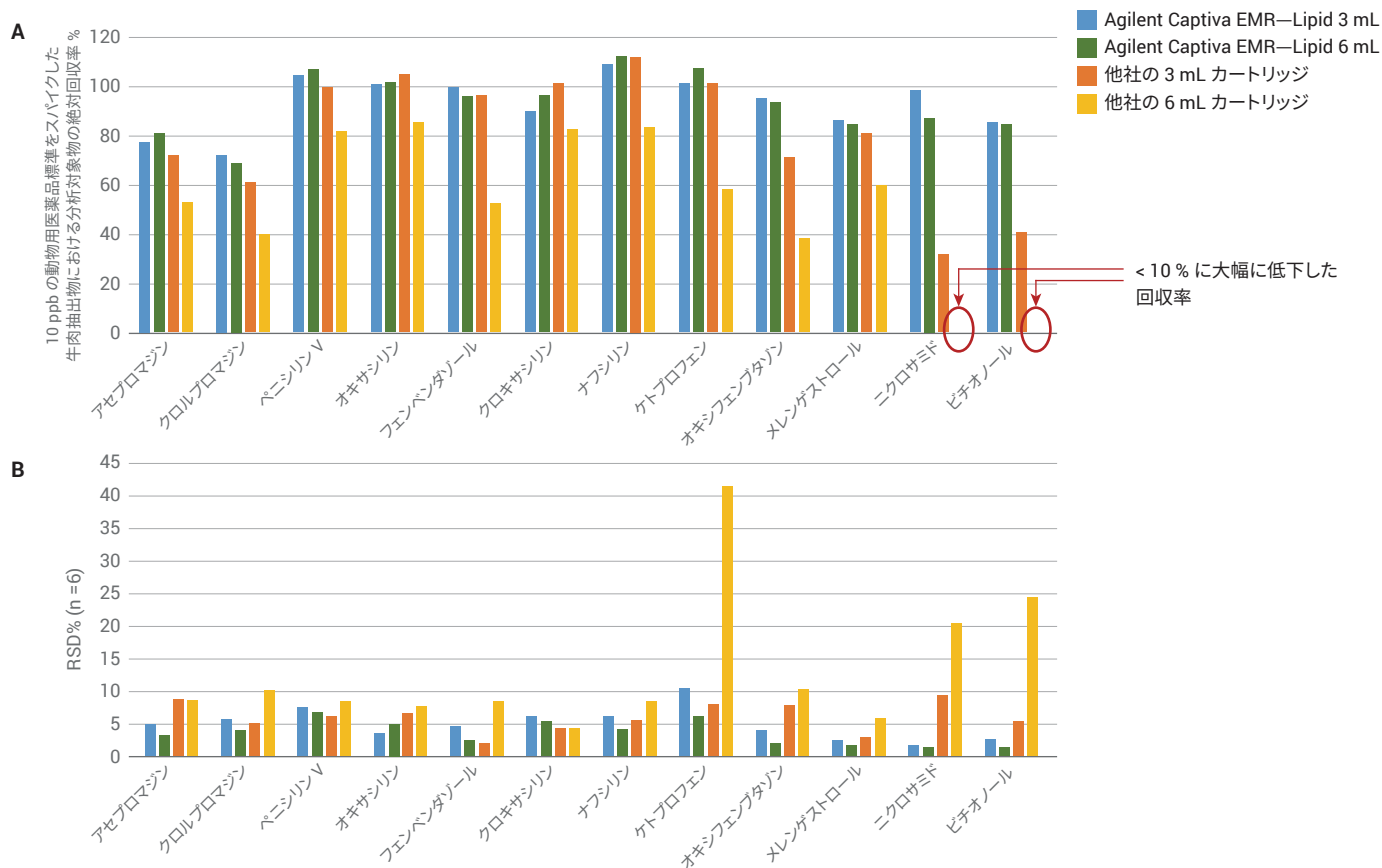


図 4. カートリッジによるクリーンアップを用いた牛肉抽出物の疎水性物質の回収率 (A) および再現性 (B) の比較。標準はカートリッジによるクリーンアップ前に 10 ng/mL で牛肉抽出物にスパイク。左から右の順序で分析対象物の疎水性が増大

表 3. 牛肉内の動物用医薬品分析に関するメソッド定量の結果

グループ 番号 ^a	分析対象物	検量線		メソッド絶対回収率と精度									
		R ²	キャリブレーション範囲 (ng/g)	2 ng/g QC (n = 6)		10 ng/g QC (n = 6)		50 ng/g QC (n = 6)		150 ng/g QC (n = 6)		750 ng/g QC (n = 6)	
				回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD	回収率 %	RSD
1	2-チオウラシル	0.9862	5~1,000	-	-	94	6.7	116	2.2	-	-	103	4.1
1	アモキシシリン	0.9964	5~1,000	-	-	88	8.6	77	3.9	-	-	69	2.7
1	メトロニダゾール-OH	0.9963	5~1,000	-	-	112	3.8	108	1.8	-	-	103	2.1
1	アンピシリン	0.9926	5~1,000	-	-	88	9.6	84	3.8	-	-	82	4.2
1	ミノサイクリン	0.9943	5~1,000	-	-	72	13.3	69	11.2	-	-	62	2.9
1	オキシテトラサイクリン	0.9941	5~1,000	-	-	84	6.2	87	11.0	-	-	72	5.1
1	テトラサイクリン	0.9919	5~1,000	-	-	87	9.0	86	5.2	-	-	90	4.1
1	セファゾリン	0.9933	5~1,000	-	-	109	5.8	94	2.8	-	-	87	5.4
1	デメクロサイクリン	0.9966	5~1,000	-	-	80	17.6	86	3.4	-	-	86	3.8
1	ジフロキサシン	0.9824	5~1,000	-	-	122	7.3	102	5.9	-	-	102	5.0
1	ガミスロマイシン	0.9901	5~1,000	-	-	100	8.9	92	5.3	-	-	89	6.1
1	クロルテトラサイクリン	0.9976	5~1,000	-	-	80	7.8	86	8.5	-	-	81	4.1
1	ドキシサイクリン	0.9936	5~1,000	-	-	77	11.2	70	5.4	-	-	73	4.7
1	フロルフエニコール	0.9920	5~1,000	-	-	116	4.4	110	3.8	-	-	99	7.1
1	クロラムフェニコール	0.9928	5~1,000	-	-	113	7.6	104	1.9	-	-	103	3.4
1	ブレドニゾン	0.9932	5~1,000	-	-	110	6.7	110	5.5	-	-	106	5.4
1	クロルスロン	0.9927	5~1,000	-	-	114	12.1	97	4.8	-	-	98	5.7
1	ベニシリン V	0.9952	5~1,000	-	-	97	4.3	100	6.3	-	-	100	7.1
1	オキサシリン	0.9942	5~1,000	-	-	96	12.0	99	8.2	-	-	99	5.1
1	クロキサシリン	0.9932	5~1,000	-	-	103	8.1	101	6.0	-	-	97	5.7
1	ナフシリン	0.9926	5~1,000	-	-	107	8.9	110	6.5	-	-	95	5.6
1	オキシフェンブタゾン	0.9910	5~1,000	-	-	106	8.1	98	3.0	-	-	86	2.8
1	酢酸メレンゲストロール	0.9942	5~1,000	-	-	117	7.0	114	3.0	-	-	102	5.1
1	ピチオノール	0.9807	5~1,000	-	-	63	8.2	81	5.7	-	-	92	1.4
2	リンコマイシン	0.9961	1-200	94	8.5	99	3.0	-	-	88	6.4	-	-
2	レバミゾール	0.9942	1-200	111	2.1	109	3.0	-	-	99	1.3	-	-
2	ノルフロキサシン	0.9974	1-200	111	5.5	91	4.9	-	-	100	8.0	-	-
2	シプロフロキサシン	0.9965	1-200	114	11.8	103	6.9	-	-	103	4.0	-	-
2	ダノフロキサシン	0.9969	1-200	101	8.3	94	5.8	-	-	99	5.6	-	-
2	ラクトバミン	0.9858	1-200	120	6.5	110	5.5	-	-	109	3.2	-	-
2	スルファメチゾール	0.9950	1-200	102	11.0	105	2.5	-	-	97	5.0	-	-
2	スルファメトキシピリダジン	0.9949	1-200	118	9.7	106	6.3	-	-	86	4.6	-	-
2	モランテル	0.9965	1-200	107	7.8	112	6.1	-	-	109	6.5	-	-
2	タイロシン	0.9946	1-200	125	5.3	105	4.8	-	-	98	7.5	-	-
2	アセトプロマジン	0.9942	1-200	66	7.9	52	3.2	-	-	56	3.7	-	-
2	クロルプロマジン	0.9944	1-200	50	9.2	36	3.2	-	-	43	4.1	-	-
2	フェンペンダゾール	0.9910	1-200	76	5.6	99	1.6	-	-	90	4.9	-	-
2	ケトプロフェン	0.9911	1-200	112	9.4	102	7.0	-	-	103	1.9	-	-
2	ニコロサミド	0.9964	1-200	120	10.2	85	8.5	-	-	89	2.1	-	-

^a グループ 1 の分析対象物のキャリブレーション範囲は 5 ~ 1,000 ng/g、QC スパイクレベルは 10、50、および 750 ng/g。グループ 2 の分析対象物のキャリブレーション範囲は 1 ~ 200 ng/g、QC スパイクレベルは 2、10、および 150 ng/g

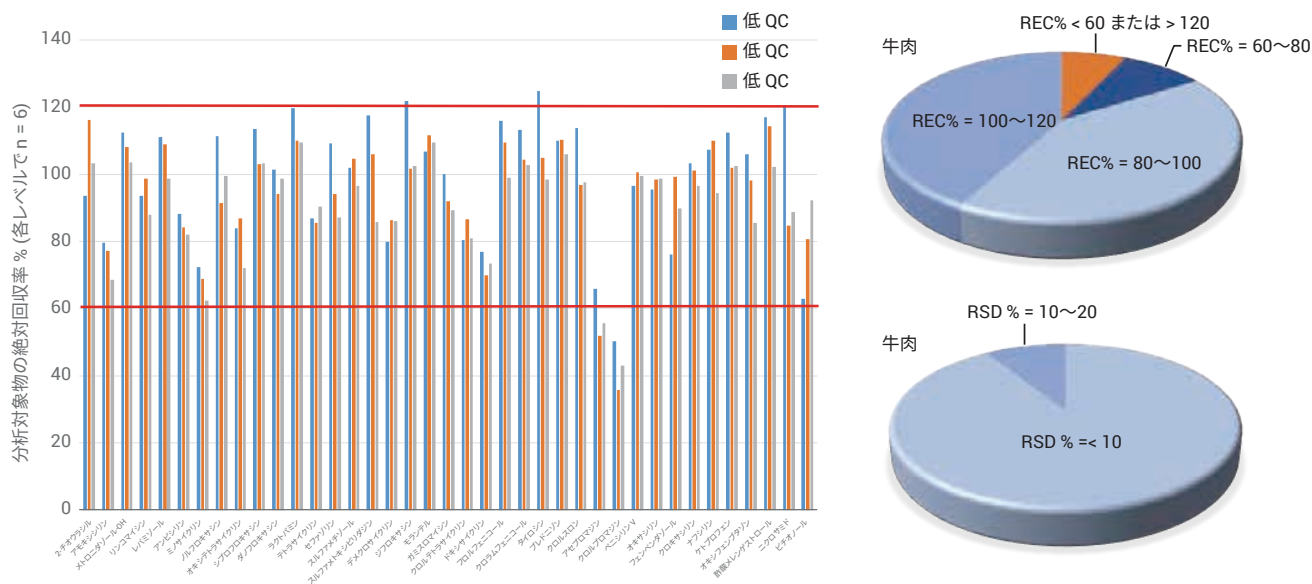


図 5. 牛肉内の動物用医薬品分析のメソッドバリデーションにおける分析対象物の絶対回収率と統計解析。詳細については表 3 を参照

結論

固液抽出と、それに続いて Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを使用する、迅速で信頼性が高く堅牢なメソッドを、牛肉中の複数の動物用医薬品残留物の分析用に開発して検証しました。抽出方法を変更して水性抽出ステップを適用した後に、有機溶媒抽出ステップを適用して分析対象物の回収率を最適化しました。クリーンアップのためにこれらの抽出物を混合して Captiva EMR-Lipid カートリッジに注入しました。マトリックス共溶出とマトリックス効果は、他社製の同様のカートリッジと注意深く比較して評価しました。分析対象物の回収率に対するカートリッジクリーンアップの影響についての試験では、EMR-Lipid 充填剤を使用すると脂質除去の選択性が高くなり、ターゲット化合物の不必要な損失は発生しませんでした。結果から、最適化した固液抽出に続いて Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを実施するメソッドは、この種類のアプリケーションにおいて優れたマトリックスクリーンアップ、回収率、および精度を達成していることがわかります。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, A Description of the U.S. Food Safety System, March 2000, www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.html.
2. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off.J. Eur.Comm.**2002**, L122, 8.
3. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.J. Chromatogr.A **2008**, 1202, 118-123.
4. Geis-Asteggiant, L.; et al.Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.J. Chromatogr. A **2012**, 1258, 43-54.
5. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. Validation of a streamlined multiclass, multiresidue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.Anal. Bioanal.Chem.**2015**, 407, 4423-4435.
6. Han, L.; et al.Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. J. Chromatogr.A **2016**, 1449, 17-29.
7. López-Blanco, R.; et al.Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry.J. Chromatogr.A **2016**, 1456, 89-104.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

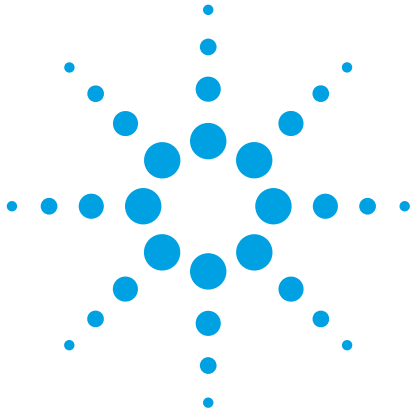
カスタマコンタクトセンタ

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. 2017
Printed in Japan, November 7, 2017
5991-8598JAJP



Bond Elut QuEChERS dSPE EMR—Lipid と Poroshell 120 による 豚肉中のマクロライド系抗生物質分析

アプリケーションノート

食品検査と農業

著者

Rong-jie Fu and Chen-Hao (Andy) Zhai
Agilent Technologies Shanghai Co. Ltd.

概要

このアプリケーションノートでは、QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) サンプル前処理法を用いた、豚肉中の 7 種類のマクロライド系抗生物質残留物の抽出およびクリーンアップについて説明します。スピラマイシン、チルミコシン、オレアンドマイシン、エリスロマイシン、タイロシン、ロキシスロマイシン、ジョサマイシンの残留物を分析しました。分析対象物は Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid を用いて抽出し、Agilent Poroshell 120 EC-C18 HPLC カラムで分離しました。液体クロマトグラフィーとポジティブイオンマルチプルリアクションモニタリングモードのエレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を使用して定量しました。このメソッドは、豚肉中のすべてのマクロライド系抗生物質について低い検出下限を実現しました。これらの化合物のダイナミックキャリブレーションレンジは 5~250 µg/kg の間で得られました。全体の回収率は 63.9~98.4 % の範囲で RSD 値は 3.8~10.3 % の間でした。



Agilent Technologies

はじめに

食用動物の生産における抗生物質の使用は食品業界全体に利益をもたらしています。しかし、これらの使用は動物や人の健康の安全性への懸念を招いています。マクロライド系抗生物質は、動物の多くの呼吸器および腸の細菌感染症の治療に広く使用されている抗生物質のグループです。よく使用されているマクロライド系抗生物質の中に、スピラマイシン、チルミコシン、オレアンドマイシン、エリスロマイシン、タイロシン、ロキシスロマイシン、ジョサマイシンがあります。

国内機関や国際機関は動物由来の食品に含まれる抗生物質の残留物の濃度に規制値を設けています [1, 2]。残留物の規制値は 0~15 mg/kg とさまざまです。アプリケーションがハチミツ中の微量なマクロライド系抗生物質残留物の分析用に以前開発されました [3]。このメソッドでは、Agilent Bond Elut Plexa をサンプル前処理で、Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムを分離で使用しました。マトリックス添加標準を用いて評価した回収率と再現性は、ハチミツ中の規制対象のマクロライド系抗生物質残留物の測定における許容範囲内でした。

本実験の目的は、豚肉中のマクロライド系抗生物質残留物のルーチン規制分析用にシンプルで高速な複数残留物メソッドを開発することです。最新の充填剤の Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid は、成分損失なしに豚肉などの脂質含有量の高いマトリックスから主要な脂質成分を選択的に除去します。複雑なマトリックスからの脂質干渉の除去は質量レスポンスを向上させるマトリックス効果の低減などのたくさんの利点があり、LC カラムの寿命を延ばします。また、表面多孔質粒子 Poroshell 120 HPLC カラムは高速で高効率な分析を低背圧で実現します。

表 1 は、マクロライド系抗生物質の詳細を示しています。

表 1. 今回の実験で使用したマクロライド系抗生物質 (次ページへ続く)。

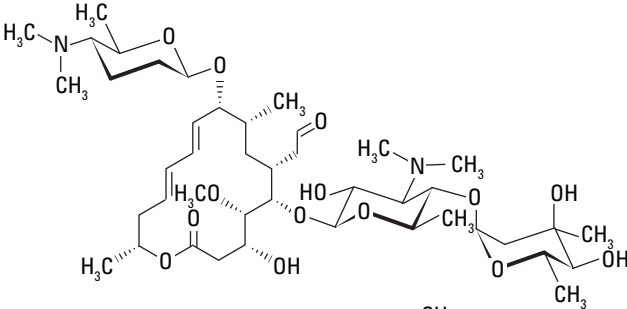
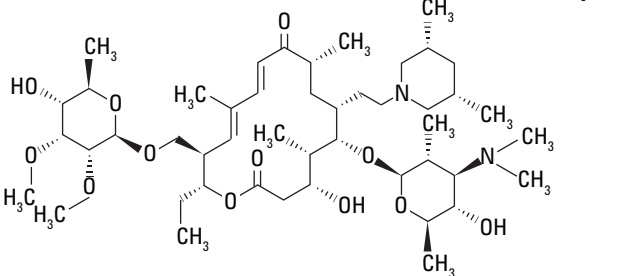
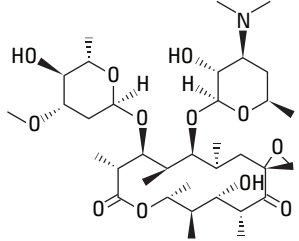
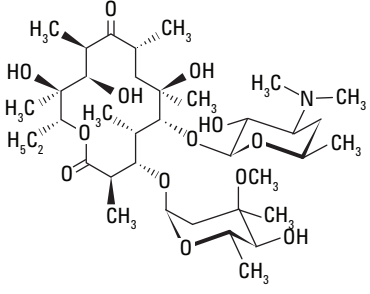
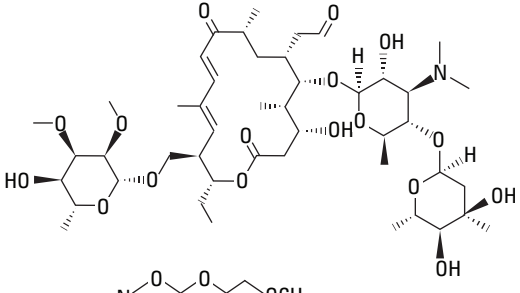
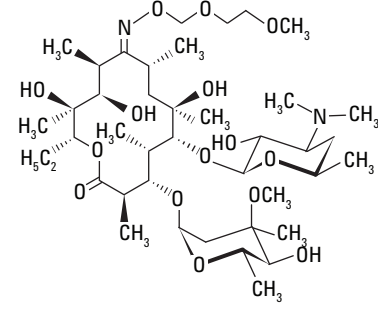
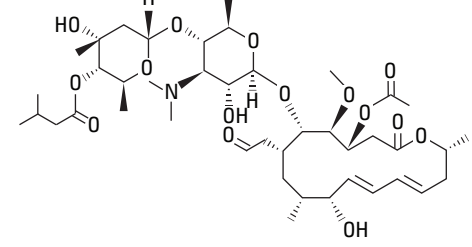
化合物	CAS No.	構造
スピラマイシン	8025-81-8	
チルミコシン	108050-54-0	

表 1. 今回の実験で使用したマクロライド系抗生物質。

化合物	CAS No.	構造
オレアンドマイシン	3922-90-5	
エリスロマイシン	114-07-8	
タイロシン	1401-69-0	
ロキシシロマイシ	80214-83-1	
ジョサマイシン	16846-24-5	

材料とメソッド

試薬および薬品

すべての試薬は、MS、HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリルと水は、Honeywell International, Inc. から購入しました。標準は、Dr. Ehrenstorfer (アウクスブルク、ドイツ) から購入しました。豚肉は地域のスーパーマーケットで購入しました。標準溶液 (1.0 mg/mL) はメタノールで個別に作成し、-20 °C で保管しました。混合作業溶液はアセトニトリル:水 (20:80) で作成し、-20 °C で保管しました。添加した溶液は、混合作業溶液を水で希釈することによって適切に毎日作成しました。

装置と材料

- Agilent 1290 Infinity LC
- Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム、エレクトロスプレーイオン源搭載
- Agilent Bond Elut QuEChERS 抽出キット EN (p/n 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal—Lipid (p/n 5982-1010)
- Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid 脱水キット (p/n 5982-0101)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
- エッペンドルフ 5810 R 遠心分離機 (Brinkmann Instruments、ウェストベリ、ニューヨーク州、米国)
- デジタルボルテックスミキサー (VWR International, LLC、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)

サンプル前処理

最終のサンプル前処理手順は、次のステップを使用して最適化しました。

- ホモジナイズした豚肉 2.5 g (±0.1 g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
- 水 8 mL を加えて 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- アセトニトリル 10 mL を加える
- QuEChERS 抽出キット EN メソッドの塩を加える
- サンプルを 1 分間振とうして混合する
- 4,000 rpm で 5 分間遠心分離する
- 水 5 mL を 15 mL EMR—Lipid dSPE チューブに加える
- 上澄み 5 mL を EMR—Lipid dSPE チューブに移す
- 直ちにボルテックスミキサーでサンプルを攪拌して分散した後、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- 4,000 rpm で 3 分間遠心分離する
- 上澄み 5 mL を塩 (1:4 NaCl:MgSO₄) 2 g を含む 15 mL EMR Lipid 脱水キットに移し 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
- 4,000 rpm で 3 分間遠心分離する
- アセトニトリル層の上部 200 μL と水 800 μL を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで攪拌する

HPLC 条件

カラム:	Agilent Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 100 mm、2.7 μm (p/n 695975-302)
移動相:	A: 10 mM 酢酸アンモニウムおよび 0.1 % ギ酸水溶液 B: アセトニトリル
注入量:	2 μL
流量:	0.5 mL/min
グラジエント:	時間 (分) %B 0 20 5 65 6 65 8 20
温度:	30 °C

MS 条件

マクロライド系抗生物質はポジティブモードでモニタリングしました。表 2 にマルチプルリアクションモニタリングの詳細を示します。

MS イオン源のパラメータ

ガス温度:	300 °C
ガス流量:	5 L/min
ネブライザ:	45 psi
シースガス温度:	400 °C
シースガス流量:	11 L/min
ノズル電圧:	ポジティブ、0 V
キャピラリ:	ポジティブ、4,000 V

表 2. マルチプルリアクションモニタリングによってモニターした質量。

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグメンタ (V)	コリジョン エネルギー (V)	リテンション タイム (分)
スピラマイシン	843.4	540.0	270	35	2.178
スピラマイシン	843.4	174.1	270	40	2.178
チルミコシン	869.5	696.4	320	44	2.749
チルミコシン	869.5	174.1	320	49	2.749
オレアンドマイシン	688.3	544.3	170	15	2.99
オレアンドマイシン	688.3	158.2	170	25	2.99
エリスロマイシン	734.4	576.3	180	14	3.204
エリスロマイシン	734.4	158.2	180	30	3.204
タイロシン	916.4	772.4	280	30	3.421
タイロシン	916.4	174.2	280	40	3.421
ロキシスロマイシン	837.4	679.3	200	16	4.087
ロキシスロマイシン	837.4	158.1	200	34	4.087
ジョサマイシン	828.4	174.1	250	35	4.461
ジョサマイシン	828.4	109.1	250	46	4.461

結果と考察

直線性と検出下限

外部検量線を作成するために使用した溶液は、混合作業溶液をマトリックスブランクに添加して調整しました (5、10、20、50、250 µg/kg)。マトリックスブランクは、前処理と QuEChERS 手順を含む手順全体を豚肉に適用することによって作成しました。検出限界 (LOD) のデータは、0.1 µg/kg でポスト添加した豚肉マトリックスを注入することによって S/N 比 3 を用いて計算しました。すべての S/N 比は 3:1 を超えました。このため、化合物のすべての LOD は 0.1 µg/kg 未満で、規制メソッドに合致しました。表 3 に、検量線の結果を示します。

表 3. 豚肉中のマクロライド系抗生物質の直線性。

化合物	回帰方程式	R ²
スピラマイシン	Y = 386.144x + 19.317	0.9994
チルミコシン	Y = 133.272x + 8.018	0.9999
オレアンドマイシン	Y = 317.284x + 43.963	0.9998
エリスロマイシン	Y = 848.506x + 119.918	0.9996
タイロシン	Y = 274.158x + 22.703	0.9997
ロキシスロマイシン	Y = 477.739x + 53.019	0.9997
ジョサマイシン	Y = 625.922x + 58.918	0.9998

回収率と再現性

このメソッドでの分析対象物の回収率と再現性は、10、20、100 µg/kg の 3 つのレベルの濃度で添加した豚肉のサンプルをレベルごとに 6 回分析して求めました。表 4 に分析対象物の回収率と再現性のデータを示します。図 1 に 20 µg/kg で添加した豚肉抽出物のクロマトグラムを示します。

表 4. 豚肉中のマクロライド系抗生物質の回収率と再現性 (n = 6)。

化合物	添加濃度 (µg/kg)	回収率 (%)	RSD (%)
スピラマイシン	10	89.7	10.3
	20	94.0	8.3
	100	95.2	3.8
チルミコシン	10	98.4	9.5
	20	90.0	9.7
	100	95.3	7.1
オレアンドマイシン	10	92.4	5.7
	20	96.4	7.1
	100	97.5	6.2
エリスロマイシン	10	64.5	8.8
	20	63.9	8.1
	100	68.7	5.1
タイロシン	10	84.1	10.2
	20	93.3	7.4
	100	94.6	5.5
ロキシスロマイシン	10	89.9	9.8
	20	91.6	7.7
	100	92.6	5.1
ジョサマイシン	10	87.9	7.4
	20	92.4	5.6
	100	93.2	4.9

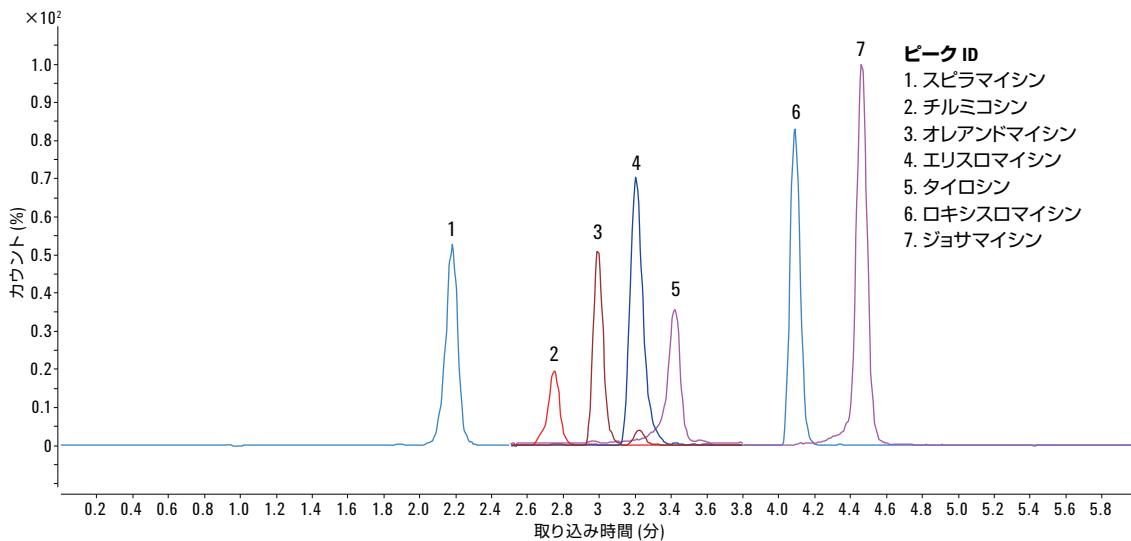


図 1. 20 µg/kg で添加した豚肉サンプルの抽出物のクロマトグラム。

結論

このアプリケーションノートでは、豚肉中のマクロライド系抗生物質の定量と確認を同時に実行できる迅速かつ堅牢で信頼性の高いメソッドを説明しました。EMR—Lipid と脱水キットにより、分析対象物の回収に大きな影響を与えることなく、優れたマトリックスクリーンアップを可能にしてほとんどのマトリックス、特に脂質を除去できます。Agilent Poroshell 120 EC-C18 カラムは、複数のマクロライド系抗生物質の迅速な分離を左右対称のピーク形状および高い感度で実現します。

参考文献

1. Anon. GB/T 23408-2009. *Determination of macrolides residues in honey – LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
2. SN/T 1777.2-2007. *Determination of macrolide antibiotic residues in animal-derived food – part 2: LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
3. Chen-Hao Zhai, Rong-jie Fu. *Macrolides in Honey Using Agilent Bond Elut Plexa SPE, Poroshell 120, and LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-3190EN, **2013**.

詳細

これらのデータは一般的な結果を示したものです。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. 2015

Printed in Japan

November 12, 2015

5991-6442JAJP



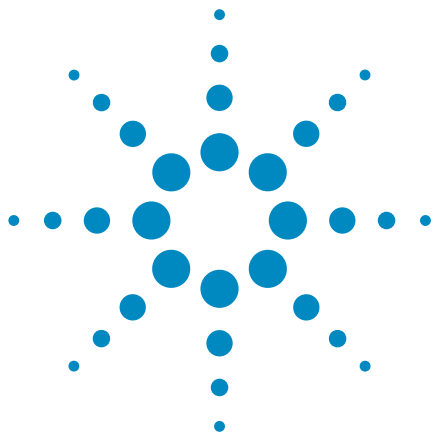
Agilent Technologies

マイコトキシン分析



EMR Lipid を用いた LC/MS/MS による
乳児用調合乳中のアフラトキシン分析

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップおよび LC/MS/MS を
用いたチーズ中の複数の種類のマイコトキシンの分析



EMR Lipid を用いた LC/MS/MS による 乳児用調合乳中のアフラトキシン分析

アプリケーションノート

食品検査

著者

Megan Juck
Agilent Technologies, Inc.

概要

アフラトキシン M1 は、牛乳で主に検出されるアフラトキシンです。欧州では、欧州委員会 (EC) が勧告する最大許容レベルは、乳児用調合乳ではわずか $0.025 \mu\text{g}/\text{kg}$ となっています。米国では、アメリカ食品医薬品局 (FDA) が規定したアフラトキシンの最大許容レベルは、牛乳で $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ です。このアプリケーションノートは、Agilent Bond Elut EMR Lipid を用いた、LC/MS/MS による乳児用調合乳中のアフラトキシン M1、G2、G1、B2、および B1 の測定について説明します。この実験では、QuEChERS 抽出を採用し、続いて EMR Lipid 分散 SPE (dSPE) によるクリーンアップを行いました。このメソッドは、あらゆるレベルのすべてのアフラトキシンについて、非常に高い回収率 (88 ~ 113 %) と精度 (RSD = 1.3 ~ 13.6 %) を実現します。広範にマトリックスを除去できるため、このメソッドの定量下限 (LOQ) は、米国と欧州の両方の規制限度を下回るようになりました。この単純で堅固なメソッドは、最小限の機器と専門知識のみを必要とするため、食品分析ラボで容易に実施できます。



Agilent Technologies

はじめに

マイコキシンは、菌類の二次代謝物であり、世界で供給される食品および飼料中で最もまん延している混入物の1つであると見なされています。食糧農業機関 (FAO) は、世界の農産物の最大 25 % がマイコキシンで汚染されていると推定しています。この汚染のために、特に穀物産業で、非常に大きな経済的損失が生じています [1]。アフラトキシン (表 1) は、さまざまな種の菌類 (特にアスペルギルス・フラブスおよびアスペルギルス・パラシチクス) によって生成されるマイコキシンの一種です [2]。アフラトキシン M1 は、牛乳で最も一般的に検出されるマイコキシンであり、アフラトキシン B1 で汚染された飼料を牛が摂取して代謝したときに生成されます [3]。アメリカ食品医薬品局 (FDA) および欧州委員会 (EC) はどちらも、さまざまな食品中のアフラトキシン含有量の限度を規定しています [4, 5]。表 2 に、米国と欧州における FDA と EC のアフラトキシンの制限をまとめています。

アフラトキシンの規制限度は、特に乳児向けの乳製品のマトリックスおよび製剤では、非常に低く設定されています。低濃度での分析対象物のシグナルを改善するには、マトリックス干渉を除去するためのサンプル前処理が必要です。さまざまなマトリックスにおいて、アフラトキシンを含むマイコキシンの分析には、一般にイムノアフィニティカラムが使用されます [6 ~ 9]。ただし、それらのカラムは高価であることがあり、食品分析ラボで実施しやすいとは限らない独特で特殊なワークフローを必要とします。QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) では、サンプルに対して 3 つのステップ (抽出、クリーンアップ、および分析) からなる単純な手順を使用します。そのため、穀物および乳製品中のアフラトキシンを含むさまざまな分析対象物とマトリックスの前処理のために、魅力的なメソッドとなっています [3, 10, 11]。ただし、C18 または PSA による QuEChERS クリーンアップでは、肉類や牛乳などの脂質含有量の多いサンプルを分析する際に、いくつかの制限事項があります。ターゲット化合物と非選択的に相互作用すること、および主要な脂質類が十分に除去されないことが、これらの制限事項の原因となっています。残った脂質は分析流路に蓄積し、その結果、メンテナンス作業が増え、クロマトグラフィーが低下し、データの真度および精度も低下します。

Agilent Bond Elut EMR Lipid は、サイズ排除および疎水性相互作用を独自に組み合わせて使用し、分析対象を不必要に保持せずに、サンプルから主要な脂質類を選択的に除去する、まったく新しい充填剤です。この充填剤は、QuEChERS およびタンパク処理ワークフローによる dSPE クリーンアップとして使用することができ、シンプルで効果的なクリーンアップを容易に実行できるようにします [12, 13]。この実験では、乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの分析について調査しました。脂質含有量とアフラトキシンの規制レベルを元に、このマトリックス用に乳児用調合乳を選択しました。QuEChERS 抽出を実施し、続いて EMR Lipid dSPE クリーンアップと、無水 MgSO₄ を使用する強化されたサンプル後処理を実施したため、徹底したマトリックス除去が行われました。このアプリケーションノートでは、3 つの異なる濃度でアフラトキシンを分析する場合の EMR Lipid の有効性を示します。

表 1. 5 種のアフラトキシンの化学的情報および物理的情報。

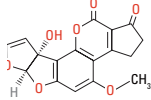
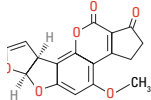
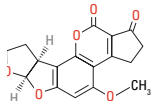
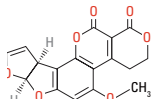
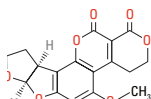
アフラトキシン	分子式	構造	pKa	logP
M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		11.4	0.93
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆		–	1.58
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		–	1.57
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇		–	1.37
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇		–	1.36

表 2. EC および FDA による関連マトリックスでのアフラトキシンの限度

アフラトキシシ	限度 (µg/kg)	マトリックス	規制機関
M1	0.025	乳児用調合乳	EC [5]
	0.05	生乳	EC [5]
	0.50	生乳	FDA [14]
B1	0.10	離乳食	EC [5]
	2 ~ 12*	一般食品	EC [5]
B1 + B2 + G1 + G2 (総濃度)	4 ~ 15*	ナッツ、イチジク、ドライフルーツ、シリアル、と うもろこし、香辛料	EC [5]
	20	一般食品	FDA [15]**
	20 ~ 300	動物飼料	FDA [16]**

* 特定のマトリックスに関する詳細については、欧州委員会規則 No 1881/2006 を参照してください [5]。

** アフラトキシシ B1 の同定は、化学誘導体形成によって確認する必要があります [15、16]。

実験方法

試薬および薬品

試薬はすべて、HPLC グレード以上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。水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して純水化しました。試薬グレードのギ酸 (FA、部品番号 G2453-85060) は Agilent Technologies から入手しました。欧州標準物質 ERM-BD283 (低レベルのアフラトキシシ M1 を含む全脂粉乳) は LGC Standards (テディントン、ミドルセックス、英国) から購入しました。アフラトキシシ M1 (ACN 中に 10 µg/mL)、アフラトキシシ混合液 (B1、G1、B2、G2 が ACN 中にそれぞれ 20 µg/mL)、およびギ酸アンモニウムは、Sigma-Aldrich, Corp. (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。アフラトキシシ原液標準は、メーカーが推奨するように、2 ~ 8 °C (M1) および 2 ~ 20 °C (B1、B2、G1、G2 の混合) で保管しました。すぐに使用できる液体の乳児用調合乳は、地元の食料品店で購入しました。

装置

使用した装置と材料:

- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Vortexer および Multi-Tube Vortexer (VWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- ジェノグラインダー (SPEX、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)
- Turbovap LV (Biotage、シャーロット、ノースカロライナ州、米国)
- エッペンドルフ微小遠心管 (Brinkmann Instruments、ウェストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Agilent Bond Elut オリジナル QuEChERS メソッド (バフファなし) 抽出キット (10 g のサンプル)、セラミックホモジナイザ入り (部品番号 5982-5550CH)
- Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE (部品番号 5982-1010)
- Agilent Bond Elut EMR Lipid MgSO4 脱水キットパック (部品番号 5982-0102)

装置構成

分析には、以下のものから構成される Agilent 1290 Infinity LC システムを使用しました。

- Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)
- Agilent 1290 FC/ALS サーマスタット (G1330B) を搭載した Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C)

LC システムを、Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン化技術を備えた Agilent 6460A トリプル四重極 LC/MS/MS システムに連結しました。すべてのデータ取り込みと分析に、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

サンプル前処理

液体乳児用調合乳 (10 mL) を、50 mL の遠心分離チューブに追加し、QC サンプル用の標準溶液を適宜スパイクしました。2 つのセラミックホモジナイザと 10 mL の ACN を追加し、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。オリジナル (バフアなし、10 g のサンプル) QuEChERS 抽出塩キットパッケージを、サンプルに追加しました。サンプルを、2 分間振とう機で混合し、次に 5 分間 5,000 rpm で遠心分離しました。水 (5 mL) を EMR Lipid dSPE チューブに追加し、ボルテックスしてから、5 mL の未処理のサンプル抽出液を追加しました。サンプルを直ちにボルテックスしてから、マルチチューブ Vortexer でさらに 60 秒間ボルテックスしました。次にサンプルを 5 分間 5,000 rpm で遠心分離し、空の 15 mL の遠心分離チューブに静かに移しました。脱水キットパックの無水硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) を、抽出液に追加しました。塩を分散させるためにサンプルを直ちにボルテックスし、さらに 60 秒間ボルテックスし、3 分間 5,000 rpm で遠心分離しました。上澄みを、1.5 g の $MgSO_4$ (新しい脱水キットパックの) が入っている別の 15 mL 遠心分離チューブに移しました。サンプルを直ちにボルテックスしてから、再度 60 秒間ボルテックスします。3 分間 5,000 rpm で遠心分離した後に、最終サンプル (1 mL) を 16 × 100 mm のガラスのテストチューブに移し、乾くまで 50 °C で窒素下で蒸発させました。必要に応じて、乾燥する前に、ブランクのマトリックスに標準溶液をスパイクしました。サンプルを、0.1 % の FA/ACN (80/20) を含む 100 μ L の H_2O で再溶解し、少なくとも 2 分間ボルテックスしました。必要な場合は、次にサンプルを超音波洗浄器にかけ、遠心分離しました。次に、最終サンプルを、LC/MS/MS 分析のためにインサート付きのバイアルに移しました。図 1 に、サンプル前処理手順の全体を示します。

機器条件

HPLC

カラム:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.1 × 100 mm、2.7 μ m (部品番号 685775-902)
ガード:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 UHPLC Guard、2.1 mm × 5 mm、 2.7 μ m (部品番号 821725-912)
移動相:	A) 0.1% の FA を含む、5 mM のギ酸アンモニウムの水溶液 B) 0.1% の FA を含む、5 mM のギ酸アンモニウムの ACN/ メタノール (50/50) 溶液
流量:	0.3 mL/min
カラム温度:	40 °C
オートサンブラ温度:	4 °C
注入量:	5 μ L
ニードル洗浄:	0.2% の FA を含む 1:1:1 の ACN/メタノール/ イソプロパノール/水
グラジエント:	時間 (分) %B
	0 20
	7 70
	7.25 95
ストップタイム:	11 分
ポストタイム:	2 分

MS

エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、ポジティブモード		
ガス温度:	325 °C	
ガス流量:	10 L/min	
ネブライザ:	50 psi	
シースガスヒーター:	350 °C	
シースガス流量:	11 L/min	
キャピラリー:	4,000 V	
デルタ EMV (+):	300 V	
タイムセグメント:	番号 時間 (分)	ダイバータバルブ
	1 0	廃液へ
	2 2	MS へ



図 1. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップと MgSO₄ を使用した強化された脱水処理を用いた、液体乳児用調合乳中のアフラトキシンのサンプル前処理プロトコル。

キャリブレーション標準と品質管理

アフラトキシン作業溶液を、原液から、2 µg/mL (アフラトキシン M1) および 10 µg/mL (アフラトキシン G2、G1、B2、および B1) の ACN 溶液として調製しました。アフラトキシン M1 の濃度は、他のアフラトキシンの 5 分の 1 にして、さまざまな規制限度を超えないようにしました。キャリブレーションと QC 標準は、作業溶液を適宜希釈することによって、100 倍の最終濃度にしました。表 4 には、乳児用調合乳でのキャリブレーションサンプルおよび QC サンプルの最終濃度を示します。作業溶液とすべてのキャリブレーション標準および QC 標準を、2 ~ 8 °C で茶色のバイアルに保管しました。抽出の前に、マトリックスブランク乳児用調合乳に、100 µL の対応する QC 標準をスパイクしました。マトリックス適合検量線のため、乾燥の前に、10 µL の適切な標準溶液を、990 µL のマトリックスブランク ACN 抽出物にスパイクしました。

表 4. 乳児用調合乳でのプレスパイク QC サンプルおよびポストスパイクキャリブレーションサンプルの最終濃度。

標準*	アフラトキシン M1 (ng/mL)	アフラトキシン B1、B2、G1、G2 (ng/mL)
キャリブレーション 1	0.01	0.05
キャリブレーション 2	0.02	0.10
キャリブレーション 3	0.10	0.50
キャリブレーション 4	0.50	2.50
キャリブレーション 5	1.00	5.00
キャリブレーション 6	2.50	12.5
低 QC	0.025	0.125
中 QC	0.25	1.25
高 QC	2.00	10.0

*スパイク用に 100 倍の最終濃度で調製された標準。

表 3. ターゲット化合物の LC/MS/MS dMRM パラメータおよびリテンションタイム

分析対象物	RT (分)	プロダクトイオン					
		プリカーサイオン (m/z)	フラグメンター (V)	定量イオン (m/z)	CE (V)	定性イオン (m/z)	CE (V)
アフラトキシン M1	4.28	329.1	143	273.1	21	229	45
アフラトキシン G2	4.55	331.1	164	313.1	25	245	33
アフラトキシン G1	4.88	329.07	149	243.1	25	115.1	80
アフラトキシン B2	5.13	315.09	174	287.1	25	259.1	29
アフラトキシン B1	5.44	313.07	169	241	41	128	80

結果と考察

メソッドの最適化

EMR Lipid は、除タンパク処理と QuEChERS ワークフローの両方で使用できます。液体乳児用調合乳中のアフラトキシン分析には、除タンパク処理と QuEChERS 手順の両方が適していることが、初期の検査で示されました。ただし、従来から行われている除タンパク処理に関連する希釈係数が大きくなったため、このアプリケーションでは QuEChERS 手法を選択しました。このアプリケーションでは、予備実験の後に、オリジナル QuEChERS 抽出塩キットを選択しましたが、AOAC 抽出キットおよび EN 抽出キットも使用可能です。

S/N 比に基づいて、望ましいアフラトキシン M1 の定量下限 (LOQ) に到達するには濃縮ステップが必要であると判断しました。5 倍、10 倍、および 20 倍の濃度を評価しました。所定の機器のセットアップでは 10 倍の濃度が LOQ およびメソッドのニーズに適合します。QuEChERS 抽出、EMR Lipid クリーンアップ、および $MgSO_4$ による強化された脱水処理を実施した後の、乳児用調合乳中のアフラトキシンの LC/MS/MS dMRM クロマトグラムを、図 2 に示します。

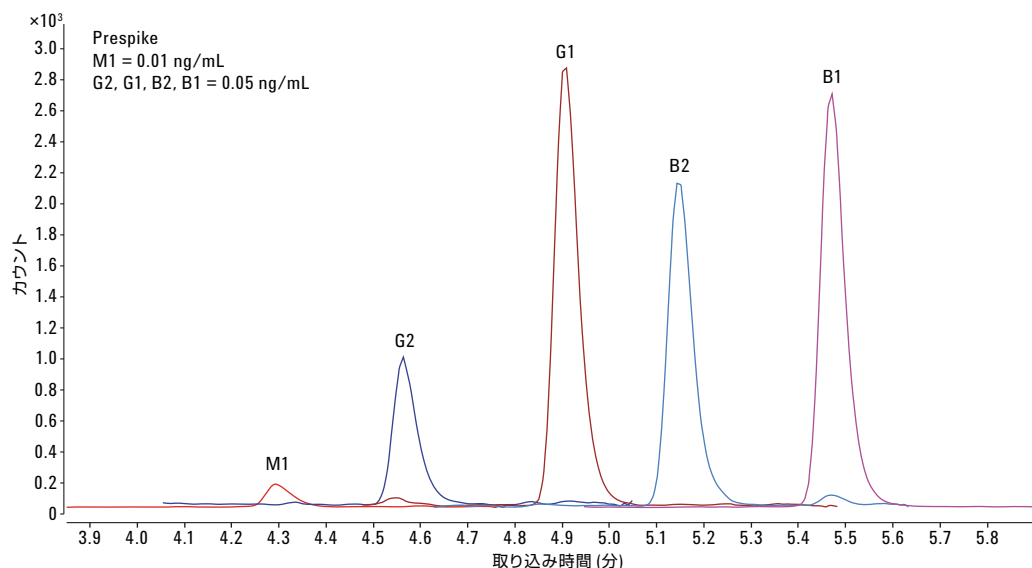


図 2. QuEChERS 抽出と、Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE クリーンアップおよび $MgSO_4$ を使用した強化された脱水処理の後の、液体乳児用調合乳中のアフラトキシンの LC/MS/MS dMRM クロマトグラム

マトリックス除去

液体乳児用調合乳には、脂肪、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラルなどの、さまざまなマトリックス成分が含まれています。このようにマトリックスが複雑であるため、特にアフラトキシンの濃度は一般的に非常に低いので、サンプル前処理が難しくなることがあります。図3には、クリーンアップをしない場合と、C18/PSA または EMR Lipid dSPE クリーンアップを行った場合について、乳児用調合乳の10倍濃縮した試料のマトリックスブランクサンプルのGC/MS フルスキャンを重ね表示したクロマトグラムを示します。クリーンアップをしないマトリックスブランクと比較した場合、特にクロマトグラムの後の方の溶出領域では、C18/PSA が除去するマトリックスは非常にわずかです。しかし、赤で示されている EMR Lipid は、独自の作用メカニズムにより、10倍濃縮した試料でもサンプル前処理中にかなりの量のマトリックスを除去していることがわかります。

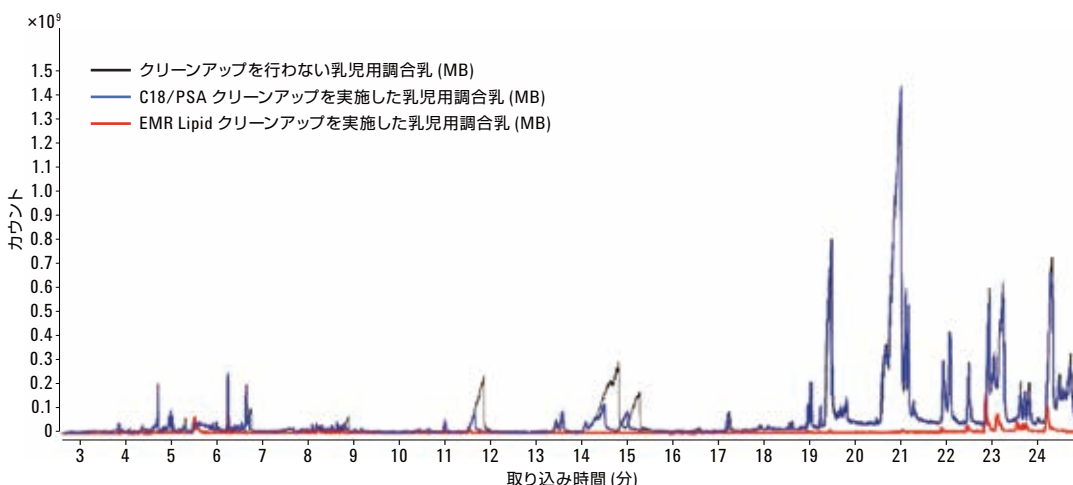


図3. クリーンアップなし、C18/PSA dSPE クリーンアップ、および Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップの場合について、乳児用調合乳のマトリックスブランク (MB) を示す GC/MS フルスキャンを重ね表示したクロマトグラム。

ポストスパイクされた乳児用調合乳からのピーク強度 (面積) と、それに相当する溶媒標準を比較することによって、マトリックス効果を評価しました (表5)。アフラトキシ M1 のサンプルは 0.025 ng/mL の濃度でスパイクし、アフラトキシ G2、G1、B2、および B1 のサンプルは 0.125 ng/mL でスパイクしました。このメソッドでは、大きなマトリックス効果が出ない許容できる範囲までマトリックス除去が行われることがわかります。

表5. 5種のアフラトキシンのマトリックス効果 (%)。ポストスパイクした乳児用調合乳でのピーク強度と、それに相当する溶媒標準を比較することによって、マトリックス効果を評価しました (n = 5)。

アフラトキシ	マトリックス効果 (%)
M1	+ 12
G2	- 13
G1	- 10
B2	- 11
B1	- 9

直線性および LOQ

乳児用調合乳中で、アフラトキシン M1 の直線範囲は 0.01 ~ 2.50 ng/mL、アフラトキシン G2、G1、B2、および B1 の直線範囲は 0.05 ~ 12.5 ng/mL でした。表 6 に、この実験でのアフラトキシンごとのキャリブレーション範囲、回帰/重みと R² 値、および LOQ を示します。LOQ は、メソッドの性能に基づいて実験で測定しました。アフラトキシン M1 の LOQ は、米国の最大許容レベルと欧州の最大許容レベルを下回っています。

表 6. アフラトキシンごとのキャリブレーションの詳細 (回帰適合、重量、R² 値、直線範囲、および LOQ)

アフラトキシン	回帰適合、重み	R ²	直線範囲 (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
M1	直線、1/x ²	0.9931	0.01~2.50	0.01
G2	直線、1/x	0.9990	0.05~12.5	0.05
G1	直線、1/x	0.9994	0.05~12.5	0.05
B2	直線、1/x	0.9986	0.05~12.5	0.05
B1	直線、1/x	0.9987	0.05~12.5	0.05

回収率と再現性

このメソッドの回収率と再現性を評価しました。アフラトキシン M1 について 0.025、0.25、および 2.00 ng/mL の濃度でブランクの液体乳児用調合乳をスパイクすることによって、QC 標準 (n = 6) を調製しました。さらに、アフラトキシン G2、G1、B2、および B1 については 0.125、1.25、および 10.0 ng/mL で QC 標準を調製しました。次に、このアプリケーションノートで説明した手順を使用して、サンプルを抽出しました。前述のように一連のキャリブレータを調製し、分析の間 n = 6 で注入し、レスポンスに変化が見られたかどうかを調べましたが、大きな変化はありませんでした。プレスパイク QC サンプルの回収率は、マトリックス検量線と照合して、そのレスポンスに対して計算しました。図 4 および図 5 に、回収率と、相対標準偏差 (RSD) のデータを示します。3 つのすべての QC レベルで、5 種のアフラトキシンすべての平均回収率はおおよそ 101 % であり、平均 RSD は 5.0 % 未満でした。

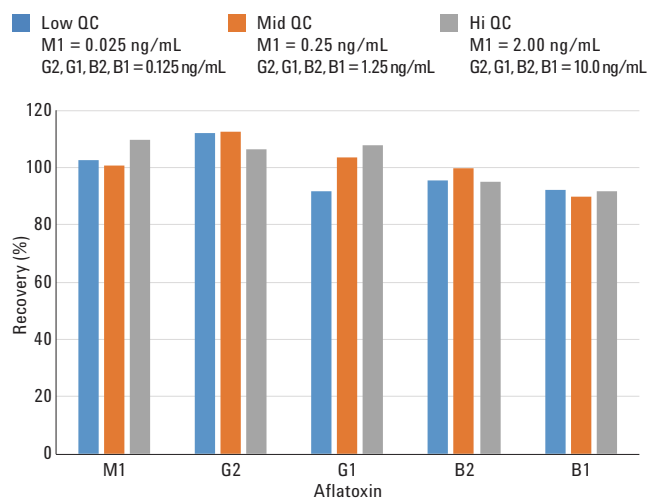


図 4. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用した場合の液体乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの回収率 (%). (n = 6)

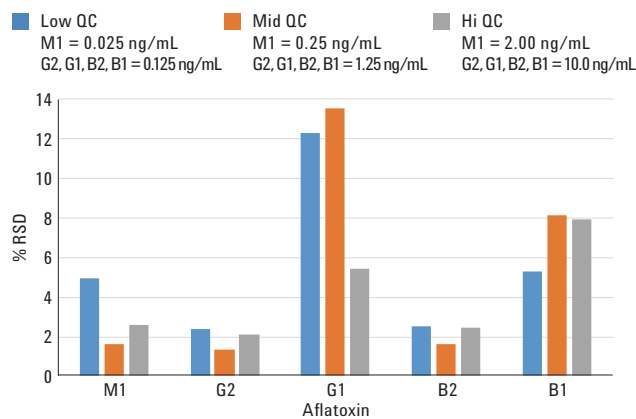


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid クリーンアップを使用した場合の液体乳児用調合乳中の 5 種のアフラトキシンの RSD (%). (n = 6)

分析済みサンプル

アフラトキシンを含む既知濃度の乳児用調合乳の参照標準試料は提供されておらず、購入できませんでした。そのため、このアプリケーションノートで詳細に説明したメソッドをさらに評価するために、欧州標準物質 (ERM) - BD283 (低レベルのアフラトキシン M1 を含む全脂粉乳) を入手しました。報告されているこの標準の認証値は $0.111 + 0.018 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした [17]。全脂粉乳標準は、ERM 認定レポートで詳細に説明されているメーカーの推奨事項に従って再溶解しました。手短に言うと、100 mL の水を 10 g の全脂粉乳に加えて、10 倍の希釈係数を導入しました。そのため、再溶解されたミルク中の濃度は、報告された濃度の 10 分の 1 ($0.0093 \sim 0.0129 \text{ ng}/\text{mL}$) になると予測されます。次に、この再溶解されたサンプルを、前述の手順と同じ手順に従って抽出します。この標準サンプル ($n = 1$) を、すべてのキャリブレーションと 3 段階の QC レベルサンプルと一緒に分析しました ($n = 3$)。標準サンプルが、LOQ (アフラトキシン M1 では $0.01 \text{ ng}/\text{mL}$) に近いレベルで定量されると予測したため、 $0.01 \text{ ng}/\text{mL}$ の LOQ QC ($n = 3$) を追加しました。表 7 にこの分析の結果を示します。ERM-BD283 が $0.0101 \text{ ng}/\text{mL}$ で定量されました。これは、参照物質で予測される範囲内です。このことは、乾燥乳児用調合乳 (水を加える) および液体乳児用調合乳サンプルを分析する場合の両方に、このメソッドが適用できる可能性を示します。

表 7. 分析済みサンプル ($n = 1$) および QC サンプル ($n = 3$) のアフラトキシン M1 の結果。

サンプル	予測濃度 (ng/mL)	計算された濃度 (ng/mL)	真度	RSD
低 QC	0.025	0.0219	88	1.9
中 QC	0.25	0.2378	95	1.1
高 QC	2.00	2.0285	101	0.6
LOQ QC	0.01	0.0107	107	4.7
ERM-BD283	0.0111	0.0101	91	N/A

結論

LC/MS/MS によって乳児用調合乳中のアフラトキシンを分析するための、シンプルで効果的なメソッドが開発されました。QuEChERS 手順を使用し、続いて Agilent Bond Elut EMR Lipid dSPE クリーンアップと、 MgSO_4 を使用した強化された脱水処理を実施して、サンプルを抽出しました。このメソッドは、広い直線範囲全体で、非常に高い回収率 (平均 101 %) および精度 (平均で RSD が 5.0 % 未満) を示しました。不要なマトリックス効果を伴わない濃縮ステップによって、LOQ が規制値を下回りました。

この手法では、望ましくない成分損失を発生させずに、EMR Lipid によって顕著なマトリックス除去を実現できます。優れた器具によるクリーンアップにより、クロマトグラフィーが改善され、メンテナンスとトラブルシューティングの作業は減少し、時間と費用の両方を節約できます。このソリューションは、専門知識と機器をあまり必要とせず、食品分析ラボで容易に実施できます。このアプリケーションはマイコトキシンの 1 つの種のみの特化していますが、EMR Lipid は多成分残留物を対象とするアプリケーションです。そのため、イムノアフィニティカラムとは異なり、EMR Lipid は、複数の種類のマイコトキシンの分析に容易に適用できます。今後も引き続き、他の複雑な高脂質サンプルで EMR Lipid クリーンアップについて調査します。

参考文献

- Jard, G.; Liboz, T.; Mathieu, F.; Guyonvarc'h; Lebrihi, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2011**, *28*(11), 1590–1609.
- Wang, H.; Zhou, X. J.; Liu, Y. Q.; Yang, H. M.; Guo, Q. L. Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2010**, *27*(9), 1261–1265.
- Sartori, A. V.; Swensson de Mattos, J.; Paulino de Moraes, M. H.; Wanderley de Nóbrega, A. Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **2015**, *8*(9), 2321–2330.
- Anon. Guidance for Industry. Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed; <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla>. Accessed on 7 October **2015**.

5. Anon. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701> Accessed on 11 February **2016**.
6. Meucci, V.; Razuoli, E.; Soldani, G.; Massart, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2010**, *27*(1), 64–71.
7. Dragacci, S.; Grosso, F.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M~1 in Liquid Milk: Collaborative Study. *J. of AOAC International* **2001**, *84*(2), 437–443.
8. Iha, M. H.; Barbosa, C. B.; Okada, I. A.; Trucksess, M. W. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. *Food Control* **2011**, *22*, 1971–1974.
9. Shundo, L.; Sabino, M. Aflatoxin M1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2006**, *37*, 164–167.
10. Bursić, V. P.; Vuković, G. Lj.; Jajić, I. M.; Lazić, S. D.; Cara, M. H.; Čolović, R. R.; Vukmirović, D. M. Analysis of Aflatoxins B1 and G1 in Maize by QuEChERS. *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad* **2013**, *124*, 51–57.
11. Filigenzi, M. S.; Ehrke, N.; Aston, L. S.; Poppenga, R. H. Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2011**, *28* (10), 1324–1339.
12. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN, **2015**.
13. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6096EN, **2015**.
14. Anon. *CPG Sec. 527.400 Whole Milk, Lowfat Milk, Skim Milk - Aflatoxin M1*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074482.htm> Accessed on 7 October **2015**.
15. Anon. *CPG Sec. 555.400 Foods - Adulteration with Aflatoxin*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm> Accessed on 7 October **2015**.
16. Anon. *CPG Sec. 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Feeds*. <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm> Accessed on 7 October **2015**.
17. Josephs, R.D.; Koeber, R.; Bernreuther, A.; Schimmel, H.; Ulberth, F.; *EUR Report 21202 EN – DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements*, **2005**. https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/rm/ERM-BD284_report.pdf

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

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。診断目的では使用できません。

本資料に記載の情報は、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 31, 2016

5991-6818JAJP



Agilent Technologies

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ および LC/MS/MS を用いたチーズ中の 複数の種類のマイコトキシンの分析

著者

Derick Lucas and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

脂質除去の製品である Agilent Captiva EMR-Lipid を、複数の種類のマイコトキシンを含むブルーチーズとパルメザンチーズの抽出物のクリーンアップに使用しました。脂肪含有量が高いチーズは、低濃度レベルでのマイコトキシンの正確な定量において課題を伴うことがあります。Captiva EMR-Lipid ではサイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせることにより、ターゲット化合物の回収率を落とさずに脂質炭化水素鎖を選択的に保持できます。Captiva EMR-Lipid 3 mL および 6 mL カートリッジによって、脂質の多いサンプル抽出物を通過させることでクリーンアップが可能になります。クリーンアップされた抽出物は LC/MS に直接注入するか、またはメソッド要件にあわせた追加処理ができます。この研究では、QuEChERS 法による抽出と Captiva EMR-Lipid カートリッジがクリーンアップを実施することにより、ブルーチーズとパルメザンチーズで 13 種類のマイコトキシンをバリデーションする方法について説明します。このメソッドではチーズ内のマイコトキシンを 0.5 ng/g まで検出可能で、その際の回収率は 70.7 ~ 111.8 % で RSD は < 20 % です。マトリックス除去の効率を評価するために、残留物の重量分析、GC/MS フルスキャン、リン脂質の LC/MS 検出、および脂質のフリーズアウトを用いました。

はじめに

マイコトキシンはさまざまな穀物でカビ類の二次代謝物として生成され、変異原性、発癌性、催奇性、および免疫原性の各効果と関連付けられます¹。チーズ内の汚染物は原材料に由来するか、または内生のカビによる天然合成により発生することがあります。チーズは特にカビの増殖による影響を受けやすく、保管条件や化学保存料によっても影響を受けます^{2,3}。複雑なサンプル内の低濃度で有害なマイコトキシンの検出および測定を実施するために、さまざまな免疫測定法や LC/MS メソッドをイムノアフィニティ、SPE、QuEChERS⁴、または安定同位体希釈⁵などのサンプル前処理法と組み合わせて使用します。高脂質サンプルは特に問題になることが多く、イムノアッセイのカラムなどのクリーンアップ製品は高価で、分析対象物やサンプルに特有のものになります。その他のクリーンアップ手段では、特に脂質などのマトリックス共溶出物を効果的かつ選択的に除去することは困難であり、再現性が低下して、マトリックス効果が発生し、機器に蓄積します。

Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL および 6 mL チューブを使用すると、複数の種類のマイコトキシンの分析において通過型クリーンアップが容易になり、脂質の多いサンプル抽出物から脂質が選択的に除去されます。チーズから 13 種類のマイコトキシンを抽出するために、QuEChERS (Quick (高速)、Easy (簡単)、Cheap (低価格)、Effective (効果的)、Rugged (高い耐久性)、Safe (安全)) 抽出法を用いました。QuEChERS はさまざまなクラスの分析対象物に関して抽出効率が高いことで定評がありますが、同時に大量のマトリックスを抽出してしまうこともあります。Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用することで脂質除去が高くなり、ターゲットのマイコトキシンを正確に定量できます。脂質除去を評価するために、マトリックス共溶出残留物の重量測定、GC/MS フルスキャン、LC/MS/MS によるリン脂質分析、および脂質のフリーズアウトの比較を用いました。ブルーチーズとパルメザンチーズに関するメソッドのパリデーションは、アフラトキシン (AF-B1、B2、G1、G2、M1)、オクラトキシン (OTA、OTB)、フモニシン (FB1、FB2、FB3)、ゼアラレノン (ZON)、ミコフェノール酸 (MPA)、およびステリグマトシステン (STC) の 3 段階のスパイク濃度レベルで実施しました。今回のメソッドでは、これらの高脂質サンプルマトリックス内の微量濃度のマイコトキシンに対して、優れた回収率、精度、および感度が達成されました。

分析方法

サンプル前処理

- Agilent Captiva EMR-Lipid 3 mL チューブ (部品番号 5190-1003)
- Agilent QuEChERS オリジナル法 (部品番号 5982-5555)
- Agilent VacElut SPS-24 真空マニホールド (部品番号 12234022)

LC の構成とパラメータ

構成	
構成要素	Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A) Agilent 1290 Infinity II マルチサンプルラ (G7167B) Agilent 1290 Infinity II マルチカラム恒温槽 (G7116B)
分析カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 100 mm、2.7 μm、LC カラム (部品番号 695775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、 2.1 × 5 mm、2.7 μm、ガードカラム (部品番号 821725-911)
カラム温度	40 °C
注入量	5 μL
移動相 A	5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 + 0.1 % ギ酸
移動相 B	1:1 ACN:メタノール + 0.1 % ギ酸
流量	0.5 mL/min
グラジエント	時間 (分) %B 0 5 1 50 4 60 7 98
ポストタイム	2 分
ニードル洗浄	1:1:1、H ₂ O、ACN、IPA (10 秒間)
バイアル	2-mL バイアル (部品番号 5190-4044) PTFE キャップ (部品番号 5182-0725) インサート (部品番号 5183-2086)

MS/MS の構成とパラメータ

構成	
	Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS (AJS 搭載)
MS/MS モード	ダイナミック MRM
イオンモード	ポジティブ/ネガティブ
ドライガス温度	250 °C
ドライガス流量	8 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	11 L/min
キャピラリ電圧	3,500 V
EMV	500 V (+)、0 V (-)
ノズル電圧	1,500 V (+)、0 V (-)

化合物	ブリーカーサイオン	定量イオン (CE)	定性イオン (CE)	フラグメント (V)	リテンションタイム (分)
アフラトキシン M1 (AF-M1)	329.1	313.0 (24)	115.1 (88)	135	1.842
アフラトキシン G2 (AF-G2)	331.1	313.0 (24)	115.1 (88)	165	1.916
アフラトキシン G1 (AF-G1)	329.1	243.2 (24)	200.0 (44)	175	2.018
アフラトキシン B2 (AF-B2)	315.1	287.0 (28)	259.0 (32)	175	2.104
アフラトキシン B1 (AF-B1)	313.1	285.2 (24)	128.1 (84)	170	2.223
¹³ C アフラトキシン B1 (IS)	330.1	301.1 (24)	-	170	2.223
フモニシン B1 (FB1)	722.4	352.3 (36)	334.4 (44)	200	2.810
オクラトキシン B (OTB)	370.0	205.0 (16)	120.1 (96)	120	3.282
ミコフェノール酸 (MPA)	321.1	302.9 (4)	206.9 (20)	90	3.304
フモニシン B3 (FB3)	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	3.780
ゼアラレノン (ZON)	317.1	175 (24)	131 (28)	175	4.155
フモニシン B2 (FB2)	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	4.511
オクラトキシン A (OTA)	404.1	239.0 (24)	120.1 (96)	120	4.604
ステリグマトシスチン (STC)	325.0	310.0 (24)	102.1 (96)	120	4.685

材料および試薬

定量とマトリックス除去の検討には、地域の食料品店で購入した食品サンプルを用いました。標準と内部標準はプレミックス溶液として、Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) または Romer Labs (ゲッツァースドルフ、オーストリア) から購入しました。LC 溶媒は Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。

メソッドバリデーション

チーズ中のマイコトキシンのバリデーションは、2つのダブルブランク、2つのブランク、6つのキャリブレーション、および3つのQCレベルから構成されるバッチで実施しました。QC は表 1 に示すように 5 回 (n = 5) の繰り返し分析でプレスパイクし、2セットの検量線用サンプルの間で注入しました。検量線は次の6つのレベルにより作成しました。0.25、1、5、10、20、および40 ng/mL (AF-B1、AF-B2、AF-G1、AF-G2、MPA、OTA、STC、およびZON)、0.125、0.5、2.5、5、10、および20 ng/mL (AF-M1 と OTB)、1.25、5、25、50、100、および200 ng/mL (FB1、FB2、およびFB3)。同位体標識された内部標準¹³C-AF-B1 は5 ng/mL でスパイクしました。

サンプル前処理の詳細な手順

チーズを2g 計量し、50 mL 遠心チューブに入れました。キャリブレーションとQCを相当するレベルでプレスパイクし、抽出前にチーズマトリックスに1時間以上完全に浸潤させました。次に、サンプルに10 mL の水を加え、5分間浸潤させました。サンプルに2% ギ酸を含む10 mL のアセトニトリルを加え、ジェノグラインダーで20分間縦方向に振とうして抽出しました。サンプルにQuEChERS オリジナル法キット (4 g MgSO₄、1.5 g NaCl) を加え、再度縦方向に2分間振とうしました。サンプルを5,000 rpm で5分間遠心分離しました。上部アセトニトリル層8 mL を新しいチューブに移動して2 mL の水 (容量で20%の水) で希釈し、ボルテックスしました。この抽出物 (2.5 mL) を3 mL Captiva EMR-Lipid チューブにロードし、自然落下で流しました。抽出物がCaptiva EMR-Lipid チューブを通して完全に溶出したら (約10分間)、1~10 Hg の圧力勾配で吸引してチューブ内の液をドレインしました。次に、1.25 mL の溶出液を新しい試験管に移動して40 °C の窒素気流の下で乾燥させ、ボルテックスと超音波処理により200 µL の85:15、5 mM ギ酸アンモニウム:アセトニトリルで再溶解させました。サンプルを、オートサンプリングパイプラインに移してLC/MS/MSで分析しました。

表 1. サンプル QC 濃度

分析対象物	LQ (ng/g)	MQ (ng/g)	HQ (ng/g)
AF-B1	1	5	10
AF-B2	1	5	10
AF-G1	1	5	10
AF-G2	1	5	10
AF-M1	0.5	2.5	5
FB1	5	25	50
FB2	5	25	50
FB3	5	25	50
MPA	1	5	10
OTA	1	5	10
OTB	0.5	2.5	5
STC	1	5	10
ZON	1	5	10

結果と考察

直線性

データは Agilent MassHunter 定量ソフトウェアで処理しました。13 種類のマイコトキシンに対して、直線回帰と $1/x^2$ 重み付けを適合させた場合の検量線 R^2 値は 0.990 を超えていました。すべてのキャリブレーションの真度が、予想された値の $\pm 10\%$ 以内に収まっていました。

回収率と精度の結果

表 2 では、この研究で得られた優れた結果を示しています。すべての QC について回収率は 70 ~ 120 % であり、すべてのレベルにおいて $\%RSD < 20$ でした (大部分は $\%RSD < 10$)。全体的にパルメザンチーズの方が良好な再現性を示していますが、これはブルーチーズと比較してマトリックスの複雑さが小さかったことが原因であると考えられます。初期の研究では最終の濃縮ステップが省略されていますが、サンプルサイズが小さいことや検出限界が低いことを考慮すると濃縮を実施する必要がありました。アセトニトリルによる抽出効率には限界があったため、この研究ではフモニシンのみはマイコトキシンの中で分析困難でした。最適化によって明らかになったことは、2 % ギ酸を加えることにより、他の種類に悪影響を与えずに分析対象物の溶解度が大幅に増大したということです。

表 2. ブルーチーズとパルメザンチーズ中の 13 種類のマイコトキシンに対する回収率と精度の結果 (n = 5)

分析対象物	LQ		MQ		HQ	
	回収率 (%)	%RSD	回収率 (%)	%RSD	回収率 (%)	%RSD
パルメザンチーズ						
AF-M1	111.8	1.5	95.6	5.9	96.3	1.7
AF-G2	101.8	2.2	98.5	3.8	104.6	3.2
AF-G1	102.2	2.8	89.1	2.2	93.9	6.6
AF-B2	108.5	1.5	101.5	4.2	103.5	2.4
AF-B1	103.2	5.1	84.9	2.7	90.3	2.9
FB1	79.4	6.7	71.3	3.2	74.2	2.2
OTB	109.6	1.7	98.5	7.2	106.0	1.8
MPA	111.3	8.6	103.6	2.1	107.5	4.6
FB3	98.2	7.1	90.6	8.1	92.0	5.0
ZON	98.0	7.8	85.8	4.0	88.2	2.8
FB2	101.9	5.5	92.4	7.8	95.6	3.8
OTA	104.7	10.4	89.4	5.7	92.6	2.5
STC	85.4	3.4	70.7	2.3	75.7	2.5
ブルーチーズ						
AF-M1	97.0	17.8	101.2	8.8	107.9	5.8
AF-G2	88.6	12.4	96.1	6.3	98.3	8.6
AF-G1	91.8	9.1	97.5	2.5	105.5	3.2
AF-B2	98.2	13.8	99.7	8.8	108.5	8.1
AF-B1	91.8	7.9	93.5	5.7	102.4	6.2
FB1	103.9	7.9	83.5	5.4	85.3	5.8
OTB	81.5	7.1	79.9	3.9	89.0	5.8
MPA	92.4	10.3	95.0	1.8	95.4	8.0
FB3	101.9	5.7	93.9	5.0	94.3	7.7
ZON	76.1	3.9	83.3	9.6	90.2	9.3
FB2	102.0	4.7	100.6	5.9	99.4	3.9
OTA	89.0	3.4	82.5	7.9	84.9	5.5
STC	100.0	3.0	74.3	13.4	70.9	6.8

EMR-Lipid のメカニズム

EMR-Lipid の選択性は、サイズ排除と疎水性相互作用を組み合わせたメカニズムに起因するものです。脂質は直線的で枝分かれのない炭化水素鎖を備えていますが、これは EMR-Lipid 充填剤に入り込むのに十分小さいものです。脂質は充填剤の内部に入り込むと、疎水性相互作用により所定の位置に取り込まれます。大部分の分析対象物には直線的で枝分かれのない炭化水素鎖は含まれておらず充填剤には入り込まないため、分析時には溶液中に残されたままになります。炭化水素鎖が短くなると (< 6 炭素) EMR-Lipid によってそれほど強く結合されず、鎖が長い脂質と同じくらいの効率では除去されません。EMR-Lipid 独自のメカニズムは、マトリックス干渉を受けやすい複数の種類の多成分残留分析に最適です。

他社製品との比較 – 回収率と精度

Captiva EMR-Lipid と市販されている他社の通過型クリーンアップカートリッジ 6 mL、500 mg について、回収率と精度を評価しました。この評価では、回収率と精度に影響を及ぼす抽出を避けるため、チーズ抽出物を直接スパイクしました。結果を表 3 に示します。Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップは高い回収率を示しており、特にゼアラレノン、オクラトキシン A、およびステリグマトシスチンに対して顕著に表れています。Captiva EMR-Lipid 独自の充填剤により、脂質を選択的に除去できます。一方、他社製品では、特に疎水性が高い分析対象物の場合、望まない対象物の吸着が生じることがあります。

マトリックス除去

チーズには、遊離脂肪酸、トリグリセリド、いくつかの低濃度リン脂質を含む、さまざまに異なるクラスの脂質が含まれています。タンパク質は、アセトニトリルベースの QuEChERS 抽出時に効率的に除去されます。脂質除去の評価には、残留物の重量測定、GC/MS フルスキャン、リン脂質の LC/MS/MS、脂質フリーズアウトを含む、定量および定性メソッドを用いました。

表 3. Agilent Captiva EMR-Lipid と他社のカートリッジパススルークリーンアップの回収率と精度の比較 (パルメザンチーズ抽出物、5 ng/mL、n = 4)

	Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジ		他社のカートリッジ	
	回収率 (%)	%RSD	回収率 (%)	%RSD
AF-M1	96.1	3.6	93.5	4.4
AF-G2	100.9	0.5	89.5	4.4
AF-G1	102.4	1.6	86.1	4.8
AF-B2	100.8	3.2	84.2	4.7
AF-B1	98.4	4.0	85.3	5.5
FB1	96.6	3.4	77.3	3.8
OTB	104.9	6.4	76.7	7.5
MPA	90.8	7.2	79.3	7.0
FB3	103.1	11.6	76.8	11.5
ZON	96.1	3.1	46.7	7.5
FB2	85.0	6.9	85.1	9.6
OTA	95.1	10.9	66.4	11.7
STC	99.6	4.1	50.1	10.3

GC/MS によるマトリックス除去のモニタリング

バリデーションは LC/MS/MS により実施していますが、サンプルの最終抽出物を GC/MS フルスキャンで比較することにより、マトリックスと脂質の除去に関する貴重な情報が得られます。Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後のサンプル抽出物内の残留水分を除去するために、MgSO₄ ベースの塩析を用いました。図 1 に、Captiva EMR-Lipid によるクリーンアップ前後における、ブルーチーズとパルメザンチーズの GC/MS フルスキャンクロマトグラムを示します。図に示されている黒のトレースは、クリーンアップを実施していないサンプル抽出物のクロマトグラムで、他のマトリックス共溶出物と同様に脂質も現れています。赤のトレース

は、Captiva EMR-Lipid カートリッジによるクリーンアップを用いて抽出されたサンプルのクロマトグラムです。Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後のブルーチーズ (赤) は 61 % のマトリックス除去を示しており、クリーンアップ後のパルメザンチーズ (紫) は 68 % のマトリックス除去を示しています。値は式 1 により計算しました。溶出時間が遅いマトリックスは完全に除去されており、溶出時間が早いマトリックスも大幅に減少しましたが、完全には除去されませんでした。チーズのクロマトグラフプロファイルは組成的には似ていますが、ブルーチーズにはパルメザンチーズと比較して、明らかに多量の遊離脂肪酸が含まれています。

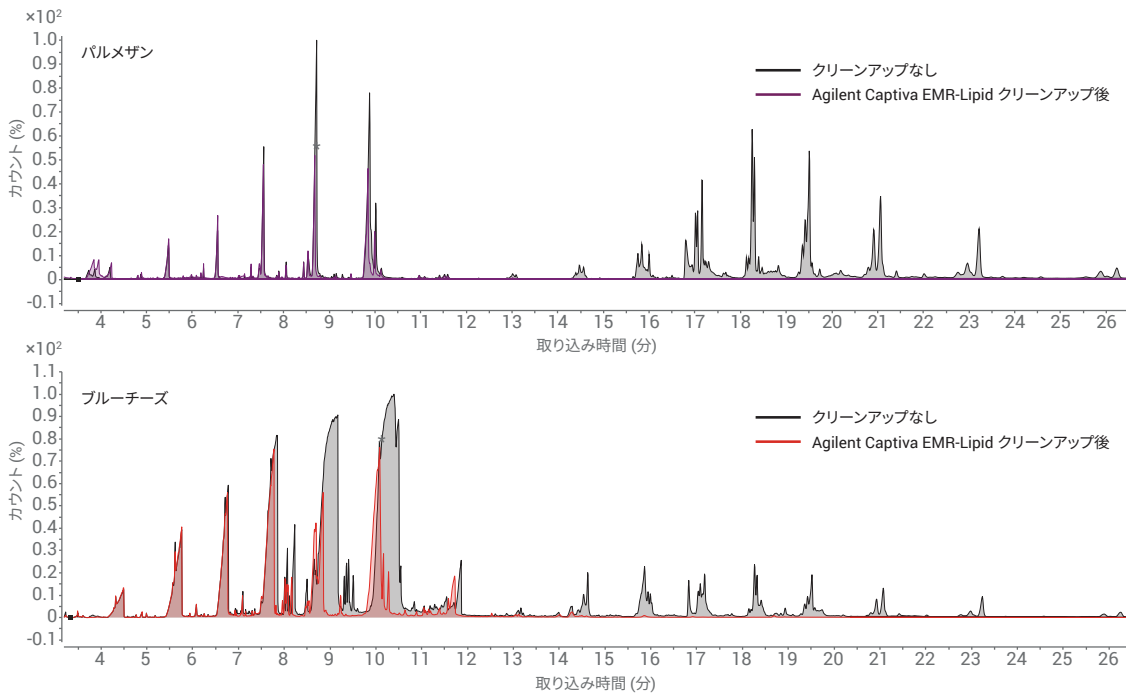


図 1. クリーンアップ前と Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後のチーズサンプルの GC/MS フルスキャンクロマトグラム比較によるマトリックス除去の評価

$$\% \text{マトリックス除去} = \frac{(\text{ピーク面積}_{\text{ブランク, クリーンアップなし}} - \text{ピーク面積}_{\text{ブランク, クリーンアップ後}})}{(\text{ピーク面積}_{\text{ブランク, クリーンアップなし}} - \text{ピーク面積}_{\text{試験ブランク}})} \times 100$$

式 1 クロマトグラムの総ピーク面積を用いた % マトリックス除去の計算

リン脂質除去の評価

図 2 はリン脂質除去をクロマトグラムで比較したものであり、 $m/z = 184$ プロダクトイオンの LC/MS/MS プリカーサイオンキャンを実施して作成しました。全体的に見て、ブルーチーズのリン脂質濃度は低く、パルメザンチーズではほとんど問題にならない値でした。黒のトレースはブルーチーズ抽出物からリン脂質が除去されていない状態を示し、赤のトレースは Captiva EMR-Lipid クリーンアップ後の状態を示しています。Captiva EMR-Lipid によるマトリックス除去を式 1 により計算すると、92 % になりました。

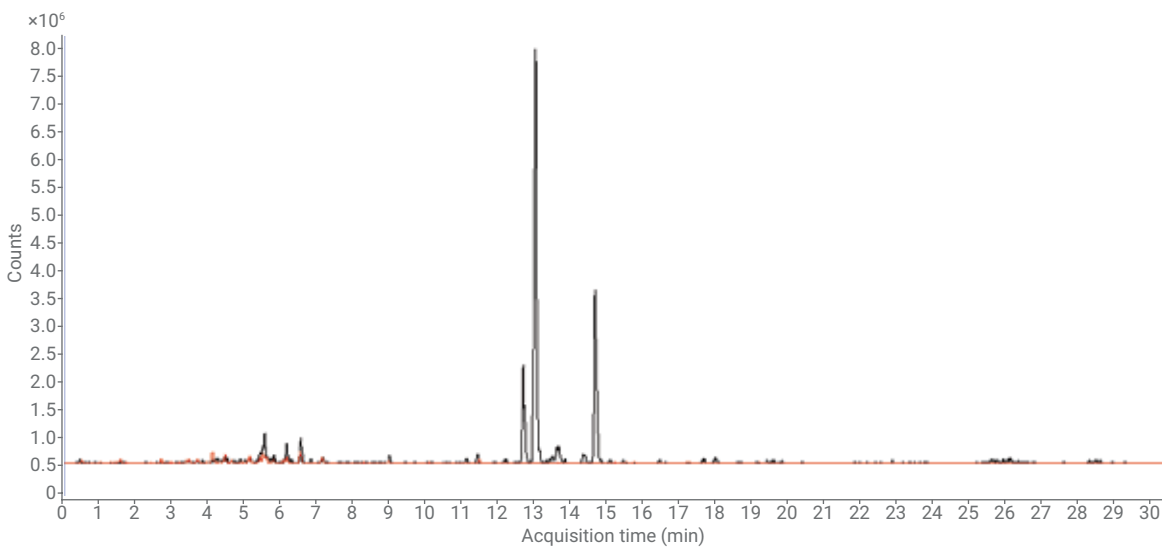


図 2. $m/z = 184$ の LC/MS/MS プリカーサイオンキャンによるブルーチーズのリン脂質除去

表 4. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによるブルーチーズとパルメザンチーズの共溶出残留物質量とマトリックス除去効率

	共溶出物質量 (mg)	マトリックス共溶出の除去効率 (%)
ブルーチーズ、クリーンアップなし	12.76	–
ブルーチーズ、Agilent Captiva EMR-Lipid	6.22	51.3
パルメザンチーズ、クリーンアップなし	5.81	–
パルメザンチーズ、Agilent Captiva EMR-Lipid	1.50	74.2

脂質のフリーズアウト

定性比較を実施するため、未処理のチーズサンプルと Captiva EMR-Lipid 処理後のサンプルを 0 °C の冷凍庫に 1 時間置き、沈殿した脂質を観察しました (図 3)。画像からわかるように、未処理のブルーチーズでは大量の脂質が沈殿しているのに対して、パルメザンチーズでは少量がプラスチックバイアルに付着しているだけです。Captiva EMR-Lipid 処理後に脂質のフリーズアウトを実施したサンプルには、観察できるほどの脂質は含まれていませんでした。

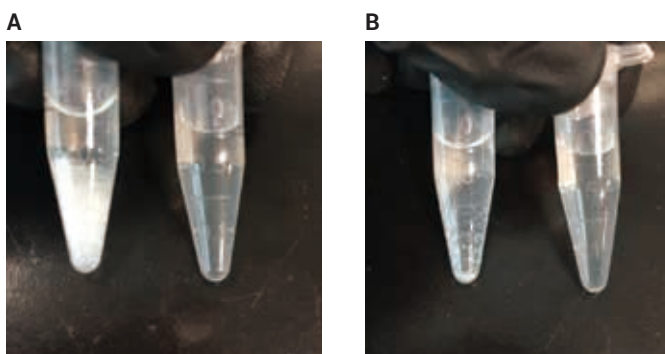


図 3. ブルーチーズ (A) とパルメザンチーズ (B) の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップに対する脂質のフリーズアウトの実験

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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. 2017
Printed in Japan, November 15, 2017
5991-8694JAJP

結論

この研究では、複数の種類のマイコトキシンの分析に関して、Agilent Captiva EMR-Lipid で簡単に効果的なクリーンアップができることが示されました。ブルーチーズとパルメザンチーズのメソッドバリデーションでは、優れた回収率 (70.7 ~ 111.8 %)、精度 (< 20 %)、および感度 (チーズ内で 0.5 ng/g まで検出可能) を達成しました。また、重量分析、GC/MS フルスキャン、リン脂質分析、および脂質のフリーズアウト比較により、効率的なクリーンアップが実施されていることがわかりました。ブルーチーズはパルメザンチーズより複雑でしたが、2 g のサンプルサイズで良好な結果が得られました。チーズでの検出限界をさらに低くする必要がある場合は、バリデーションプロトコルにおいて最大 5 g のパルメザンチーズを使用できます。Captiva EMR-Lipid を使用した場合の回収率は、市販の他社製クリーンアップ製品を使用した場合よりも大幅に高いことがわかります。脂質のマトリックス除去および分析対象物の回収率は幅広いアプリケーションにおいて高い値を示しており、この研究の範囲を上回っている場合もあります⁶。Captiva EMR-Lipid は、複数の種類の多成分残留分析で選択的な脂質クリーンアップが実施可能な新世代の製品であり、サンプル前処理を容易にすると同時にメソッドの性能向上を目指しているラボにとって最適です。

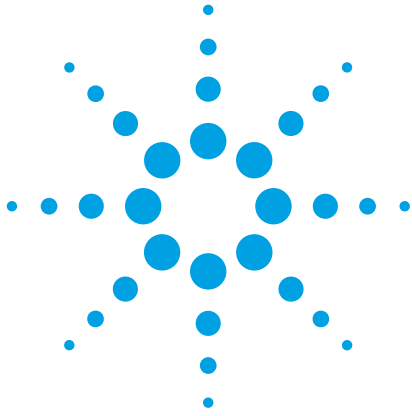
参考文献

1. Richard, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 119, 3–10.
2. Nolwenn Hymery; et al. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2014**, 13, 437-456.
3. Dian Bueno; et al. Determination of Mycotoxins in Food: A review of Bioanalytical to Analytical Methods. *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, 50, 728-774.
4. Lukas Vaclavik; et al. Determination of Multiple Mycotoxins in Dietary Supplements Containing Green Coffee Bean Extracts Using UHPLC-MS/MS. *J. Agric. and Food Chem.* **2013**, 61, 4822-4830.
5. Kai Zhang; et al. Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Isotope Dilution and LC-MS/MS. *J. Agric. and Food Chem.* **2014**, 62, 8935-8943.
6. L. Zhao; D. Lucas, Agilent Technologies, publication number 5991-8598EN.

PAH 分析



Enhanced Matrix Removal (EMR) を使用したサケのPAH 分析



Enhanced Matrix Removal (EMR) を 使用したサケの PAH 分析

アプリケーションノート

食品試験・農業・環境

著者

Derick Lucas and Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

要約

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、分解されにくい、縮合したベンゼン環で構成されています。これは、環境への蓄積や、煙により、水生生物に移行します。複雑な高脂質食品マトリックスでの PAH 分析は、共抽出したマトリックスが、分析流路内で干渉、マトリックス効果、および蓄積という形で正確な定量を妨げるため、困難を伴う場合があります。Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) は、次世代のサンプル前処理製品で、利便性の高い分散固相抽出 (dSPE) で使用することにより、分析対象物の回収率に影響を与えずに、選択性の高いマトリックス除去を実現できます。この実験では、サケの PAH 分析における、このサンプル前処理法の効率性について説明します。このメソッドは、15 の PAH 化合物すべてのあらゆるレベルにおいて、優れた真度 (84~115 %) と精度 (RSD = 0.5~4.4 %) を実現しているため、高脂質サンプルにおいて、高速、堅牢、かつ効率的な分析が実施できます。

はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) は、環境内のいたるところに存在する混入異物であり、石油由来の場合と燃焼由来の場合があります。これは、2 つ以上の縮合ベンゼン環に配置された水素と炭素から構成されており、置換基を 1 つ以上の環に付加できます [1]。PAH が問題となるのは、環境内に持続的に存在して、毒性、変異原性、および発がん性があることが知られていますが、その一部が哺乳類に影響を与えるためです [2]。魚介類の汚染は、水源内に蓄積した石油成分、および PAH を煙内に燃焼生成物として生成する加熱プロセスから発生することがあります [3、4]。これらの理由により、分析者が、問題とするレベルで混入異物の PAH を検出するには、堅牢で効率的なメソッドを使用することが重要になります。



Agilent Technologies

低レベルの PAH を検出するには、堅牢性の高い効率的なサンプル前処理法と GC/MS を組み合わせて使用します。一般的な前処理プロトコルには、ソックスレー抽出 [5]、超音波抽出 [6]、および加圧溶媒抽出 [7] があります。前処理法は、固相抽出 [8]、ゲル浸透クロマトグラフィー [9] などのクリーンアップ手順と組み合わせることができます。これらの時間と手間がかかる手法に伴う課題を解決するために、QuEChERS 法 (Quick, Easy, Effective, Rugged, and Safe) [10、11] をベースにしたプロトコルも同時に実施することにより、適切な結果が得られます [12、13、14]。複雑な食品サンプル、特に高脂質のサンプルにとっては、サンプル前処理法がますます重要になってきています。これは、共抽出したマトリックスが、分析流路内で干渉、マトリックス効果、および蓄積という形で、分析に有害な影響を与えるためです。

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal—Lipid (EMR—Lipid) は、新しい充填剤であり、対象とする分析物を誤って除去することなく、サンプル抽出物から主要な脂質類を選択的に除去します。脂質種の除去は、特に QuEChERS などの手法で重要になります。この手法は、ターゲット化合物から大量のマトリックスを共抽出します。従来では、分散固相抽出 (dSPE) 手順の間に、C18 および PSA の官能基の付いた充填剤を使用して、高脂質のサンプルを処理していました。ただし、これらの充填剤は、サンプルの適切なクリーンアップに失敗することがあり、対象化合物との間に非選択的な相互作用が発生する場合があります。この実験では、単純で効率的なワークフローを使用して、サケ内の 15 の PAH に関するサンプル前処理法と分析結果について調査します。このワークフローは、EMR-Lipid により適切なクリーンアップを行うと同時に、GC/MS において優れた真度と再現性を実現しています。

実験方法

分析は、Agilent 7890 GC と Agilent 5977 MSD (マルチモード注入口 (MMI) を装備)、Agilent 7693 オートサンブラ、およびカラムバックフラッシュでのキャピラリー・フロー・テクノロジーという構成で実施しました。表 1 は装置パラメータを示しており、表 2 はこの実験で使用した消耗品とその他の機器を示しています。

表 1. PAH 分析で使用した Agilent GC/MS システムの装置条件

GC:	Agilent 7890B
オートサンブラ:	Agilent 7693 オートサンブラ、10.0 µL シリンジ (G4513-80220)
注入量:	0.5 µL
キャリアガス:	ヘリウム、定流量
ガスフィルタ:	ガスクリーンフィルタ GC/MS 1/8 インチ (部品番号 CP17974)
注入口:	MMI、ホットスプリットレス注入モード (320 °C)
スプリットメントへの	
パーズ流量:	0.75 分で 50 mL/min
流量:	2.0 mL/min
昇温プログラム:	70 °C (1 分保持)、25 °C/min で 70 ~ 195 °C (5 分保持)、7 °C/min で 195 ~ 315 °C
カラム:	Agilent J&W DB-5ms UI、20 m × 0.18 mm、0.18 µm (部品番号 121-5522UI)
リストリクタ:	不活性化シリカチューブ、0.65 m × 0.15 mm (部品番号 160-7625-5)
試験後のバックフラッシュ:	315 °C で 5 分、バックフラッシュ時 70 psi
補助圧力:	測定時 2 psi、バックフラッシュ時 70 psi
MSD:	Agilent 5977 MSD
モード:	SIM
トランスファライン温度:	340 °C
イオン源温度:	325 °C
四重極温度:	150 °C
溶媒待ち時間:	3.5 min

表 2. その他の消耗品と機器

バイアル:	茶色スクリュートップ、ガラス (部品番号 5190-7041)
バイアルキャップ:	PTFE、9 mm、スクリュューキャップ (部品番号 5182-0717)
バイアルインサート:	ガラス、150 µL、樹脂足付 (部品番号 5183-2088)
セプタム:	長寿命、ノンスティック、11 mm、50 個 (部品番号 5183-4761)
フェラル:	ベスベル/グラファイト、85:15、内径 0.4 mm (部品番号 5181-3323)、UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (部品番号 G3188-27501)
注入口ライナ:	シングルテーパ、スプリットレス、ウルトラライナート (部品番号 5190-7041)
キャピラリー・フロー・テクノロジー (CFT):	UltiMetal Plus Ultimate ユニオン (部品番号 G3186-60580)、CFT キャピラリーフィッティング (部品番号 G2855-20530)
Bond Elut EMR—Lipid 分散キット (dSPE):	15 mL チューブで 1 g (部品番号 5982-1010)
Bond Elut for Enhanced Matrix Removal-Lipid 脱水キット:	15 mL チューブで 2 g (部品番号 5982-0101)

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 およびマルチチューブ 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ベンサ (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

サンプル前処理

均質化した重量 (5 g) のサケを 50 mL 遠心管に注入し、必要に応じて、標準物質および同位体標識された内部標準をスパイクしました。サンプルにアセトニトリル (ACN) (10 mL) を加え、振とう機で 2 分間混合しました。次に、遠心管を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。上澄み液 (8 mL) を、1 g の EMR—Lipid 充填剤の入った 15 mL 遠心管に移しました。ただちにボルテックスミキサーで分散させ、さらに 60 秒間ボルテックスミキサーで追加攪拌しました。その後、5,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄み液はすべて、2.0 g の塩 (1:4 NaCl:MgSO₄) の入った 2 番目の 15 mL 脱水キットに静かに移し、分散させるために即座にボルテックスミキサーで攪拌した後、5,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄みの ACN 層を、GC/MS 分析用にサンプルバイアルに移しました (図 1)。

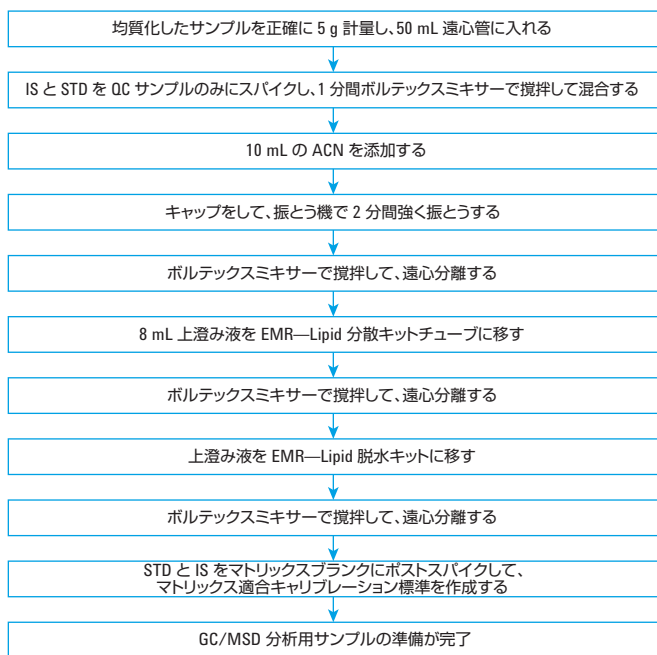


図 1. GC/MS による分析前の、Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid を使用した、サケの PAH に対するサンプル前処理のワークフロー

試薬および薬品

試薬および溶媒はすべて、HPLC グレード以上のものを使用しました。ACN は、Honeywell (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から購入し、水は、EMD Millipore Milli-Q Integral System (ダルムシュタット、ドイツ) を使用して精製しました。PAH 標準および内部標準は、Ultra-Scientific (ノースキングスタウン、ロードアイランド州、米国) から溶液として購入しました。原液は、アセトン (100 µg/mL) で調製し、作業標準用に茶色バイアルで希釈しました。

検量線と定量

マトリックス適合検量線は、キャリブレーションの全範囲で、1、10、25、50、100、250、500、および 1,000 ng/g に対応して生成しました。サケのブランク測定は、サンプル前処理手順と 950 µL ブランク抽出物、25 µL 標準溶液、および 25 µL 原液内部標準で実施しました。内部標準は、サケにスパイクし、マトリックス適合キャリブレーション標準 100 ng/g でポストスパイクしました。全検量線は、すべての化合物に対して $R^2 > 0.999$ の優れた直線性を示しました。サケのサンプルは、6 回の繰り返し測定で抽出する前に、25、100、および 500 ng/g の各レベルでプレススパイクしました。ターゲット化合物の定量には、Agilent MassHunter ソフトウェアを使用しました。真度値は、内部標準を基準にしてスパイクされたサンプル応答を計算し、決定しました。絶対回収率値は、内部標準補正を行わずに、プレススパイクした対象化合物の検量線に対する応答を測定して、決定しました。

結果と考察

7890 GC と 5977 GC/MSD は、15 の PAH と 5 つの内部標準に対して、優れたパフォーマンスを実現し、高感度でも一貫した結果を示しました。図 2 は、Agilent DB-5ms UI カラムにより、サケ内で 25 ng/g のプレスパイクを実施した場合に、15 の PAH で実現した分離状態を示しています。クロマトグラムは、15 の PAH すべてにおいてベースライン分離を示しており、これは、PAH 異性体フェナントレン、アントラセン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、およびベンゾ[k]フルオランテンのピークを正確に計算するために重要になります。クロマトグラム内の一部に見られる少量の干渉は、対象ピークから簡単に分離できます。

25、100、および 500 ng/g の各スパイクレベルで、EMR-Lipid とともに最適化された手順を使用することにより、優れた真度と精度が実現されます。図 3 は、同位体標識された内部標準補正を使用することにより、すべての対象化合物のあらゆるレベルにおいて、真度が 84 ~ 115 % の範囲内にあることを示しており、この場合 RSD は 0.5 ~ 4.4 % の範囲内にあります (図 4)。真度データは、図 5 の回収率の範囲にグループ化されます。これは、大部分の化合物は、90 ~ 120 % の範囲内に収まっていますが、2 つの化合物については 90 % を少し下回っていることを示しています (インデノ[1,2,3-cd]ピレンとベンゾ[g,h,i]ピレン)。

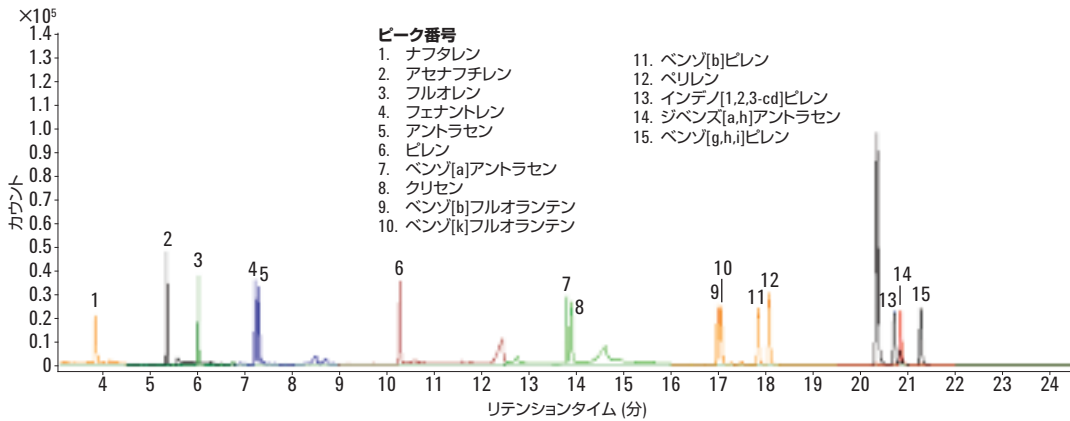


図 2. サケでの 25 ng/g プレスパイクから得られた 15 の PAH の GC/MS SIM クロマトグラム

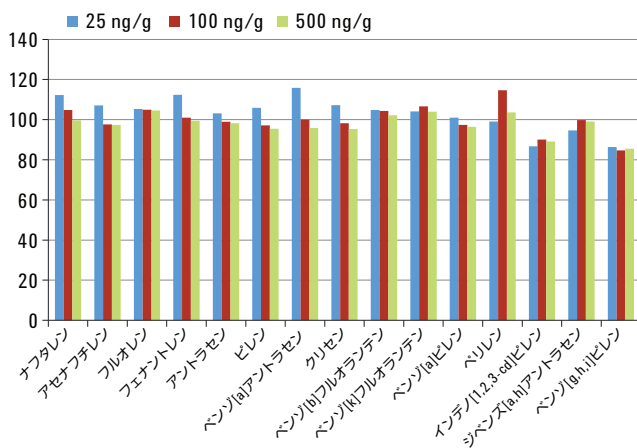


図 3. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける 15 の PAH の真度の結果

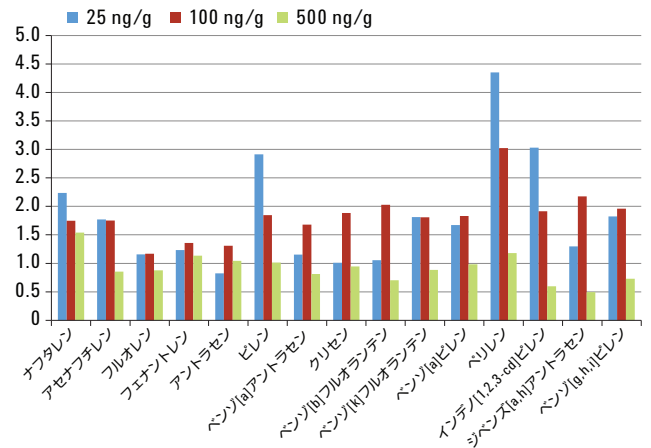


図 4. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける 15 の PAH の精度の結果

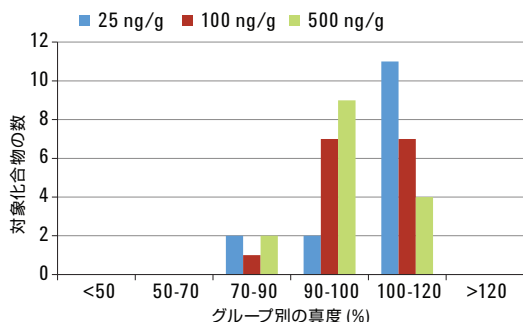


図 5. サケでの 25 ng/g、100 ng/g、および 500 ng/g の各レベルにおける PAH のグループ化された真度の結果

絶対回収率は、内部標準を使用せずに、62~98 % の範囲内でした (表 3)。2 つの化合物、インデノ[1,2,3-cd]ピレンとベンゾ[g,h,i]ピレンについては、回収率が 70 % を少し下回っています。PAH 絶対回収率は、ACN 内の可溶性の低下が原因で、分子量が増加したときに減少します。ただし、大部分の回収率は高い値で、内部標準を使用して簡単に補正できます。表 4 に示すように、内部標準の絶対回収率も高い値です。ACN の可溶性には限界があるにもかかわらず、このメソッドでは、高脂質のサケのサンプルにおいて、優れた回収率と高い再現性を示す結果が得られました。

表 3. この実験で使用した、サケでの PAH とその真度、絶対回収率、および相対標準偏差 (RSD) (n = 6)

化合物	25 ng/g スパイク			100 ng/g スパイク			500 ng/g スパイク		
	真度	絶対回収率	%RSD	真度	絶対回収率	%RSD	真度	絶対回収率	%RSD
ナフタレン	112.2	86.7	2.2	104.8	89.7	1.7	99.7	85.8	1.5
アセナフチレン	107.1	90.1	1.8	97.6	89.9	1.8	97.3	90.6	0.9
フルオレン	105.3	94.6	1.2	105.0	94.2	1.2	104.6	96.2	0.9
フェナントレン	112.3	95.3	1.2	101.0	94.1	1.4	99.4	94.5	1.1
アントラセン	103.1	91.6	0.8	98.9	90.7	1.3	98.3	92.6	1.0
ピレン	105.8	97.6	2.9	97.1	88.9	1.8	95.4	89.7	1.0
ベンゾ[a]アントラセン	115.8	91.2	1.2	100.1	84.7	1.7	95.8	85.7	0.8
クリセソ	107.2	83.6	1.0	98.2	83.2	1.9	95.4	85.4	0.9
ベンゾ[b]フルオランテン	104.8	78.3	1.1	104.3	76.1	2.0	102.2	79.2	0.7
ベンゾ[k]フルオランテン	104.1	78.8	1.8	106.6	77.5	1.8	104.0	80.3	0.9
ベンゾ[a]ピレン	101.0	74.2	1.7	97.4	71.8	1.8	96.4	74.8	1.0
ペリレン	99.1	74.4	4.4	114.7	76.4	3.0	103.6	80.3	1.2
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	86.7	66.1	3.0	90.0	66.2	1.9	89.1	69.1	0.6
ジベンズ[a,h]アントラセン	94.7	73.9	1.3	99.7	72.2	2.2	99.0	76.2	0.5
ベンゾ[g,h,i]ピレン	86.4	64.7	1.8	84.7	62.3	2.0	85.6	66.3	0.7
平均	103.0	82.7	1.8	100.0	81.2	1.8	97.7	83.1	0.9

EMR-Lipid 分散固相抽出 (dSPE)

サケを代表サンプルとして選択したのは、他の魚介類と比較して脂質の含有量が高いことがその理由です。最適化された手順は、いくつかの方法において一般的な QuEChERS プロトコルからは逸脱しています。これらの方法では、ワークフローを簡素化し、EMR-Lipid dSPE クリーンアップ手順を利用しています。最初に、ACN により、サケを直接抽出しますが、余分な水や QuEChERS 抽出塩は使用しません。遠心分離後、上澄み液は ACN とサンプルからの少量の水で構成されています。この上澄み液を、dSPE マトリックス除去用に、EMR-Lipid 分散キットに移します。最後に、分散キットの上澄み液を、2.0 g NaCl/MgSO₄ (1:4) を含む脱水キットに移し、相分離を誘導します。次に、上澄みの ACN 層をバイアルに移し、分析を行います。

表 4. サケでの内部標準に対する絶対回収率と精度 (RSD (%)) (n = 6)

化合物	100 ng/g スパイク	
	絶対回収率	%RSD
ナフタレン-d8	87.8	1.0
アセナフチレン-d10	93.3	0.8
フェナントレン-d10	94.9	0.8
クリセソ-d12	87.1	1.0
ペリレン-d12	86.4	3.1
平均	89.9	1.3

EMR プロトコルでは一般的なことです。このアプローチでは、サンプルサイズを大きくして、クリーンアップを改良しました。その結果として、メソッドの全体的な感度が向上します。従来の EMR—Lipid プロトコルの場合、分散キットの充填剤を活性化させるために、水を添加します。一方、この最適化されたプロトコルの場合、水を添加することにより、PAH の可溶性が低下し、絶対回収率に悪影響を与えることがわかりました。したがって、抽出から生じた上澄み液を、水を添加せずに直接、EMR-Lipid チューブに移します。これにより、GC/MS SIM 分析での適切なクリーンアップが行われます。EMR-Lipid 分散キットおよび EMR-Lipid 脱水キットに上澄み液を添加した後、即座に混合を行うことにより固体が懸濁され、充填剤との間に最大の相互作用が発生し、凝集が回避されます。最適なマトリックス除去の場合、分散キットに水分を添加して、回収率を内部標準を使用して補正することにより、優れた真度と精度が実現されます。

結論

この実験では、高脂質のサケのサンプルで、低濃度から高濃度にわたる PAH を効率的に定量するための、高速で簡単なメソッドについて説明しています。ワークフローは、QuEChERS の場合と同様に簡単ですが、新しい EMR—Lipid dSPE 充填剤を使用して、脂質の共抽出物を最小限にし、回収率を最大限にすることにより、高レベルの精度を実現します。

サケなどのマトリックス内の脂質含有量は、大幅に異なる場合もありますが、Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal—Lipid は、すべての脂質に使用できる充填剤であり、対象化合物とは相互作用が発生しません。脂質除去は、分散キットの手順の間に、EMR—Lipid で水を添加することにより、最大化されます。ただし、このケースでは、水を添加することにより、PAH の可溶性が低下するため、PAH サンプル前処理には適していません。今後の実験では、処理が困難なタイプのサンプルやアプリケーションに対して、引き続き EMR—Lipid を最適化し、現在および次世代のクロマトグラフと検出システムで対応可能な脂質含有量の範囲を拡大していく予定です。

表 5. GC/MS SIM メソッドにおける、ターゲット化合物、リテンションタイム、ターゲットイオン、および内部標準の名称

化合物	GC/MS (SIM)			
	RT	ターゲットイオン	ドウェル (ミリ秒)	内部標準
ナフタレン	3.89	128.0	20	ナフタレン-d8
アセナフチレン	5.37	152.0	20	アセナフチレン-d10
フルオレン	6.05	166.0	20	アセナフチレン-d10
フェナントレン	7.25	178.0	20	フェナントレン-d10
アントラセン	7.34	178.0	20	フェナントレン-d10
ピレン	10.31	202.0	20	フェナントレン-d10
ベンゾ[a]アントラセン	13.83	228.0	20	クリセン-d12
クリセン	13.93	228.0	20	クリセン-d12
ベンゾ[b]フルオランテン	16.99	252.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[k]フルオランテン	17.08	252.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[a]ピレン	17.85	252.0	20	ベリレン-d12
ベリレン	18.09	252.0	20	ベリレン-d12
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	20.72	276.0	20	ベリレン-d12
ジベンズ[a,h]アントラセン	20.87	278.0	20	ベリレン-d12
ベンゾ[g,h,i]ピレン	21.29	276.0	20	ベリレン-d12
内部標準				
ナフタレン-d8	3.87	136.0	20	—
アセナフチレン-d10	5.52	162.0	20	—
フェナントレン-d10	7.22	188.0	20	—
クリセン-d12	13.86	240.0	20	—
ベリレン-d12	18.03	264.0	20	—

参考文献

1. Anon. *Compendium Method TO-13A*. Environmental Protection Agency (EPA) of the United States of America, Cincinnati, OH, USA, **1999**.
2. Guo, Y.; Wu, K.; Xu, X. *J. Environ. Health* **2011**, *73*, 22-25.
3. Beyer, J.; Jonsson, G.; Porte, C.; Krahn, M. M.; Ariese, F. *Environ. Tox. and Pharma.* **2010**, *30*, 224-244.
4. Essumang, D. K.; Doodoo, D. K.; Adjei, J. K. *J. Food Composition and Analysis* **2012**, *27*, 128-138.
5. Takigami, H.; Suzuki, G.; Hirai, Y.; Sakai, S. *Chemosphere* **2009**, *76*, 270-277.
6. Ali, N.; Dirtu, A. C.; Eede, N. V. D.; Goosey, E.; Harrad, S.; Neels, H.; 't Manneetje, A.; Coakley, J.; Douwes, J.; Covaci, A. *Chemosphere* **2012**, *88*, 1276-1282.
7. Stapleton, H. M.; Keller, J. M.; Schantz, M. M.; Kucklick, J. R.; Leigh, S. D.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2365-2379.
8. Sverko, E.; Tomy, G. T.; Marvin, C. H.; Zaruk, D.; Reiner, E.; Helm, P. A.; Hill, B.; Mccarry, B. E. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 361-366.
9. Saito, K.; Sjödin, A.; Sandau, C. D.; Davis, M. D.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y.; Patterson, Jr., D. G. *Chemosphere* **2004**, *57*, 373-381.
10. Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D.; Schenck, F. S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412-431.
11. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615-629.
12. Forsberg, N. D.; Wilson, G. R.; Anderson, K. A. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8108-8116.
13. Smith, D.; Lynam, K. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Analysis in Fish by GC/MS Using Agilent Bond Elut QuEChERS Sample Preparation and a High Efficiency DB-5ms Ultra Inert GC Column*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5990-6668EN, **2012**.
14. Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *758*, 80-92.

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. 2015

Printed in Japan

July 30, 2015

5991-6088JAJP



Agilent Technologies

Agilent CrossLab サービス: 稼働時間を最大化する総合サポート

業界最高レベルを誇る Agilent CrossLab サービスのエキスパートが、機器の性能を最高の状態でご使用いただくお手伝いをいたします。機器の移行、アプリケーションのコンサルティング、修理、点検サービス、コンプライアンス検証、トレーニングなどの業界最高のサービスも提供しています。詳細については、アジレントにお問い合わせください。



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. 2018
Printed in Japan, May 29, 2018
5991-6950JAJP

