

マトリックスリッチな試料に新しい提案!

ジルコニアコート化シリカゲルを用いた

固相抽出カラム・ 分散固相抽出製品



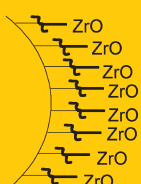
はじめに

ジルコニアコート化シリカゲル (Z-Sep) の特長と脂質除去の仕組み

ジルコニアコート化シリカゲル (Z-Sep) はルイス酸-塩基の相互作用により、水酸基、リン脂質、一部の有機リン系農薬、フッ化物に対して強く保持するため、これらの官能基を有するマトリックスが存在する場合、高い除去効果を発揮します。シリカゲルにジルコニアのみを結合したZ-Sepと、C18とジルコニアの両方を結合したZ-Sep+の2種類があります。

Z-Sep (HybridSPE-PL)

- シリカゲルにジルコニアを化学結合

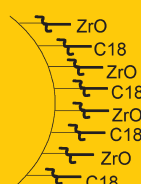


Z-Sep

担体：シリカゲル
粒子径：20 μm
ポアサイズ：120 $\text{\AA}$
表面積：350 m^2/g
被覆率：ZrO₂%=3.5

Z-Sep+

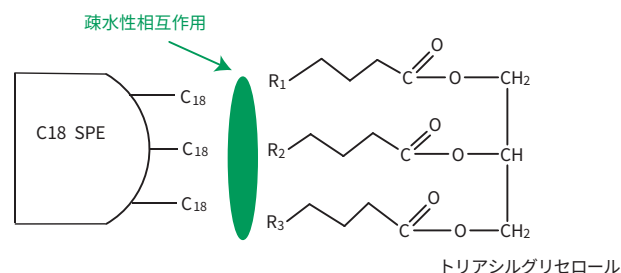
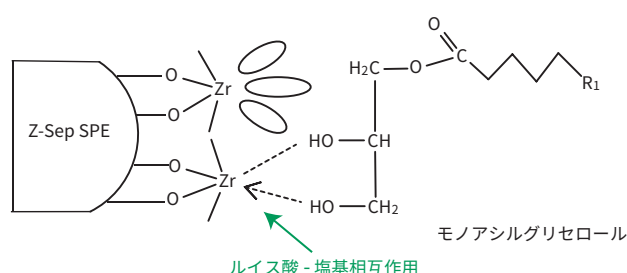
- シリカゲルにジルコニアとC18の両方を化学結合



Z-Sep+

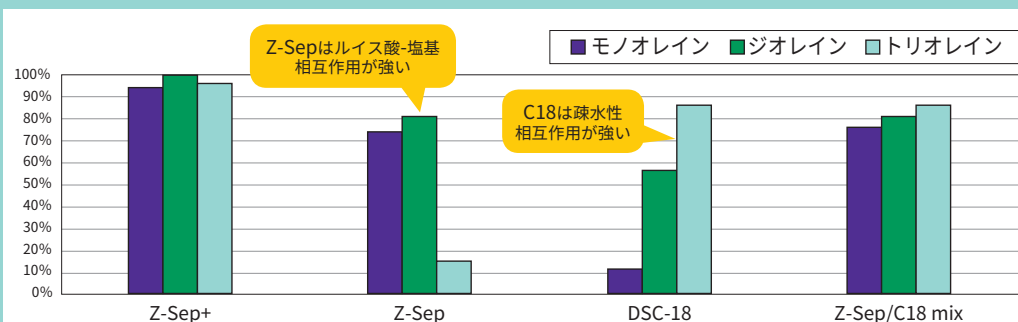
担体：シリカゲル
粒子径：50 μm
ポアサイズ：70 $\text{\AA}$
表面積：480 m^2/g
被覆率：ZrO₂%=4.5, C18%=16

Z-Sep と C18 の 保持メカニズム



各充填剤によるオレインの除去率

25 mgの充填剤に1 mLのオレイン溶解アセトニトリル溶液 (400 mg/mL) を混合



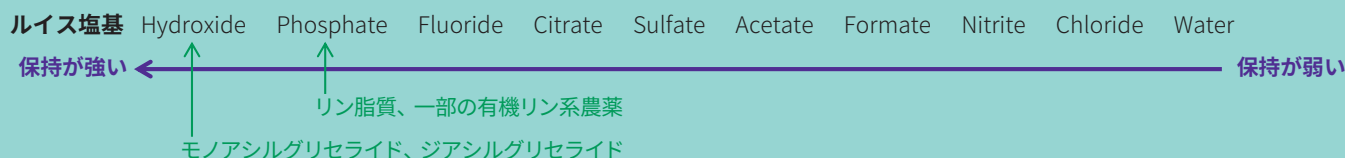
選ぶ point!

試料の脂質含有量が
15% 以上の場合 Z-Sep+
15% 以下の場合 Z-Sep/C18
リン酸系化合物の回収率を
上げたい場合 Z-Sep/C18

食品中の脂質を除去するために行われている、ヘキサンを用いた液液抽出や、C18での追加精製、凍結乾燥等の前処理法よりも、Supelco®の脂質除去剤「Z-Sep+」と「Z-Sep/C18」は簡単な操作法で高い精製効果を発揮し、モノ・ジ・トリオレインを除去します。

ジルコニア (ZrO₂:ルイス酸) との相対的な保持の強さ

サンプルマトリックスより弱いルイス塩基は保持されずに溶出し、強いルイス塩基 (脂質など) は保持されます。



充填剤の特長

ジルコニア

- 脂質、脂肪、色素を除去します。
- 15%以下の脂質を含む場合はZ-Sep/C18、15%を超える脂質を含む場合はZ-Sep+、対象物質が疎水性の場合はZ-Sepを使用します。

PSA

- 糖、脂肪酸、有機酸、脂質と極性色素の除去において使われます。
- C18とともに使用する場合、脂質とステロールも除去することができます。
- GCBとともに使用する場合、より多くの色素を除去することができます。

ENVI-Carb™ (GCB)

- 色素、ポリフェノールなどの極性化合物を強力に除去する充填剤です。

C18

- 脂質類や、ステロール、無極性の物質を取り除きます。

製品ラインナップ

● Z-Sep+

脂質の割合が目安として 15% 以上の場合に使用します。シリンジ型と QuEChERS法用の分散固相タイプがあります。

● Z-Sep

脂質の割合が目安として 15% 以下の場合、リン系化合物の回収率を上げたい場合に使用します。シリンジ型と QuEChERS法用の分散固相タイプがあります。

※シリンジ型タイプの製品名は HybridSPE™-PL と表記されています。

● Supelclean™ Ultra 2400 **NEW**

シリンジ型タイプで充填剤量の少ない固相抽出カラムですので、簡易・迅速に前処理が可能です。上層は、PSA・C18・グラファイトカーボンを混合しています。PSA は糖、有機酸、脂肪酸、極性色素の除去、C18 は油分を含む疎水性の干渉物の除去、新設計のグラファイトカーボンは、平面構造を持つ化合物の回収率を高めながら、色素、ポリフェノールなどの極性化合物を除去します。下層には、C18 では取り切れない油性残留物や色素を除去できる、Z-Sep を充填しています。トルエンを使用せず、アセトニトリルで分析対象物を溶出できるため、従来製品と比較し使用しやすくなっています。

● Supelclean™ EZ-POP NP **NEW**

シリンジ型タイプで上層が酸やアルコールと相互作用のあるフロリジル、下層が Z-Sep/C18 の混合物で、脂肪酸、モノおよびジアシルグリセロールの除去効果があります。オイル系の試料（オリーブ油、トウモロコシ油などの食用油）中のマトリックスから、非極性の残留性有機汚染物質 (POP)、特に多核芳香族炭化水素 (PAH) を抽出するのに適しています。脂肪マトリックスは優先的にカートリッジにより保持される一方、非極性の POP はアセトニトリルで洗浄されます。

● Supel™ QuE Verde **NEW**

分散固相抽出 (dSPE) タイプで、硫酸マグネシウム、グラファイトカーボン、PSA、Z-Sep+ で構成されています。クロロフィル濃度の高いサンプル（例えば、ホウレン草、レタス、オレガノ）などで農薬の高い回収率が期待できるように設計されています。



製品リスト

固相抽出カラム（シリンジ型タイプ）

製品名 / 詳細	構成する充填剤	シリンジサイズ	入数	カタログ番号
Supelclean™ Z-Sep+	Z-Sep+ : 500 mg	6 mL	30	52972-U
Supelclean™ Z-Sep/C18 Mixed Bed	Z-Sep : 120 mg and C18 : 300 mg Mix	6 mL	30	54282-U
Supelclean™ Ultra2400	bed A, Supelclean™ PSA, Discovery™ C18, and Spherical Carbon : 120 mg bed B, Z-Sep: 100 mg	1 mL	108	52779-U
	bed A, Supelclean™ PSA, Discovery™ C18, and Spherical Carbon : 270 mg bed B, Z-Sep: 225 mg	3 mL	54	54281-U
Supelclean™ EZ-POP NP	bed A, Supelclean™ LC-Florisil : 1.25 g bed B, Z-Sep/C18:1.25 g	12 mL	20	54341-U
HybridSPE™ -PL ※シリーズ名は異なりますが、 充填剤は Z-Sep を使用しています。	HybridSPE™ -PL(Z-Sep) : 30 mg	1 mL	100	55261-U
		1 mL	200	55276-U
	HybridSPE™ -PL(Z-Sep) : 100 mg	3 mL	54	52797-U
	HybridSPE™ -PL(Z-Sep) : 500 mg	6 mL	30	55267-U

QuEChERS法用 dSPE 精製チューブ

製品名 / 詳細	構成する充填剤		遠沈管サイズ	入数	カタログ番号
Supel™ QuE Z-Sep	Z-Sep : 75 mg		2 mL	100	55411-U
	Z-Sep : 500 mg		15 mL	50	55491-U
Supel™ QuE Z-Sep+	Z-Sep+ : 75 mg		2 mL	100	55408-U
	Z-Sep+ : 500 mg		15 mL	50	55486-U
Supel™ QuE Z-Sep/C18	Z-Sep : 20 mg	C18 : 50 mg	2 mL	100	55284-U
	Z-Sep : 120 mg	C18 : 300 mg	15 mL	50	55506-U
Supel™ QuE Z-Sep+/MgSO ₄	Z-Sep+ : 50 mg Z-Sep+ : 300 mg	MgSO ₄ : 150 mg MgSO ₄ : 900 mg	15 mL	50	55511-U
Supel™ QuE Verde	Z-Sep+ : 60 mg ENVI-Carb™ Y : 10 mg	MgSO ₄ : 150 mg PSA : 50 mg	2 mL	100	55447-U
	Z-Sep+ : 480 mg ENVI-Carb™ Y : 80 mg	MgSO ₄ : 1200 mg PSA : 400 mg	15 mL	50	55442-U

充填剤 & 関連製品

製品名 / 詳細	入数	カタログ番号
Z-Sep (20 μm, 120 Å, 350 m ² /g)	20 g	55418-U
Z-Sep+ (50 μm, 70 Å, 480 m ² /g)	20 g	55299-U

アプリケーション

アボカドの残留農薬分析における脂質による妨害の軽減 p.7

脂質を多く含む食品は、農薬分析が困難です。Z-Sep+ を用いた前処理では従来からの PSA/C18 と比較し、色素や不要なマトリックスを除去できているため分析対象物の回収率が高まります。

使用した製品 **Supel™ QuE Z-Sep+**

エビのクロラムフェニコールにおける迅速抽出と低濃度検出法 p.9

水産物であるエビ中のクロラムフェニコール分析を、QuEChERS法で前処理を行いました。Z-Sep+ を用いることで、従来の C18 精製剤よりも色素の除去、イオン化抑制を生じさせず、再現性に優れた結果が得られました。

使用した製品 **Supel™ QuE Z-Sep+ Supel™ QuE Z-Sep Supel™ QuE Z-Sep/C18**

牛の腎臓における農薬分析回収率の改善 p.11

畜産物中から疎水性農薬を有機溶媒で抽出した場合、多くの不要な脂質も抽出してしまいます。このようなサンプルには従来 PSA/C18 を用いてきましたが、Z-Sep+ を使用すると疎水性の農薬に対して回収率を大きく落とすことなく、コレステロールを含む妨害成分の除去が効果的に行えます。

使用した製品 **Supel™ QuE Z-Sep+**

卵、鶏肉、マヨネーズにおけるフィプロニルとその分解代謝物の GC/MS 測定 p.13

鶏卵分析の抽出・前処理に QuEChERS法を適用しました。鶏卵に含まれる多くの脂質成分は、Z-Sep+ により効果的に除去することができます。また鶏肉やマヨネーズのような加工食品にも適用できます。

使用した製品 **Supel™ QuE Z-Sep+**

QuEChERS と積層 SPE カラムを前処理に用いたショウガ粉末中の残留農薬分析 p.14

ショウガの成分にはテルペン類、ギンゲロール類、およびショウガオール類が存在、夾雑成分が多く複雑なため、残留農薬分析は難しいことで知られています。ショウガ中の残留農薬分析は QuEChERS法を用いることができますが、抽出後にクリーンアップステップを実行することが必須です。ショウガ粉のような乾燥品ではバックグラウンドが大きすぎるため、QuEChERSを用いたクリーンアップでは効率的に行えないことがよくあります。そこで固相抽出(SPE)シリンジ型カートリッジはQuEChERS法でのクリーンアップより精製効果が高いため、この種の試料に適しています。本アプリケーションでは、新しいシリンジ型二層SPEカートリッジであるSupelclean™ Ultra 2400を用いてショウガ粉のQuEChERS抽出物をクリーンアップした後、LC-MS/MSとGC-MS/MSの2つの方法で分析を検証しました。

使用した製品 **Supelclean™ Ultra 2400 Supel™ QuE**

色素の多い野菜・ハウレンソウに残留する 平面構造を持つ農薬（プラナー農薬）の分析前処理 p.18

グラファイトカーボン色素除去効果がとても高く有用ですが、平面構造を持った農薬の回収率を下げてしまいます。Supel™ QuE Verde には、精製効果の高い Z-sep+、PSA に加え、色素の除去効果が出るよう最適化したグラファイトカーボンを混合しているため、クロロフィル等の色素を除去すると同時に平面構造を持った農薬の回収率を改善できました。

使用した製品 **Supel™ QuE Verde**

脂質・色素の多いウコン粉末におけるプラナー農薬の前処理 p.19

Supelclean™ Ultra 2400 には、色素を除去しながらも、溶出にトルエンを必要とせず平面構造を持った農薬の回収率を高める新しいグラファイトカーボン、脂肪酸の除去に効果的な PSA、そして脂質の除去に最適な C18 と Z-sep といった効果的な 4 つの吸着剤が 1 つのカラムに混合されています。この固相抽出カラムを使用することで、脂質や色素の多い複雑なサンプルマトリックスの前処理を改善することが可能です。

使用した製品 **Supelclean™ Ultra2400**

パプリカパウダーにおける 多環芳香族炭化水素（PAHs）の分析 p.24

ハーブとスパイスに含まれる低レベルな PAHs の分析の前処理には、従来、ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）やシリカゲル等がありました。Supelclean™ EZ-POP NP は食用油中の PAHs のクリーンアップのために開発され、脂質や色素の除去を改善する Z-Sep/C18 と Florisil の二層構造になった固相抽出カラムです。PAHs の抽出効率を上げるために塩化メチレンを用いると抽出物のバックグラウンドが上昇しますが、このカラムを使用することにより、妨害成分の影響を抑え、4-6 環の PAH の回収率を向上させることができます。

使用した製品 **Supelclean™ EZ-POP NP**

畜水産物中における残留農薬等の一斉分析 p.28

畜水産物中（牛肉、牛脂、肝臓、鶏卵、牛乳、うなぎ、鮭、しじみ）における残留農薬の測定において、Z-Sep/C18（オクタデシルシリル化シリカゲルおよびジルコニア結合シリカゲル）混合ミニカラムを用いることで効果的に夾雑成分を除去し、再現性の高い LC/MS/MS、GC/MS/MS 測定結果を得る事が出来ました。

使用した製品 **Supelclean™ Z-Sep/C18 Mixed Bed**

アボカドの残留農薬分析における脂質による妨害の軽減

Supel™ QuE Z-Sep+ QuEChERS およびSLB™-5ms GC Column を使って



アボカドは健康に良い効果をもたらす脂肪、食物繊維、ビタミンおよびミネラルが多く含まれているため、体に良いと言われています。米国におけるアボカド消費量は、国内、海外産ともに着実に増加しています¹。アボカドの脂質含有量は通常10～15%で、サンプル抽出物から脂質を除去しないと正確な濃度を測定することはできません。また、GCおよびLC装置、カラムが汚染され、消耗品交換コストが発生してしまいます。

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe の頭文字、以降 QuEChERSと表記します) 法は、果物や野菜の残留農薬分析時の抽出や精製の前処理方法として広く使用されています²⁻⁴。抽出ステップではアセトニトリルとMgSO₄を用いて塩析をおこないます。その後、精製ステップとして分散型SPE (dSPE) を加えて混合、遠心分離を行い、各種クロマトグラフにて測定します。クリーンアップ用の吸着剤としては以下の充填剤が挙げられます。

- **PSA (第1級～第2級アミン) :**
極性の色素、糖および有機酸の除去
- **グラファイトカーボンブラック :**
クロロフィルおよびカロテノイド類の除去
- **C18 :**
脂質および非極性成分の除去
- **ジルコニア :**
脂質成分の除去

Supel™ QuE Z-Sep+の充填剤はひとつのシリカ粒子にC18とジルコニアが結合しています。C18は疎水性相互作用で脂質と結合するのに対し、ジルコニアはルイス酸として作用し、モノグリセリドおよびジグリセリド中の水酸基 (-OH) のような電子供与基を有する化合物を保持します。

実験

アボカド抽出物からの脂質除去効率について、Z-Sep+とPSA/C18の2種のクリーンアップ吸着剤を比較しました。使用した抽出方法とクリーンアップ方法について表1にまとめます。農薬を添加したもの（疎水性農薬と極性農薬の混合物で20 ng/g）と添加しなかったものをそれぞれ複数回処理しました。抽出物はすべて大量注入口装置 (LVI) を用いてGC/MS (SIMモード) で測定しました。定量は、マトリックスマッチング標準溶液で作成した校正曲線を用いて行いました。

表1 抽出方法およびクリーンアップ方法

1. 均質化したアボカド3 gを、50 mLの遠心管 (カタログ番号 55248-U) に移す。
2. アセトニトリル25 mLを加え、1分間攪拌する。
3. Acetate Extraction Tube (カタログ番号 55234-U) を加え、1分間攪拌する。
4. サンプルを5分間遠心分離する。
5. 上記4の上澄み3 mLをZ-Sep+ Cleanup Tube (カタログ番号 55296-U) に移して、攪拌、遠心分離し、その上澄み1 mLをGC分析用バイアルに移す。
6. 上記4の上澄み3 mLをPSA/C18 Cleanup Tube (カタログ番号 55229-U) に移して、攪拌、遠心分離し、その上澄み1 mLをGC分析用バイアルに移す。

結果と考察

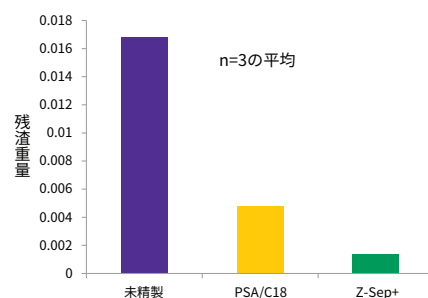
マトリックスの除去

Z-Sep+を用いてクリーンアップした抽出物の方が色が薄くなりました (図1)。これは、Z-Sep+の方がPSA/C18よりも多くの色素を除去していることを示しています。また上澄みに残ったマトリックス残渣の重量を測定するため、いくつかの抽出物について重量分析もしました (図2)。クリーンアップをしなかったサンプルについても示してあります。図から、Z-Sep+吸着剤を用いてクリーンアップした抽出物の方が、不要なマトリックス残渣が少ないことが分かります。

図1 精製後のアボカド抽出サンプル



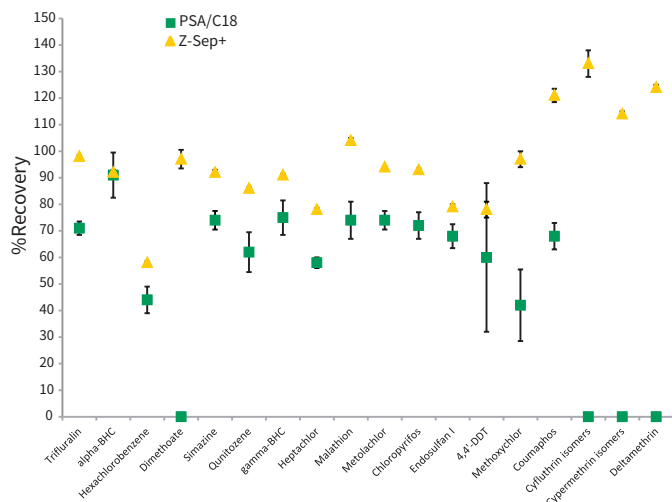
図2 マトリックス残差量



農薬回収率

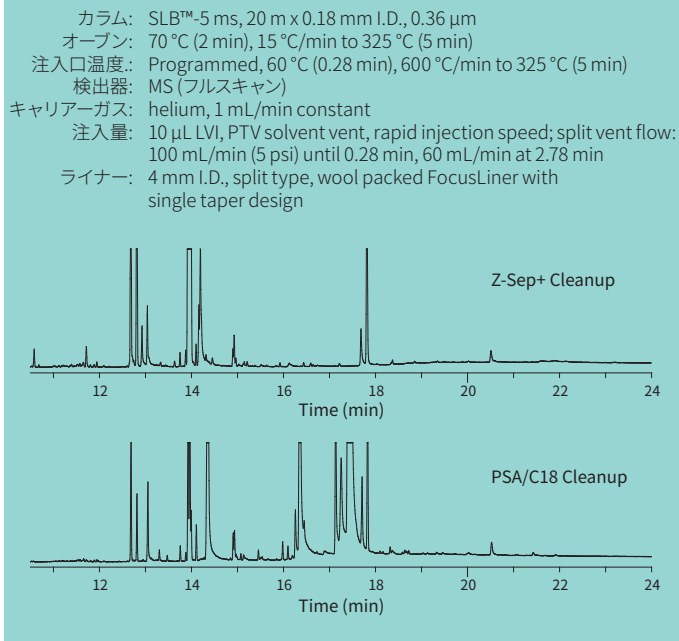
回収率データを算出するため、農薬添加サンプルと未添加サンプルをそれぞれ複数回測定しました。感度向上のため、MSはSIMモードで測定しました。ほとんどすべての農薬について、回収率はZ-Sep+の方が高く、再現性も優れていました(図3)。PSA/C18クリーンアップ後の抽出物では、数種の農薬について回収率が得られませんでした。これは、サンプルマトリックスが多く残留していたためです。

図3 農薬回収率と広がり (n=3)



下記に、Z-Sep+で精製した抽出物およびPSA/C18で精製した抽出物のGC/MS (フルスキャン) クロマトグラムを示します(図4)。Z-Sep+にて精製したクロマトグラムの方がマトリックスの妨害が少ないことが分かります。Z-Sep+は、脂質を含む食品中の農薬における分析の精製においてPSA/C18よりも優れていました。

図4 GC-MS クロマトグラム (same y-axis)



Featured and Related Products

製品名	数量	カタログ番号
Supel™ QuE QuEChERS Products		
Acetate Extraction Tube, 12 mL	50	55234-U
Citrate Extraction Tube, 12 mL	50	55227-U
Citrate/Sodium Bicarbonate Extraction Tube, 12 mL	50	55237-U
Z-Sep+ Cleanup Tube, 15 mL	50	55486-U
PSA/C18/ENVI-Carb™ Cleanup Tube, 15 mL	50	55474-U
PSA/C18 Cleanup Tube, 15 mL	50	55439-U
PSA/ENVI-Carb™ Cleanup Tube 1, 15 mL	50	55446-U
PSA/ENVI-Carb™ Cleanup Tube 2, 15 mL	50	55464-U
PSA Cleanup Tube, 12 mL	50	55228-U
Empty Centrifuge Tube, 50 mL	50	55248-U
SLB™-5ms Capillary GC Columns		
30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μm	1	28471-U
30 m x 0.25 mm I.D., 0.50 μm	1	28473-U
20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 μm	1	28564-U
Analytical Solvents		
Acetonitrile for GC-MS SupraSolv™		1.00665

エビのクロラムフェニコールにおける迅速抽出と低濃度検出法

Z-Sep+ 吸着剤を用いた前処理 (QuEChERS法) とAscentis™ Express C18 LC-MS/MS による分析

Emily Barrey, Senior R&D Scientist; Olga Shimelis, Principal R&D Scientist; Michael Halpenny, R&D Technician; and Jennifer Claus, Product Manager

緒言

クロラムフェニコールは薬効範囲が広い抗生物質ですが、再生不良性貧血の原因物質や、ヒトに対する発がん性物質であるとも懸念されています。これらの健康懸念から、養殖の魚やエビなど動物へのクロラムフェニコールの使用は禁止されました。今の取り決めではこの抗生物質の許容量はゼロですが、発展途上国では現在もおこの薬品が広く入手可能であると同時に、食品中の安全な残留基準値は定められていません¹。したがって、食品中のクロラムフェニコール残留量を高精度かつ高感度で測定する分析手法が必要とされています。

QuEChERS法は、様々な種類の分析対象物ならびにマトリックスに対する汎用の試料調製法になりつつあります²⁻⁴。本報告では、クロラムフェニコールの分析に先立ち、数種のQuEChERS吸着剤を用いてエビ試料の精製を行い、分析対象物の回収率、再現性およびイオン化効率を比較しました。

実験

冷凍エビ試料を均質化し、1 gの試料を9 mLのアセトニトリルで抽出、試料を振とうし遠心分離しました。上澄みを取り、ギ酸を90 µL加え、それぞれ500 mgのZ-Sep+、Z-Sep、C18分散型吸着剤と混合しました。試料を振とう、遠心分離したのち、8 mLの上澄みを乾固させ、水に再溶解しました。

0.3 ppbになるよう添加した抽出液と未添加の抽出液を複数回処理しました。すべての試料を、負電荷エレクトロスプレーイオン化 (ESI) を用いてLC-MS/MSで測定しました。その後この試料を溶媒校正標準液を用いてマトリックスの影響を明らかにするため、マトリックスマッチング法にて定量しました。

結果

図1aおよび1bは、吸着剤による色素除去の違いを示しています。図1aでは、抽出液は無色で、Z-Sep+、C18およびZ-Sepのすべてがエビのマトリックスから色素を除去したことが分かります。図1bは、精製用吸着剤を用いずに抽出した試料で、時間が経つと沈殿を生じたことを示しています。このように測定を妨害する色素およびエビ試料中の固形マトリックス成分を除去するには、QuEChERS吸着剤を用いることが有効です。

図 1a 精製サンプル

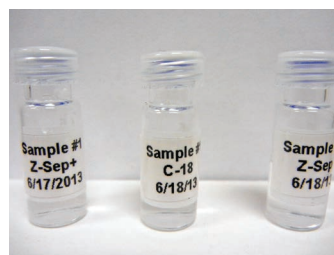


図 1b 未精製サンプル



図2に、マトリックスマッチング標準液を用いた場合と溶媒校正標準液を用いた場合それぞれの、分析対象物の回収率と相対標準偏差 (%RSD) を比較しました。全般的なクロラムフェニコール回収率は、各種精製法に対して許容範囲 (97%超) にありました。しかし、エラーバーで示されるように、Z-Sep+では他の分散型吸着剤よりも高い再現性が得られました。

図 2 マトリックスマッチング標準液を用いた場合と溶媒校正標準液を用いた場合の、分析対象物の回収率と %RSD (n=4)

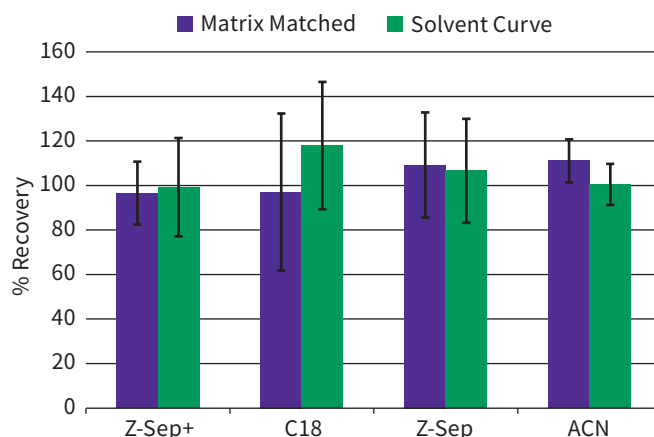


図3は、それぞれの精製法に対するイオン化効率を、絶対検量線からの偏差で示しています。QuEChERSによる精製を行わなかった場合、アセトニトリル抽出に対してイオン化抑制が見られます。C18精製法の場合にイオン化促進が見られます。図4に、0.3 ng/gでクロラムフェニコールを添加したエビ試料のクロマトグラムを示しました。

図3 溶媒曲線からの偏差によるイオン化効率

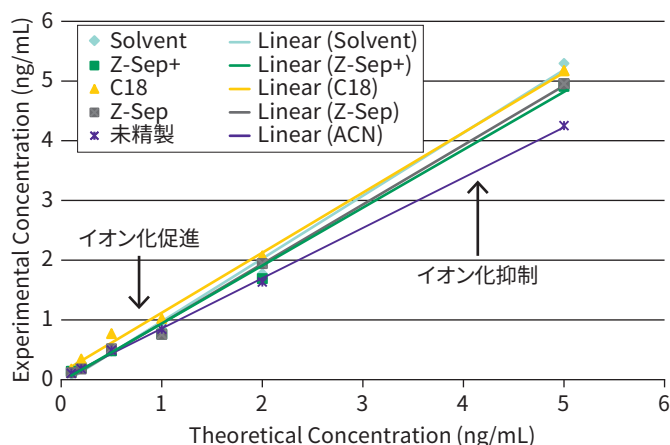
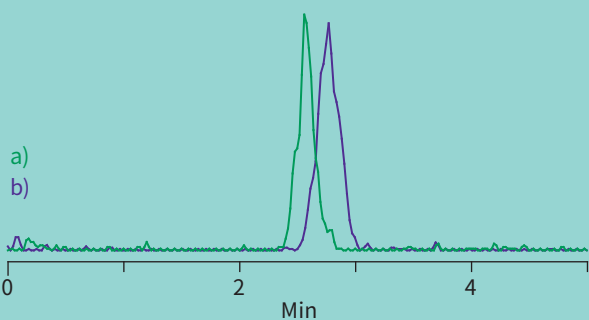


図4 LC-MS/MS クロマトグラム

a) エビ抽出液中のクロラムフェニコール (0.3 ng/g)
b) エビ抽出液中の内部標準液 (0.6 ng/g)

カラム: Ascentis™ Express C18, 5 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particles
(カタログ番号 53822-U)
移動相溶媒: (A) water; (B) acetonitrile
グラジエント: 15% B for 0.1 min, 15–80% in 1.9 min, held at 80% for 1.5 min,
80–15% in 0.5 min, at 15% for 3 min
流速: 0.5 mL/min
カラム圧力: 190 bar
検出器: MS/MS, ESI(+), MRM, 320.9/151.9, 326/157
注入量: 10 µL
サンプル: chloramphenicol or internal standard spiked at 0.3 ng/g in
shrimp extract



結論

クロラムフェニコールに対してQuEChERS型の試料前処理法とLC-MS/MSを用いた測定法を開発しました。QuEChERS法による精製用吸着剤を用いて抽出した試料は、イオン化抑制をおこさず、時間が経っても試料の沈殿を生じることはありませんでした。Z-Sep+吸着剤を用いてQuEChERSによる精製を行った場合、高い回収率が得られ、Z-SepあるいはC18による精製を用いた場合より、優れた再現性が得られました。Fused-Core Ascentis™ Express C18カラムを用いる事で、分析時間の短縮と良好な分離ピークが得られました。これらのことから、新規精製用吸着剤であるSupel™ QuE Z-Sep+とFused-Core技術、そしてLC-MS/MSを組み合わせることで、エビ試料中のクロラムフェニコールに対する迅速で高感度な低濃度検出法の開発に成功しました。

参考文献

1. UC Davis, University of California website. <http://safeseafood.ucdavis.edu/background.htm> (accessed Sept 2013)
2. Lehotay, S. J. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for the Determination of Pesticide Residues. Proceedings AOAC Annual Meeting, St. Louis, MO USA, 2004.
3. AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
4. EN15662:2008, Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE-QuEChERS-method.

Featured and Related Products

製品名	カタログ番号
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, 50 ea	55248-U
Z-Sep+ Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55486-U
Z-Sep Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55491-U
Discovery™ DSC18, bulk sorbent, 200 g	52600-U
Ascentis™ Express HPLC Column	
C18, 5 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particles	53822-U
Analytical Solvents	
Acetonitrile, LC-MS	1.00029
Water, LC-MS	1.15333
Analytical Standards	
Chloramphenicol	31667-250MG
DL-threo-Chloramphenicol-d ₅	41724-1MG

Related Products

製品名	カタログ番号
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Citrate Extraction Tube, 12 mL, 50 ea	55227-U
Acetate Extraction Tube, 12 mL, 50 ea	55234-U
Z-Sep/C18 Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55506-U
Ascentis™ Express HPLC Column	
C18, 3 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particles	53802-U
C18, 10 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particles	53823-U
Vials	
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL	29652-U

牛の腎臓における農薬分析回収率の改善

Z-Sep+ による疎水性農薬への適用



Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist, and Jennifer Claus, Product Manager

家畜の農薬のばく露は、生産者にとって重大な懸念事項です。たとえば有機塩素系農薬の場合、多くの国で使用が厳しく制限されているものの、今なお農作物中に低濃度で検出されることがあります¹。有機塩素系、ピレスロイド系のような疎水性農薬は生体内で脂肪組織に蓄積するため、食肉中に残留している恐れがあります。

肉から農薬を抽出する現在の方法では有機溶媒を使用しますが、妨害となる不要な脂質マトリックスも一緒に抽出されてしまいます。そのため、クロマトグラフィー分析前に、冷凍、液-液分配、固相抽出 (SPE)、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) およびマトリックス固相分散 (MSPD) などの手法を使ってサンプルのクリーンアップを行う必要があります^{1,2}。

QuEChERS クリーンアップ充填剤

QuEChERS法は、近年、残留農薬分析の前処理として、果物、野菜および脂質マトリックスの抽出、精製に広く用いられるようになってきました^{3,5}。抽出ステップではアセトニトリルと硫酸マグネシウムを用いて塩析します。精製は、以下のような充填剤を用いた分散型SPE (dSPE) を用います。

- **PSA (第1級～第2級アミン) :**
極性の色素、糖および有機酸の除去
- **カーボン :**
クロロフィルおよびカロテノイド類の除去
- **C18 :**
脂質および非極性成分の除去

通常、脂質マトリックスを除去するには、PSAとC18を組み合わせて使用します⁶。Z-Sep+は新しいクリーンアップ用充填剤であり、脂質および色素除去用に開発されたものです。Supel™ QuE Z-Sep+は、ひとつのシリカ粒子にC18とジルコニアが結合しています。ジルコニアはルイス酸として作用し、モノグリセリドおよびジグリセリド中の水酸基 (-OH) のような電子供与基を有する化合物を保持し、C18は疎水性相互作用で脂質と結合します。

実験

この研究では、GC/MSを用いた牛の腎臓中における残留農薬分析前の脂質成分除去について、Supel™ QuE Z-Sep+とPSA/C18とを比較します。牛の組織中によく見られる疎水性農薬および防カビ剤 (有機塩素系、ピレスロイド系、ジフェニル防カビ剤および農薬共力剤) を測定しました^{6,7}。

抽出方法およびクリーンアップ方法はAOAC法2007.01に基づいており、表1にまとめました³。農薬を添加した腎臓抽出サンプルと未添加サンプルをそれぞれ複数回処理しました。農薬添加サンプルは、疎水性農薬をそれぞれ10 µg/mLとなるようアセトニトリルで調製し混合したものを、50 ng/gになるようサンプルへ添加しました。

マトリックスマッチング標準溶液を、それぞれの充填剤に対して10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mLおよび60 ng/mLで調製しました。抽出物はGC/MS分析に供し、マトリックスマッチング標準溶液で調製した校正曲線で定量しました。

表1 抽出方法およびクリーンアップ方法

1. 均質化した牛腎臓10 gを、50 mLの遠心管 (カタログ番号 55248-U) に加える。農薬添加品の場合は、10 µg/mLの添加溶液50 µLを加える。
2. アセトニトリル25 mLを加え、1分間振とう。
3. Acetate Extraction Tube (カタログ番号 55234-U) の内容物を加え、1分間振とう。
4. 5分間遠心分離。
5. 上澄み3 mLを、クリーンアップチューブ、Z-Sep+ Cleanup Tube (カタログ番号 55296-U) あるいはPSA/C18 Cleanup Tube (カタログ番号 55229-U) に移す。
6. 1分間振とうした後、3分間遠心分離。
7. 抽出物をGC/MSへ直接注入して測定。

マトリックスの除去

フルスキャンモードで抽出物を測定し、Z-Sep+およびPSA/C18によるクリーンアップの前後で残留しているバックグラウンドを比較しました (図1)。クリーンアップしていない試料には主に脂肪酸から成るマトリックスが多く見られます。これはいずれの吸着剤によっても減少しました。30分頃に溶離している大きなピークは、コレステロールと特定されていますが、クリーンアップで減少しています。2種のクリーンアップを比較すると、Z-Sep+の方がPSA/C18よりもバックグラウンドを低減させることが分かりました。

クロマトグラフィー

バックグラウンド比較結果と同様、SIMモードで測定した農薬添加サンプルのクロマトグラム (TIC) でも、Z-Sep+ よりもPSA/C18の方がクリーンアップ後に多くのマトリックスが残っていました (図2)。PSA/C18でクリーンアップしたサンプルの方は、マトリックス効果が見られます。これはエンドスルファンIおよびII、4,4'-DDE、ピペロニルブトキシド、ピフェントリンおよびペルメトリンで顕著です。

農薬回収率

表2に示したように、いずれのクリーンアップでも回収率は通常許容される70~120%の範囲に収まりました³。%RSDで示される再現性も両クリーンアップ法で同等でした。ジフェニルアミンおよび4,4'-DDEを除くほとんどの農薬について、Z-Sep+の方がPSA/C18より高い回収率を示しました。

結論

新しいクリーンアップ充填剤であるSupel™ QuE Z-Sep+が、牛腎臓マトリックスのクリーンアップに適していることを示すことができました。有機塩素系殺虫剤やピレスロイド系のような疎水性農薬に対して、回収率を大きく落とすことなくバックグラウンドを効率的に低減させることが分かりました。対象とする農薬のGC/MS/SIM分析についても、PSA/C18よりZ-Sep+の方がバックグラウンドを下げ、妨害が少ないという点で、より優れたクリーンアップ法であることがGC/MSクロマトグラム (フルスキャン) によって分かりました。

(次のページへ続く)

図1 牛腎臓抽出物における GC/MS クロマトグラム
(a) 未精製 (b) PSA/C18 (c) Z-Sep+.
All are on the same Y-scale

カラム: SLB™-5ms, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.36 µm (カタログ番号 28576-U)
オープン: 70 °C (0.5 min), 25 °C/min to 125 °C, 10 °C/min to 200 °C, 5 °C/min to 300 °C (1 min)
注入口温度: programmed, 60 °C (0.28 min), 600 °C/min to 325 °C (5 min)
検出器: MS (フルスキャン)
キャリアーガス: helium, 1 mL/min constant
注入量: 10 µL, PTV solvent vent, 100 mL/min vent flow at 0.28 min, 5 psi vent pressure
ライナー: 4 mm I.D. FocusLiner with taper

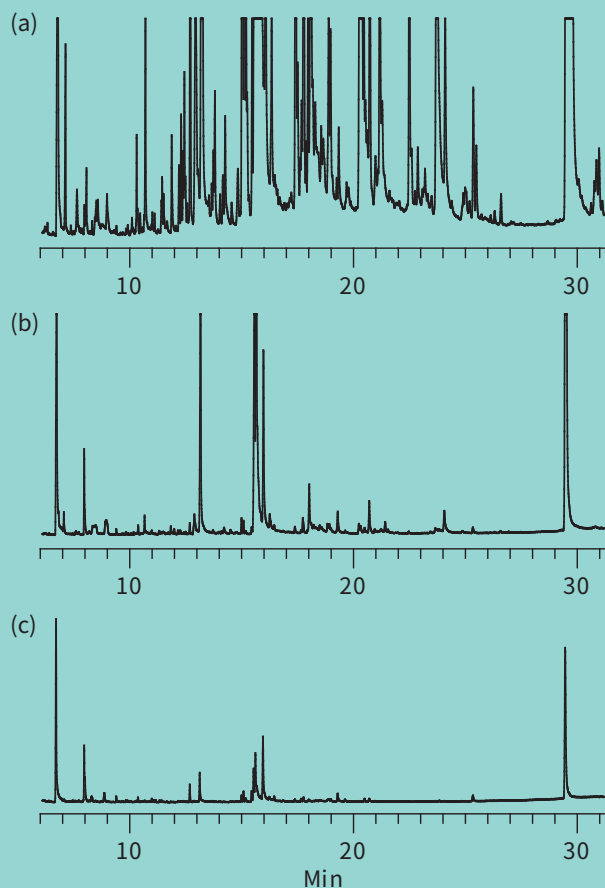


図2 TICs of GC/MS/SIM Analysis of Pesticides at 50 ng/g in Beef Kidney Extract, Cleaned Using (a) Z-Sep+ and (b) PSA/C18.

Conditions same as Figure 1.

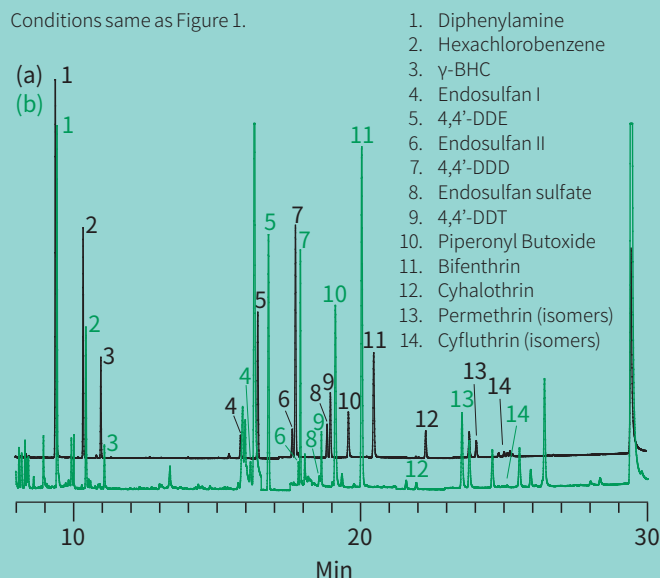


表2. Average Pesticide Recoveries from Beef Kidney Spiked at 50 ng/g, Average of n=3 with (%RSD)

	Z-Sep+	PSA/C18
Diphenylamine	70 (1)	81 (1)
Hexachlorobenzene	74 (1)	73 (2)
γ-BHC (lindane)	81 (1)	77 (1)
Endosulfan I	106 (5)	79 (4)
4,4'-DDE	71 (2)	77 (2)
Endosulfan II	108 (6)	73 (5)
4,4'-DDD	91 (3)	78 (1)
Endosulfan Sulfate	98 (4)	67 (4)
4,4'-DDT	83 (4)	74 (2)
Piperonyl Butoxide	91 (5)	86 (2)
Bifenthrin	101 (7)	82 (2)
Cyhalothrin	101 (6)	87 (13)
Permethrin	99 (7)	86 (2)
Cyfluthrin	110 (8)	93 (2)

参考文献

1. M. LeDoux, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 1021-1036 (2011).
2. S. Lehotay, K. Mastovska, *J. of AOAC International*, **88**, 630-638 (2005).
3. AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
4. S. Lehotay, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for the Determination of Pesticide Residues. Proceedings AOAC Annual Meeting, St. Louis, MO USA, 2004.
5. U. Koesukwiwat, S. Lehotay, K. Mastovska, K. Dorweiler, and N. Leepipatpiboon, *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5950-5958 (2010).
6. *Pesticide Data Program Annual Summary, Calendar Year 2009*, United States Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service, Science and Technology Programs, May 2011.
7. *The Pesticide Manual 13th Edition*, C.D.S Tomlin, Ed. (The British Crop Protection Council, Surrey, UK, 2003).

Featured and Related Products

製品名	カタログ番号
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, 50 ea	55248-U
Acetate Extraction Tube, 12 mL, 50 ea	55234-U
Z-Sep+ Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55486-U
PSA/C18 Cleanup Tube, 15 mL, 50 ea	55439-U
SLB™-5ms Capillary GC Column	
20 m x 0.18 mm I.D., 0.36 µm	28576-U
Analytical Solvent	
Acetonitrile for GC-MS SupraSolv™	1.00665

卵、鶏肉、マヨネーズにおける フィプロニルとその分解代謝物の GC/MS測定

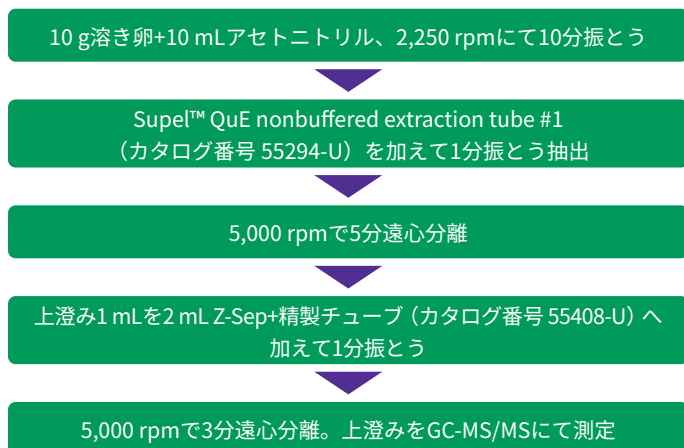
Z-Sep+ を用いたコレステロールなどの脂質成分除去

Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist

フィプロニルは昆虫に対して広い殺虫スペクトルを持つネオニコチノイド系農薬の一つです。これらは (EU)¹において家畜への使用は禁止されています。フィプロニルの分解代謝物であるフィプロニルスルホンは鳥およびその他の生物に対して、親化合物であるフィプロニルよりも高い毒性が懸念されています²。EUでは卵中のフィプロニルとこれらスルホン体の合計5 ng/g (0.005 ppm) を最大残留基準値としています。

本アプリケーションでは、QuEChERS法を用いた抽出と精製 (図1) を前処理とし、GC/MS/MSを用いて測定しました (表1)。

図1. Z-Sep+を用いたQuEChERS法による抽出と精製



抽出と精製に使用したSupel™ QuE Z-Sep+はコレステロールなど、脂溶性化合物を除去することができます。図2はZ-Sep+で前処理した際の夾雑成分を示しています。フィプロニルとそのスルホン体と同じ保持時間で検出される脂肪酸は、Z-Sep+によって除去され、5 ng/mLの濃度においても両化合物の明確なピークが得られました (図3)。表2に回収率と再現性を示します。この方法は鶏肉とマヨネーズにおいても適用可能です。本GC測定の堅牢性は卵サンプルにおいて70回以上の注入後も良好な測定結果を維持しました。

表1. GC-MS/MS条件

カラム:	SLB™-PAHms, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μm
オープン:	50 °C (2 min), 15 °C/min to 340 °C (10 min)
注入口温度:	250 °C
キャリアーガス:	helium, 1.2 mL/min, constant
検出器:	MRM, Fipronil: 254.9/228, 350.8/254.8, 366.8/212.8 Fipronil sulfone: 382.8/254.9, 384.8/256.8, 254.9/227.9
注入量:	1 μL, pulsed splitless (50 psi until 0.75 min, splitter on at 0.75 min)
ライナー:	4 mm I.D. FocusLiner with taper



図2. 卵抽出物のGC/MS Full Scan クロマトグラム

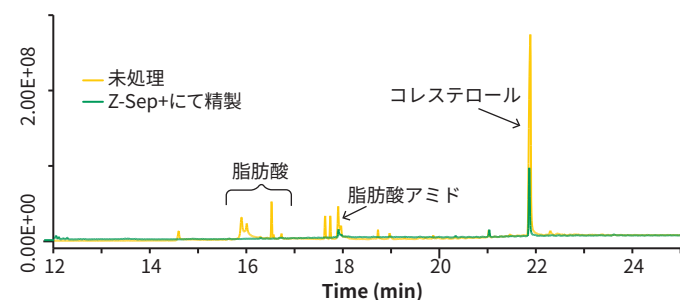


図3. 卵中の5 ng/g濃度フィプロニルとフィプロニルスルホンにおけるGC/MS/MS測定

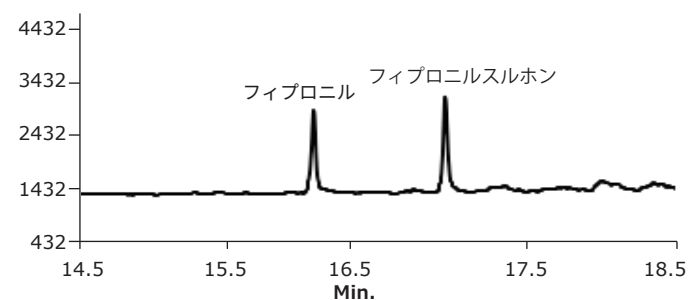


表2. 回収率と再現性 (%Rsd); Spiking Level of 5 ng/g

n=3	卵	鶏肉	マヨネーズ
フィプロニル	91 (0.5)	103 (3)	85 (3)
フィプロニルスルホン	91 (1.8)	116 (2)	87 (4)

本アプリケーションの詳細はこちら

<https://bit.ly/3DT6AlI>

参考文献

1. Fipronil Egg Scandal: What We Know. bbc.com, 8/11/2017 (accessed 8/15/17).
2. Madsen, J.E.; Sandstrom, M.W.; Zaugg, Steven D., Methods of Analysis of the U.S. Geological Survey Nation Water Quality Laboratory-A Method Supplement for the Determination of Fipronil and Degradates in Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry; Open-file report 02-462; U.S.G.S.: Denver, CO, 2003.

Featured and Related Products

製品名	カタログ番号
Supel™ QuE nonbuffered extraction tube #1	55294-U
Supel™ QuE Z-Sep + Tube, 2 mL	55408-U
Fipronil, certified reference material	16785-50 mg
Fipronil Sulfone, Pestanal analytical standard	32333-50 mg

QuEChERSと積層SPEカラムを前処理に用いた、ショウガ粉末中の残留農薬分析

QuEChERS法 dSPEチューブとシリンジ型チューブを前処理に用いた分析

Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist

はじめに

ショウガは植物の地下茎から得られ、数千年にわたって料理のスパイスとして用いられてきましたが、それ以外にも吐き気、胃腸痛、炎症、風邪やインフルエンザ症状といった病気の治療薬として使われてきました。また、最近の研究によれば、痛みの緩和と循環器系の健康支援に有効な効果があるとされています¹。ショウガは東南アジア原産ですが、西洋諸国でも栽培されています。2013年のショウガの世界生産量は約210万トンで、その約半分が中国およびインド産です²。収穫したショウガの根茎はまず洗浄し、次いで煮沸して酵素活性を失活させます。その後、乾燥し、粉碎してショウガ粉にしたり、溶媒抽出と蒸留によってショウガオイルと含油樹脂を生産する処理が施されます³。植物に使用された多くの農薬は、こういったプロセスを経ても最終製品に残留します。乾燥ショウガは調理にも栄養補助食品にも使用されるため、頻繁に摂取することによって農薬にばく露するリスクがあります。そのため、ショウガ中における残留農薬分析が多くの国で求められており、例えばカナダでのショウガ根への残留農薬基準値は0.01~0.15 ppmです⁴。

ショウガのにおいと辛みは、テルペン類、ギンゲロール類、およびショウガオール類が存在するためです⁵。これらの化合物によってショウガのマトリックスは極めて複雑で、汚染物の低濃度分析は非常に困難です。ショウガ中の残留農薬分析は、抽出にQuEChERS法を用いることができます。LCおよびGCクロマトグラフィー分析のいずれにも適した試料を調製するには、抽出後にクリーンアップを行うことが必須です。QuEChERS法に含まれる一般的なアプローチは、吸着剤による分散固相抽出(dSPE)を用いるものです。しかし、ショウガ粉のような乾燥品ではバックグラウンドが大きすぎるため、dSPEを用いたクリーンアップを効率的に行えないことがよくあります。従来の固

相抽出(SPE)カートリッジはdSPEよりクリーンアップ容量が大きいので、この種の試料に適しています。本アプリケーションでは、新規の二層SPEカートリッジであるSupelclean™ Ultra 2400を用いてショウガ粉のQuEChERS抽出物をクリーンアップした後、LC-MS/MSとGC-MS/MSの2つの方法で残留農薬を分析しました。このカートリッジの上層にはPSA(第1級-第2級アミン)、C18、およびグラファイトカーボン(Graphosphere™ 2031)の混合物、下層にはZ-Sep吸着剤が入っています。カートリッジには、クリーンアップに從來から使用されている吸着剤(PSAおよびC18)と、2つの新しい固定相担体が含まれています: Graphosphere™ 2031およびZ-Sep。Graphosphere™ 2031は、標準的なグラファイトカーボンブラック(GCB)より表面積が小さい、特別に設計されたカーボンです。表面積が小さいため、クロロフィルのような平面構造を持つ色素の除去と、平面構造の農薬に対する弱い吸着バランスが取れ、回収率の向上が期待できます。下層のZ-Sepは、カロテノイド類といくらかの脂質構成成分を保持できるジルコニアコート化シリカゲルです。この二層の吸着剤を組み合わせると、dSPEより厳密なクリーンアップができます。また、Ultra 2400は、グラファイトカーボンブラック(GCB)とPSAまたはアミノプロピルシリカを含む現在の二層SPEカートリッジより小型ですが、それでも少ない溶媒量で試料を十分にクリーンアップします。Ultra 2400はGraphosphere™ 2031カーボンを用いるため、溶出溶媒にトルエンを使うことなく平面構造の農薬の回収率が上がるという、従来のGCB含有カートリッジに対する優位性があります。

本研究では、ショウガ粉にさまざまな農薬を10 ng/gで添加し、標準的なQuEChERS法で抽出しました。その後、抽出物をSupelclean™ Ultra 2400 SPEの3 mLカートリッジでクリーンアップし、LC-MS/MSおよびGC-MS/MS分析を行いました。

実験方法

乾燥ショウガ粉を地元の食料品店で購入し、表1と表2に示す農薬を10 ng/gで添加しました。試料を図1に示すように抽出し、図2に示すようにLC用とGC用に分けてクリーンアップしました。ショウガ抽出物における農薬添加サンプル(n=3)とブランク試料を下記手順でクリーンアップしました。表3と表4に示すHPLCおよびGC条件を使用したマトリックス検量線に対して、外部標準分析法を用いて試料を分析しました。定量に用いたMRMを表1と表2に示します。

図1. ショウガ粉に用いたQuEChERS抽出手順

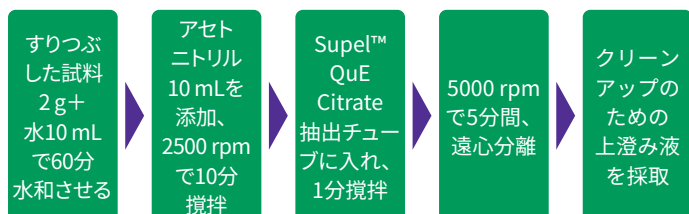


図2. Supelclean™ Ultra 2400 3 mLカートリッジを用いたショウガ粉 QuEChERS抽出物のクリーンアップ

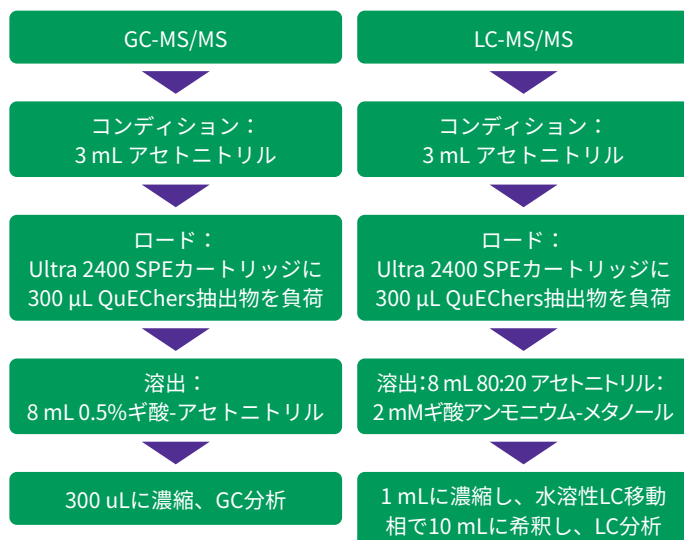


表1. LC-MS/MSで分析した乾燥ショウガ粉中の農薬

化合物	MRM	フラグ (V)	CE (V)	Cell Acc (V)
アセフェート	184/143	70	0	5
アセタミプリド	223.1/126	80	27	2
ボスカリド	343/307.1	145	16	6
カルベンダジム	192.1/160.1	105	16	2
クロルブファム	224/172.02	120	5	3
シクルロン	199.2/72	120	20	2
ジフルベンズロン	311/158	80	8	2
フェノキサニル	329.08/189	80	30	3
ホスチアゼート	284/61	90	60	2
メタベンズチアズロン	222.1/165.1	90	12	2
メタミドホス	142/125	85	10	2
メソミル	163.1/106	50	4	2
モノクロトホス	224.1/193	65	0	5
ニトラリン	346.11/304	100	10	3
オキサミル	237.1/72	60	12	2
ピリミカーブ	239.15/72.1	100	20	2
プロシミドン	301/284*	70	8	2
プロパキサホップ	444.12/100.1	125	16	2
テトラコナゾール	372/159	130	36	2
ウニコナゾール-P	292.1/125	135	40	2

表2. GC-MS/MSで分析した乾燥ショウガ粉中の農薬

化合物	MRM	CE
アラクロール	188/160	10
アルドリン	263/193	35
アジンホスメチル	160/132	0
γ-BHC	217/181	5
クロルピリホス	197/169	15
クロルピリホスメチル	125/47	15
シベルメトリン	163/127	5
4,4'-DDT	237/165	20
ダイアジノン	137/84	10
ジクロルボス	185/93	10
ジメトエート	87/46	15
ジスルホトン	88/59	15
エンドスルファンβ	207/172	15
エンドスルファンα	195/160	5
エチオン	153/97	10
フェニトロチオン	277/260	10
ヘプタクロル	274/239	15
ヘキサクロロベンゼン	284/249	20
イプロジオンI	187/124	25
イプロジオンII	244/187	5
マラチオン	173/99	15
メタラキシル	220/192	5
メトキシクロル	227/169	30
メピンホス	127/95	15
パラチオンメチル	125/47	10
ペルメトリン	183/168	10
フェントエート	274/125	15
ホレート	121/47	30
ホサロン	182/111	15
ピリミホスメチル	290/125	20
プロフェノホス	208/63	30
キントゼン	295/237	20
ピンクロゾリン	187/124	20

表3. LC-MS/MS分析条件

カラム:	Ascentis™ Express C18, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2 μm
移動相:	[A]5 mMギ酸アンモニウム、0.1%ギ酸水溶液 [B]5 mMギ酸アンモニウム、メタノールの0.1%ギ酸
グラジエント:	95% A、5% Bを1分間保持、3分間で50% Bまで、8分間で100% Bまで、100% Bで1分間保持、0.5分間で95% A、5% Bまで、1.5分間保持。
流量:	0.4 mL/分
カラム温度:	30 °C
検出器:	MS、ESI (+)、MRM (表1を参照)
注入:	5 μL

表4. GC-MS/MS分析条件

カラム:	SLB™-5ms、20 m × 0.18 mm I.D.、0.18 μm
オープン:	45°C (3分)、8 °C/分で325°Cまで (2分)
注入温度:	250 °C
キャリアガス:	ヘリウム、1.2 mL/分、一定流量
検出器:	MS、MRM (表2を参照)
MSDインターフェース:	325 °C
注入:	1 μLパルススプリットレス (0.5分まで40、0.5分でスプリッターオン)
ライナー:	4 mm I.D. FocusLinerテーパーあり

表5. QuEChERS抽出後にSupelclean™ Ultra 2400 SPEでクリーンアップしたショウガ粉中農薬の平均回収率と%RSD値

化合物	平均%回収率 (n=3)	RSD	分析
アセフェート	86%	3%	LC
アセタミプリド	90%	2%	LC
アラクロール	110%	4%	GC
アルドリン	73%	2%	GC
アジンホスメチル	79%	7%	GC
BHC- γ	84%	1%	GC
ボスカリド	66%	7%	LC
カルベンダジム	65%	2%	LC
クロルピリホス	100%	2%	GC
クロルピリホスメチル	87%	3%	GC
シクルロン	85%	2%	LC
シベルメトリン (異性体混合)	82%	8%	GC
DDT-p,p'	84%	6%	GC
ダイアジノン	86%	4%	GC
ジクロルボス	31%	72%	GC
ジフルベンズロン	66%	2%	LC
ジメトエート	99%	2%	GC
ジスルホトン	85%	5%	GC
エンドスルファンI	92%	7%	GC
エンドスルファンII	97%	23%	GC
エチオン	84%	14%	GC
フェニトロチオン	102%	5%	GC
フェノキサニル	99%	60%	LC
ホスチアゼート	85%	5%	LC
ヘプタクロル	73%	7%	GC
ヘキサクロロベンゼン	45%	21%	GC
イプロジオン	87%	4%	GC
マラチオン	109%	4%	GC
メタラキシル	79%	14%	GC
メタベンズチアズロン	58%	3%	LC
メタミドホス	72%	0%	LC
メソミル	89%	5%	LC
メトキシクロル	90%	2%	GC
メピンホス	57%	26%	GC
モノクロトホス	89%	4%	LC
ニトラリン	67%	27%	LC
オキサミル	89%	4%	LC
パラチオンメチル	97%	2%	GC
ペルメトリン、II	定量不可	-	GC
フェントエート	110%	5%	GC
ホレート	70%	12%	GC
ホサロン	97%	5%	GC
ピリミカーブ	90%	2%	LC
ピリミホスメチル	96%	3%	GC
プロシミドン	59%	1%	LC
プロフェノホス	93%	3%	GC
プロパキサホップ	70%	11%	LC
キントゼン	68%	8%	GC
テトラコナゾール	46%	8%	LC
ウニコナゾール-P	179%	83%	LC
ピンクロゾリン	97%	4%	GC
平均	82%	9%	-

これまで、平面構造の農薬であるヘキサクロロベンゼン (HCB) を GCB でクリーンアップした後の回収率に問題がありました。この化合物は、クリーンアップ中に従来の GCB によって強く保持されます。SPE クリーンアップを用いた場合、溶出溶媒中にトルエンがあればカーボンからこの化合物が脱離されるため、この化合物の回収率を向上させることができます。しかし、その場合は最終抽出物にトルエンが含まれるため、HPLC 分析には向いていません。Ultra 2400 SPE 3 mL カートリッジでクリーンアップした後の HCB 回収率は 45% でした。この値は、二層 SPE 6 mL カートリッジとトルエン含有の溶出溶媒を組み合わせることで植物のアセトニトリル抽出物をクリーンアップした他の報告での回収率と同じ範囲にあります^{9,10}。HCB の回収率を向上させることが可能かどうかを判断するために、Ultra 2400 SPE 1 mL カートリッジでもショウガ抽出物をクリーンアップしました。溶媒量を減らしたほか、使用した溶出プロトコールは 3 mL カートリッジのときと同様です。回収率は 63% に向上し、回収率が 70% 未満であるその他の農薬の場合と同様に、小さな 1 mL サイズの方がショウガ粉抽出物のクリーンアップでのマトリックスと吸着剤活性サイト間のバランスが良くなる可能性が示されました。

結論

ショウガ粉の QuEChERS 抽出では、クロマトグラフィー分析の前にクリーンアップを必要とする大きなバックグラウンドが見られます。抽出物の色調と GC-MS スキャンデータから分かるように、Ultra 2400 SPE を使用するとこのバックグラウンドが減少しました。SPE クリーンアップは容量が大きいいため、PSA/C18/GCB を用いた dSPE よりバックグラウンドが大きく減少しました。10 ng/g で添加した 51 種の対象農薬の回収率は、75% の被分析物質に対して 70~120% の回収率の範囲にありました。この範囲にないいくつかの農薬の回収率は、小さな Ultra 2400 SPE 1 mL カートリッジを使用したり、使用する溶出溶媒の変更など、クリーンアップ法の調整によって改善可能と思われます。Ultra 2400 SPE 3 mL カートリッジを使った方法では、それより大きな GCB の二層 SPE 6 mL カートリッジをクリーンアップに使用する場合と比較して、必要な溶媒量が著しく少なくなります (11 mL 対 20~30 mL)。平面構造の農薬であるヘキサクロロベンゼンは溶出溶媒にトルエンがなくても回収でき、3 mL カートリッジでのショウガからの回収率は 45% でした。この値は、より小さな 1 mL カートリッジを使用すれば上げることができると考えられます。

要約すると、Supelclean™ Ultra 2400 SPE は、従来品である GCB 含有の二層 SPE 6 mL よりも効率の良い手法です。このカートリッジには 1 mL と 3 mL のサイズがあり、マトリックスや分析対象物質により選択することができます。

Featured and Related Products

製品名	カタログ番号
Supelclean™ Ultra 2400 volume 1 mL, pkg of 108	52779-U
Supelclean™ Ultra 2400 volume 3 mL, pkg of 54	54281-U
QuECitrate Extraction Tube, pk of 50	55227-U
QuEEmpty Centrifuge Tube with Lid, centrifuge tube volume 50 mL, pk of 50	55248-U
Ascentis™ Express C18, 2 µm × I.D. 10 cm × 2.1 mm	50813-U
SLB™ -5ms キャピラリー GC カラム L × I.D. 20 m × 0.18 mm, df 0.18 µm	28564-U
ギ酸アンモニウム eluent additive for LC-MS	70221
ギ酸 for LC-MS	5.33002
キャピラリーカラムナット (Agilent [MS 検出器] および PerkinElmer 対応)、六角レンチ締め, pk of 5 ea	28034-U
低吸着バイアルキット: Volume 0.3 mL, 褐色ガラス, PTFE/ シリコンセプタム, thread for 9 mm	29663-U
低吸着バイアルキット: Volume 0.3 mL, 褐色ガラス, PTFE/ シリコンセプタム (スリット付き), thread for 9 mm	29664-U
金メッキインレットシール pk of 2 ea	23318-U
インレットライナー O- リング, pk of 10 ea	21003-U
モールドタイプ Thermogreen™ LB-2セプタム、固形ディスク diam. 11 mm, pkg of 50 ea	28676-U
Visiprep™ SPE バキュームマニホールド DL (Disposable Liner), 12-port model	57044
ディスポーザブルライナー, pk of 100	57059

参考文献

1. *Medical News Today*. [Internet]. [cited 07 Jul 2019]. Available from: <https://www.medicalnewstoday.com>
2. [cited 07 Jul 2019]. Available from: <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>
3. Bzhelyansky A. *Presented at the 2016 AOAC Annual Meeting*. [Internet]. SPDS Stakeholder Panel, Dallas, TX; [updated 15 Sep 2016].
4. *Health Canada MRL database*. [Internet]. [cited 07 Jul 2019]. Available from: www.hc-sc.gc.ca
5. Ali B, Blunden G, Tanira M, Nemmar A. 2008. Some phytochemical, pharmacological, and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food and Chem. Tox.* 46:409-420.
6. Hildmann F, Gottert C, Frenzel T, Kempe G, Speer K. 2015. Pesticide residues in chicken eggs – a sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. *J. Chrom.A.* 14031-20.
7. Aurand C, Mi C, Lu X, Trinh A, Ye M. *Troubleshooting analyte recovery when using hybrid SPE-precipitation technology*. 27.217-19.
8. Morris B, Schriener RB. 2015. Development of an automated column solid-phase extraction cleanup of QuEChERS extracts, using a zirconia-based sorbent, for pesticide residue analyses by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 63:5107-5119.
9. Chen Y, Lopez S, Hayward D, Park H, Wong JW, Kim S, Wan J, Reddy R, Quinn D, Steiniger D. 2016. Determination of multiresidue pesticides in botanical dietary supplements using gas-chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS). *J. Agric. Food Chem.* 64:6125-6132.
10. Hayward D, Wong J, Park H. 2015. Determinations for pesticides on black, green, oolong, and white teas by gas chromatography triple-quadrupole mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 63:8116-8124.

色素の多い野菜・ホウレンソウに残留する 平面構造を持つ農薬（プラナー農薬）の分析前処理

Supel™ QuE Verdeを用いた前処理

「AOAC Official Method 2007.01」では残留農薬分析のために、QuEChERS法をサンプル前処理の精製のステップで使用します。QuEChERS法の分散固相抽出に含まれるグラファイトカーボンブラック（以下GCB）はホウレンソウのような緑葉野菜に含まれる、高濃度のクロロフィル（緑の色素でもある葉緑素）を除去するために用いられます。GCBはクロロフィルを完全に除去しますが、一方で平面構造を持つ農薬とも結合し、それらの回収率がとても悪くなってしまいます。

Supel™ QuE Verde のQuEChERS用GCBは、ヘキサクロロベンゼン（HCB）やクロロタロニルなどのプラナー農薬の分析において、一般的に使用されているGCBよりも優れています。通常使用されているGCBではプラナー農薬も保持してしまうため回収率が悪くなってしまいますが、Supel™ QuE Verde のGCBは、プラナー農薬は保持せずに、大部分のクロロフィルを除去できるように設計されています。Supel™ QuE Verdeは新しく採用したGCBとPSA（第1級-第2級アミン）、Z-Sep+を混合し、プラナー農薬の回収率を改善すると同時に、クロロフィルを取り除くために最適化しています。

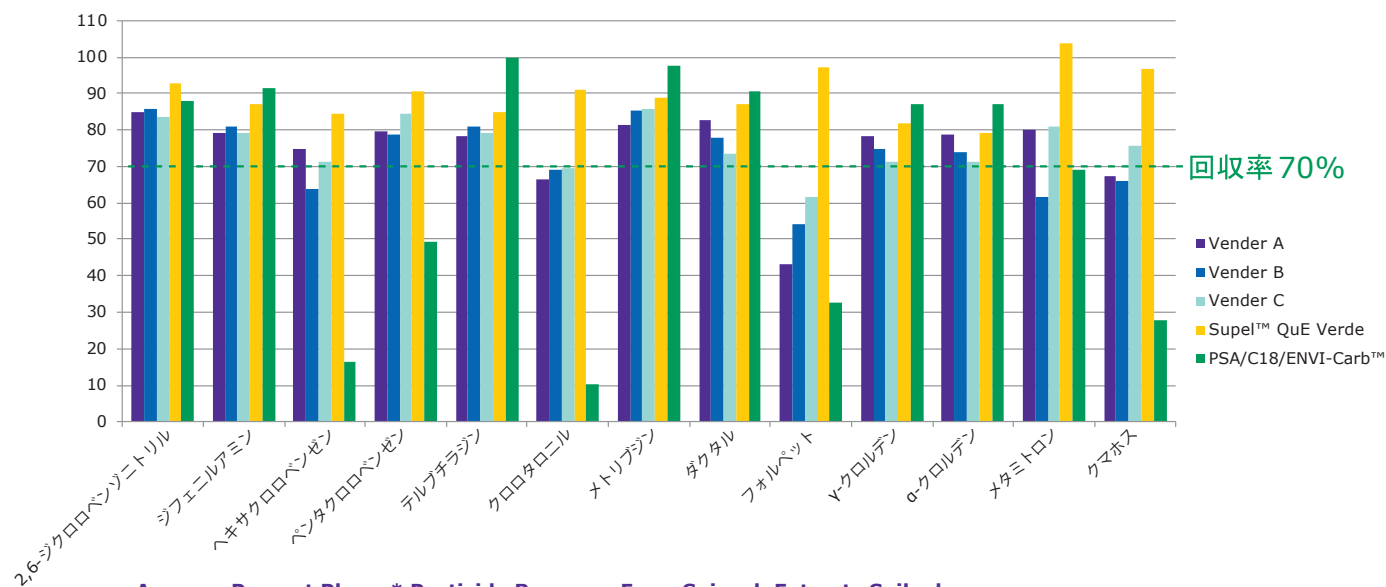
一般的に使用されているGCBを使用した精製方法でのプラナー



農薬の回収率は約70%以下と低くなってしまいますが、Supel™ QuE Verde の回収率は約70～120%でした。

Supel™ QuE VerdeはAOACやENのQuEChERS法の代替えとしての活用が期待されています。

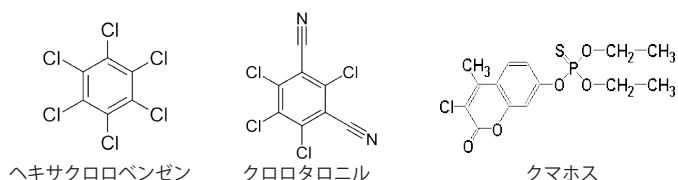
図1 ホウレンソウ中の平面構造をもつ農薬の回収率



Average Percent Planar* Pesticide Recovery From Spinach Extracts Spiked at 50ng/mL by Various 2mL QuEChERS Cleanup Tubes (n=3)

*The pesticide mixture used in this application was composed predominantly (but not completely) of planar pesticides.

図2 プラナー農薬の構造式



Featured Products

製品名	充填剤	サイズ	数量	カタログ番号
Supel™ QuE Verde	Z-Sep+ : 60 mg MgSO ₄ : 150 mg ENVI-Carb™ Y : 10 mg PSA : 50 mg	2 mL	100	55447-U
	Z-Sep+ : 480 mg MgSO ₄ : 1200 mg ENVI-Carb™ Y : 80 mg PSA : 400 mg	15 mL	50	55442-U

脂質・色素の多いウコン粉末における プラナー農薬の前処理

複雑な妨害成分に対応する、Supelclean™ Ultra 2400 固相抽出カラム

Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist

背景

ウコンは南アジア原産の植物で、その大部分はインドで生産されています。ウコンの根茎は、食品、化粧品、およびいくつかの医薬品に使用される粉末ウコンを生産するために栽培されています。ウコンは数千年前から伝統的な医薬品に使われており、抗酸化作用、抗炎症作用、抗変異原性作用、抗菌作用、抗癌性作用の可能性を示す研究が注目されています¹。

ウコンや他のスパイスの残留農薬検査は多くの国で実施されており、例えばカナダではウコンの根に残留する 42 種類の農薬に対して基準値を設けています^{2,3}。ウコンには 100 種類以上の成分が含まれており、その主成分はクルクミンや揮発性油です。クルクミンはウコン特有の黄色／オレンジ色を示す物質で、揮発性油は主にテルペン系の化学構造物質です。これらに加えウコンには脂質も多く含まれています⁴。従って、ウコン中の残留農薬分析をするにあたり、その際に共存する色素や油が GC/MS、LC/MS システムの両方を汚染する恐れがあります。ウコンなどの非常に大きい夾雑成分由来のバックグラウンドを有するサンプルを前処理する場合、標準的な QuEChERS 法によるクリーンアップのみでは十分な前処理効果が得られないことがあります。これらを更に精製するため、追加で積層式の固相抽出 (SPE) を使用することが多いです。この際の積層式カラムは、上層にグラファイトカーボンブラック (GCB)、下層には第 1 級-第 2 級アミン (PSA) を含みます。PSA は脂肪酸などを除去し、GCB は色素やステロールなどの平面構造を持つ成分を除去します。しかしながら、一般的な GCB はヘキサクロロベンゼンのような平面構造を有する農薬 (プラナー農薬) も強く保持してしまいます。これらの農薬回収率を上げるためにはトルエンを用いて溶出させる事が多いですが、トルエンの使用すると PSA に保持させていた夾雑成分も溶出してしまう事が想定され、最終分析サンプルが汚染されます⁵。本研究では、上記とは異なる 2 層式 SPE カラムをウコンの精製にもちいました。今回使用した前処理カラム、Supelclean™ Ultra2400 は、乾燥した製品 (スパイス、紅茶) など、従来では夾雑除去が難しいとされていた成分を精製、除去できるように設計されています。上層は、PSA、C18 と Graphsphere™ 2031 として知られている GCB の混合物で構成されています。このカーボンは、溶出溶媒にトルエンを必要とせず、プラナー農薬の回収率を高めます。カートリッジの下層には、ジルコニアコート化シリカゲルである、Z-Sep が含まれています。Z-Sep は脂溶性夾雑成分や、いくつかの色素を除去します。これによって従来の GCB/PSA 積層式カラムと比較して、プラナー農薬を溶出するためのトルエンを使用する必要がなくなります。



実験方法

ウコン粉末は地元の食料品店で購入しました。表 1 および表 2 にある殺虫剤を用いてサンプル中の終濃度が 100 ng/g になるよう調製しました。サンプル調製は図 1 の手順でおこないました。標準品スパイクサンプル 3 つと、1 つの未スパイク (ブランク) を調製し、農薬の分析は、表 3 および表 4 に列挙された条件にて GC/MS/MS および LC/MS/MS を用いて測定しました。農薬回収率は、スパイクされた 3 つの測定結果の平均をとり、ブランクにて検出されたものは誤差範囲におさまりました。

結果、考察

QuEChERS 抽出物は黄色の油状残渣を有する橙褐色でした (図 2)。LC および GC 両方の精製後サンプルは写真の通りです。図 3 および図 4 は、クリーンアップ前後を比較したものです。LC 抽出物は、ウコン由来の色がほとんどありませんでした。GC 分析のための抽出物は淡黄色を示してはいたが、実質的には油状の残留物がほとんど存在していませんでした。GC 抽出物のフルスキャン GC/MS 測定結果を、図 5 に示します。ピークパターンは両方で似ており、主要なピークは主にテルペン化合物で構成されています。これらの化合物は GC の注入口で容易に揮発し、システム汚染の問題はありません。前処理の結果、図 5 のピーク面積の合計は 21% 減少していました。

表1. ウコン中における農薬試験項目とGC/MS/MS測定条件

	MRM 1	CE	MRM 2	CE
Alachlor	188/160	10	188/130	40
Aldrin	263/193	35	263/191	35
γ-BHC	183/147	15	181/145	5
Azinphos-methyl	160/77	15	132/77	15
Chloropyrifos	314/286	5	314/258	15
Chloropyrifos-methyl	286/93	20	288/93	20
Cypermthrins	165/91	10	163/91	10
4,4'-DDT	235/199	15	235/165	25
Diazinon	199/135	15	137/84	10
Dichlorvos	185/93	25	145/109	25
Dimethoate	125/79	20	93/63	10
Disulfoton	88/60	5	88/59	15
Endosulfan β	241/206	15	241/170	30
Endosulfan-α	241/206	15	241/170	30
Ethion	231/129	20	121/65	10
Fenitrothion	277/125	20	277/109	20
Heptachlor	274/239	15	272/237	15
Hexachlorobenzene	284/249	20	284/214	35
Iprodione I	314/56	35	187/124	25
Iprodione II	316/56	35	187/124	25
Malathion	173/99	15	158/125	5
Metalaxyl	234/174	10	234/146	20
Methoxychlor	227/169	30	227/141	30
Mevinphos	192/127	25	192/109	25
Parathion-methyl	233/109	10	124/47	10
Permethrins	183/168	10	183/165	10
Phenthoate	274/125	15	274/121	10
Phorate	260/75	5	231/129	25
Phosalone	182/102	15	182/75	30
Pirimiphos-methyl	290/151	20	290/125	25
Profenophos	339/269	15	339/188	15
Quintozene	295/237	20	237/143	30
Vinclozolin	212/145	30	187/124	20

表2. ウコン中における農薬試験項目とLC/MS/MS測定条件

	MRM	Frag (V)	CE (V)	Cell Acc (V)
Acephate	184/143	70	0	5
Acetamiprid	223.1/126	80	27	2
Boscalid (Nicobifen)	343/307.1	145	16	6
Carbendazim (Azole)	192.1/160.1	105	16	2
Chlorbufam	224/172.02	120	5	3
Cycluron	199.2/72	120	20	2
Diffubenzuron	311/158	80	8	2
Fenoxanil	329.08/189	80	30	3
Fosthiazate	284/61	90	60	2
Methabenzthiazuron	222.1/165.1	90	12	2
Methamidophos	142/125	85	10	2
Methomyl	163.1/106	50	4	2
Monocrotophos (Azodrin)	224.1/193	65	0	5
Nitralin	346.11/304	100	10	3
Oxamyl	237.1/72	60	12	2
Pirimicarb	239.15/72.1	100	20	2
Procymidon	301/284*	70	8	2
Propaquizafop	444.12/100.1	125	16	2
Tetraconazole	372/159	130	36	2
Uniconazole-P	292.1/125	135	40	2

表3. ウコン中の残留農薬分析におけるGC/MS/MS測定条件

GCカラム :	SLB™-5ms, 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm (カタログ番号 28471-U)
オープン :	50°C (2 min), 8°C/min to 320°C (5 min)
注入口温度 :	250°C
キャリアーガス :	helium, 1.4 mL/min, constant
検出器 :	MRM (表1参照)
MSD interface :	320°C
注入量 :	1 μL, splitless (splitter open at 0.75 min)
ライナー :	4 mm I.D., split/splitless type, single taper wool packed FocusLiner design (カタログ番号 2879901-U)

表4. ウコン中の残留農薬分析におけるLC/MS/MS測定条件

LCカラム :	Ascentis™ Express C18, 10 cm × 2.1 mm ID, 2 μm (カタログ番号 50813-U)
移動相溶媒 :	[A] 5 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in water; [B] 5 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in methanol
グラジエント :	95% A, 5% B held for 1 min; to 50% A in 3 min; to 100% B in 8 min; held for 1 min;; to 95% A in 1.5 min; held at 95% A for 1.5 min
流速 :	0.4 mL/min
検出器 :	MRM (表2参照)
注入量 :	5 μL

図1. GCおよびLC分析サンプルにおける、ウコン粉末の抽出と精製

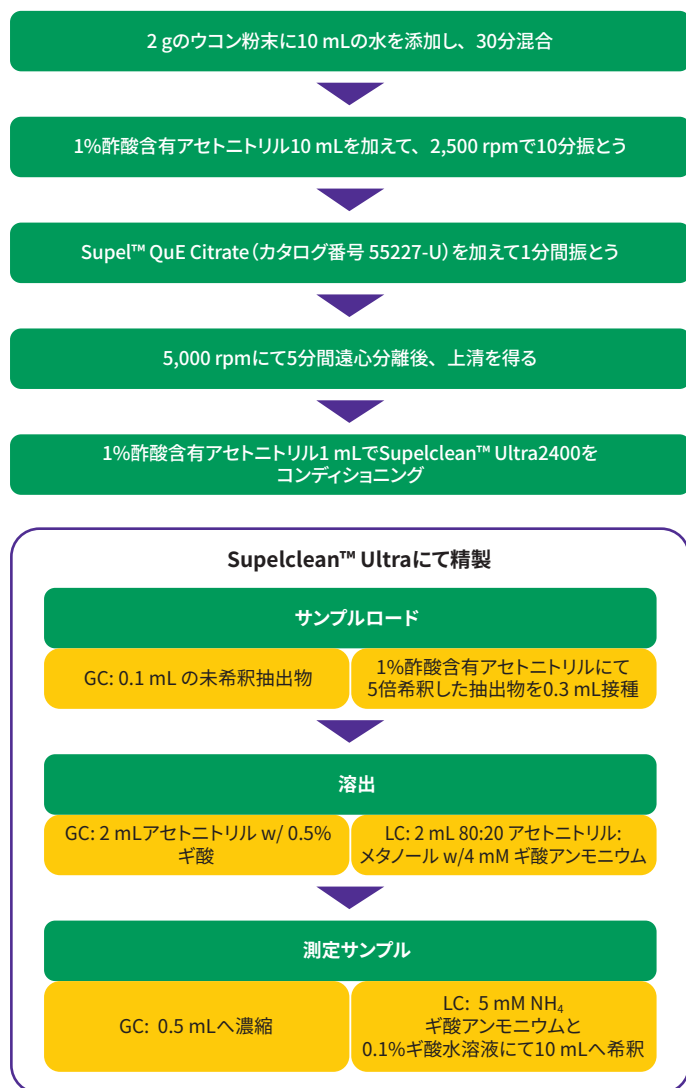


図2. QuEChERS抽出後の未希釈サンプル



図3. LC/MS/MS分析用ウコン抽出液 (167倍希釈) ;未処理、処理後の比較

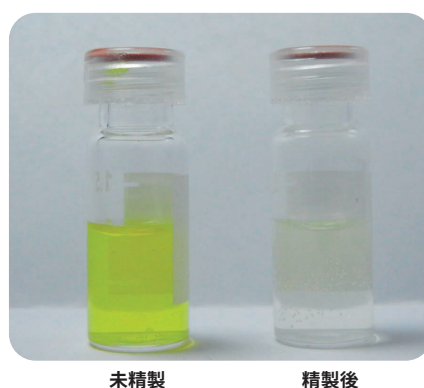
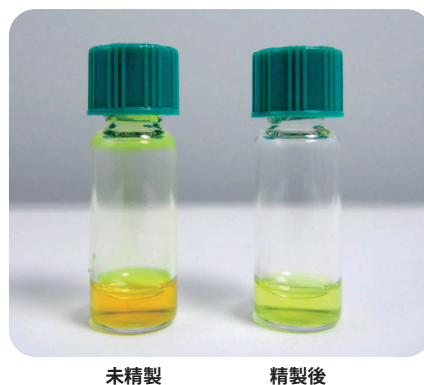


図4. GC/MS/MS分析用ウコン抽出液 (5倍希釈) ;未処理、処理後の比較



農薬の回収率と再現性

農薬をスパイクしたウコン試料 (n = 3) から得られた平均回収率を表5に示しました。51種の農薬のうち、ヘキサクロロベンゼン(回収率67%)を除く全ての回収率は70%以上でした。従来法においてはグラファイトカーボンブラックを含む積層カラムから良好な回収率を得るためにはトルエンを溶出溶媒に使用する必要がありますが、本研究では使っていません。スパイクされた農薬サンプルのRSD値として計算された再現性は、51種の農薬のうち44種については20%未満でした。図6に示すように、多くの化合物は10%未満のRSD値を示しており、20%を超えるRSD値を示す農薬は、そもそもMS/MS測定において感度が低いものである傾向が見受けられました

表5.ウコン粉末中の終濃度100 ng/gにて調整した農薬の回収率 (n=3)

Pesticide	Avg. Recovery	RSD	Analysis
Alachlor	99%	23%	GC/MS/MS
Aldrin	85%	10%	GC/MS/MS
Azinphos-methyl	89%	11%	GC/MS/MS
γ-BHC	83%	8%	GC/MS/MS
Chlorpyrifos	96%	12%	GC/MS/MS
Chlorpyrifos-Methyl	113%	6%	GC/MS/MS
Cypermethrin (isomer 1)	99%	15%	GC/MS/MS
4,4'-DDT	95%	8%	GC/MS/MS
Diazinon	92%	14%	GC/MS/MS
Dichlorvos	78%	31%	GC/MS/MS
Disulfoton	86%	7%	GC/MS/MS
Endosulfan β	86%	35%	GC/MS/MS
Endosulfan-α	92%	23%	GC/MS/MS
Ethion	97%	7%	GC/MS/MS
Fenitrothion	63%	5%	GC/MS/MS
Heptachlor	81%	7%	GC/MS/MS
Hexachlorobenzene	67%	9%	GC/MS/MS
Iprodione (isomer 1)	103%	5%	GC/MS/MS
Malathion	90%	10%	GC/MS/MS
Metaxyl	86%	21%	GC/MS/MS
Methoxychlor	78%	12%	GC/MS/MS
Mevinphos	73%	7%	GC/MS/MS
Parathion-Methyl	88%	8%	GC/MS/MS
Permethrin (isomer 1)	104%	24%	GC/MS/MS
Phenthoate	89%	7%	GC/MS/MS
Phorate	82%	10%	GC/MS/MS

Pesticide	Avg. Recovery	RSD	Analysis
Phosalone	90%	7%	GC/MS/MS
Pirimiphos-methyl	74%	3%	GC/MS/MS
Profenophos	88%	7%	GC/MS/MS
Quintozene	75%	8%	GC/MS/MS
Vinclozolin	90%	6%	GC/MS/MS
Acephate	89%	6%	LC/MS/MS
Acetamiprid	102%	4%	LC/MS/MS
Boscalid (Nicobifen)	86%	7%	LC/MS/MS
Carbendazim (Azole)	106%	7%	LC/MS/MS
Chlorbufam	92%	18%	LC/MS/MS
Cycluron	103%	5%	LC/MS/MS
Diffubenzuron	101%	5%	LC/MS/MS
Fenoxanil	91%	10%	LC/MS/MS
Fosthiazate	95%	4%	LC/MS/MS
Methabenzthiazuron	96%	4%	LC/MS/MS
Methamidophos	85%	5%	LC/MS/MS
Methomyl	106%	6%	LC/MS/MS
Monocrotophos (Azodrin)	97%	3%	LC/MS/MS
Nitralin	124%	55%	LC/MS/MS
Oxamyl	104%	3%	LC/MS/MS
Pirimicarb	97%	3%	LC/MS/MS
Procymidon	91%	13%	LC/MS/MS
Propaquizafop	97%	1%	LC/MS/MS
Tetraconazole	98%	2%	LC/MS/MS
Uniconazole-P	103%	19%	LC/MS/MS

図5. Supelclean™ Ultra 2400を用いて前処理したウコン抽出液におけるGC/MS測定結果

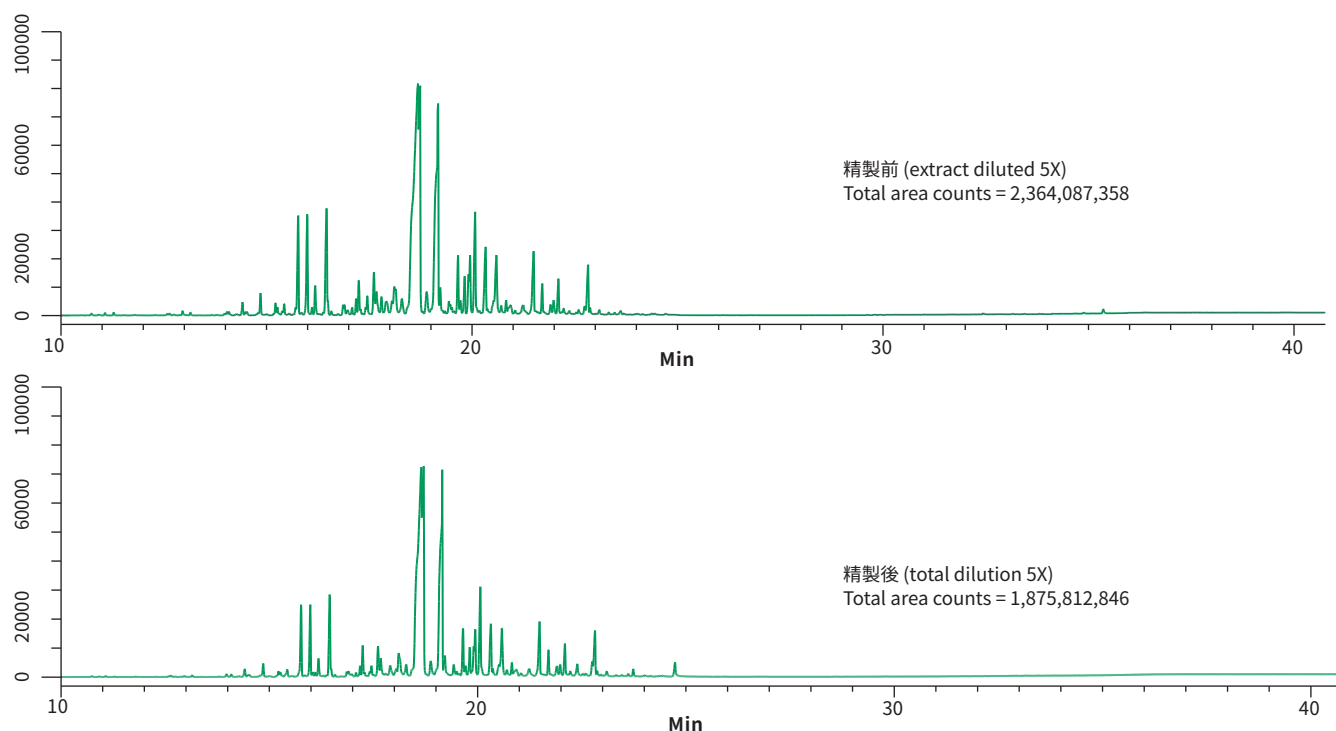
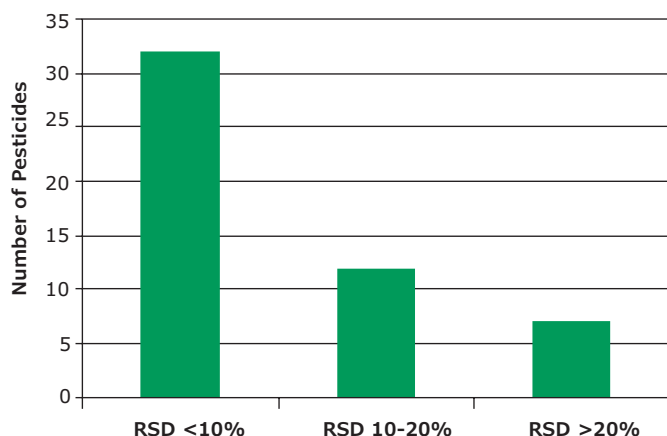


図6. ウコン粉末におけるSupelclean™ Ultra 2400を用いた際の平均農薬回収率
(Recoveries from turmeric powder spiked at 100 ng/g.)



おわりに

本研究ではSupelclean™ Ultra 2400カラムを用いた新しい精製法を示しました。このカラム内の吸着剤によって、ウコン以外のスパイスなど乾燥した食品のようなサンプルの精製を可能にします。上層に使用されているGraphsphere™ 2031カーボンは、溶出溶媒にトルエンを使用せず平面構造を有する農薬の回収率を維持しながら、同時に色素を除去します。また、GCとHPLC分析の両方のウコン精製結果に示されているように、カラムの下層にあるZ-Sep吸着剤は油およびいくつかの色素を除去する事ができました。結果としてウコン粉末中における残留農薬分析において、夾雑成分を除くと同時に幅広い化学的特性を持つ農薬に対する高い回収率を実現しました。本研究では、1 mLのSupelclean™ Ultra 2400カートリッジを使用しましたが、これより大きい3 mLサイズへも応用可能であり、より高いサンプル負荷に対応することもできます。

ご存知ですか？

シグマアルドリッチジャパンは天然物の標準物質をご用意しています。
ウコン属 (Curcuma) の標準物質は
<https://bit.ly/3jDp3vP> をご覧ください。

引用文献

1. Prasa, S.; Aggarwal, B. Turmeric, the Golden Spice. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, 2nd ed.; CRC Press/Taylor&Francis: Boca Raton (FL), 2011; Chapter 13.
2. Health Canada MRL database. www.hc-sc.gc.ca (accessed 1/27/2016).
3. Electronic Code of Federal Regulations (eCFR), Title 40, Chapter 1, Subchapter E, Part 180, updated 1/26/2016.
4. Li, S.; Yuan, W.; Deng, G.; Wang, P.; Yang, P. "Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.)" (2011). *Faculty Publications*. Paper 1.
http://scholarworks.sfasu.edu/agriculture_facultypubs/1 (accessed 1/27/2016)
5. Shimelis, O.; Yang, Y.; Stenerson, K.; Kaneko, T.; Ye, M. Evaluation of Solid-Phase Extraction Dual-layer Carbon/Primary Secondary Amine for Clean-up of Fatty Acid Matrix Components From Food Extracts in Multiresidue Pesticide Analysis. *J. Chrom. A*, 2007, 1165, 18-25.

Featured Products

製品名	カタログ番号
Supelclean™ Ultra 2400 SPE Cartridges	
1 mL, pk of 108	52779-U
3 mL, pk of 54	54281-U
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Citrate Extraction Tube, 12 mL, pk of 50	55227-U
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, pk of 50	55248-U
Columns	
SLB™-5ms Capillary GC Column, 30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm	28471-U
Ascentis™ Express C18 HPLC Column, 10 cm × 2.1 mm I.D., 2 μm particle size	50813-U
Accessories	
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, USA compatible plug, AC input 115 V	55278-U
Visiprep™ DL 12-port Solid Phase Extraction Manifold	57044
Disposable valve liners, PTFE, 100 ea.	57059

Related Products

製品名	カタログ番号
Solvents and Reagents	
Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv™	1.00029
Acetic acid 100% for LC-MS LiChropur™	5.33001
Formic acid 98% - 100% for LC-MS LiChropur™	5.33002
Ammonium formate for mass spectrometry, ≥99.0%	70221
Acetonitrile for GC-MS SupraSolv™	1.00665
Accessories	
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL, pk of 100	29653-U
Inlet Liner, Split/Splitless Type, Single Taper FocusLiner Design (wool packed)	2879901-U

パプリカパウダーにおける多環芳香族炭化水素 (PAHs) の分析

EZ-POP NP固相抽出カラムと、PAHs専用GCカラム SLB™-PAHsを用いた分析

Katherine K. Stenerson, Principal R&D Scientist



緒言

パプリカは乾燥した甘トウガラシから作られるスパイスであり、さまざまな種類の料理の香り付けや色付けに使用されます。環境下や乾燥工程中にトウガラシ植物を多環芳香族炭化水素 (PAHs) にばく露すると、パプリカパウダーがこれらの物質で汚染されるおそれがあります。料理や加工食品にハーブを使用することがますます増えてきているので、特に発がん性のあるPAHsによるばく露が懸念されます。欧州連合 (EU) は、乾燥ハーブと乾燥スパイスに含まれる数種類のPAHsにおける最大許容レベルを規制しました。特に、パプリカの最大許容レベルはベンゾ[a]ピレンが10 ng/g、ベンゾ[a]ピレン、クリセン、ベンゾ[a]アントラセン、およびベンゾ[b]フルオランテンの合計が50 ng/gと定められています¹。

ハーブとスパイスに含まれるPAHsの検査に使用する試料を調製するには、溶媒抽出とその後のクリーンアップステップが必要です。従来のクリーンアップ方法には、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、シリカゲルによる固相抽出 (SPE) などがありました^{2,3}。本研究では、Florisil上層とZ-Sep/C18下層を含む二層SPEカートリッジを使用した例を紹介します。このカートリッジ (Supelclean™ EZ-POP NP) は食用油からのPAHs直接抽出や、生物試料からの抽出物クリーンアップにも使用されています^{4,5}。最適化したQuEChERS抽出の後、EZ-POP NP SPEカートリッジでクリーンアップしたパプリカ試料のPAHsを測定しました。弱い吸着剤によるQuEChERSクリーンアップと比べて、EZ-POP NPは高純度の抽出物が得られました。抽出方法の最適化とEZ-POP NPによるクリーンアップにより、10 ng/gの添加レベルで70%を超える回収率が得られました。

実験

試料のパプリカは地元の食料品店で購入しました。方法の精度と再現性を評価するための試料には、表1に示すPAHsを含む混合物を10 ng/gの割合で添加しました。添加後、試料を1時間放置して平衡化させてから抽出しました。試料抽出物は図1に示す手順で調製しました。抽出物は、図2に詳細を示すEZ-POP NPカートリッジを用いてクリーンアップしました。分析は、表2に示す条件と表1のトランジションでGC/MS/MSにて測定しました。試料は、無添加パプリカ抽出物を使用して作成したマトリックスマッチング検量線を用いて定量しました。

表1. PAHsとGC/MS/MS分析に使用したトランジション

Peak #	Compound	RT	MRM 1	CE	MRM 2	CE
1	Naphthalene-d ₈ (IS)	5.21	136/108	20	136/84	25
2	Naphthalene	5.25	128/102	20	128/78	20
3	Acenaphthylene	7.62	152/126	30	152/102	30
4	Acenaphthene	7.88	153/127	30	152/126	30
5	Fluorene	9.2	166/165	15	165/164	20
6	Phenanthrene	13.5	178/152	25	176/150	25
7	Anthracene	13.71	178/151	30	176/150	25
8	Fluoranthene-d ₁₀ (IS)	20.76	212/208	35	210/208	15
9	Fluoranthene	20.91	202/152	30	201/200	15
10	Pyrene	22.95	201/200	15	200/174	25
11	Benz[a]anthracene	29.42	228/226	30	114/101	10
12	Cyclopenta[cd]pyrene	29.72	226/225	30	226/224	40
13	Chrysene	29.81	228/226	30	113/112	10
14	5-Methyl chrysene (IS)	31.7	242/241	20	241/239	30
15	Benzo[b]fluoranthene	33.60	252/250	30	126/113	10
16	Benzo[k]fluoranthene	33.67	252/250	30	126/113	10
17	Benzo[j]fluoranthene	33.71	252/250	30	126/113	10
18	Benzo[a]pyrene	34.64	252/250	35	125/124	10
19	Perylene-d ₁₂	34.84	264/260	35	130/116	15
20	Dibenz[a,h]anthracene	37.13	278/276	35	125/124	10
21	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	37.2	138/137	10	137/136	15
22	Benzo[g,h,i]perylene	38.13	138/137	15	137/136	15
23	Dibenzo[a,l]pyrene	41.77	302/301	20	302/300	40
24	Dibenzo[a,e]pyrene	43.27	302/301	40	302/300	40
25	Coronene (IS)	43.76	300/299	35	300/298	50
26	Dibenzo[a,i]pyrene	44.29	302/301	40	302/300	40
27	Dibenzo[a,h]pyrene	44.68	302/301	20	302/300	40

結果および考察

GC/MS/MS：分析条件はPAHs用に最適化されました。感度とピーク形状を改善するために、注入ポートの高さとMS温度を高くするとともに、圧力パルス注入と内径2 mmのインレットライナーを使用しました。オープン温度プログラムはAndersonらを使用したプログラムに基づいていたため、MRMトランジションでは識別不能なベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンなどの異性体をクロマトグラフィーで分離できるようにする必要がありました⁶。この温度プログラムとGCキャピラリーカラム (SLB™-PAHms) の組み合わせにより、すべての異性体群が十分に分離されました。図3にベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンの異性体の分離例を示します。これらの異性体は5%フェニルメチルシリコーンや「X-5」タイプの液相では分離できません。

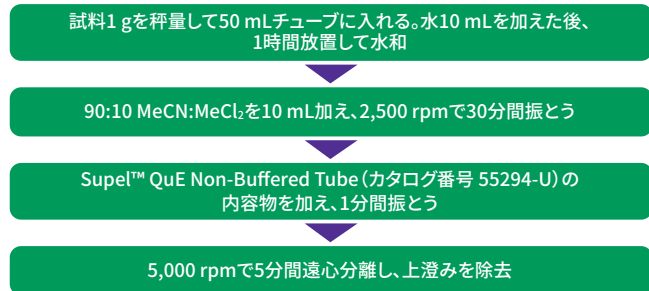


図1. パプリカ中のPAHsに使用する試料抽出手順



図2. パプリカ抽出物クリーンアップ手順

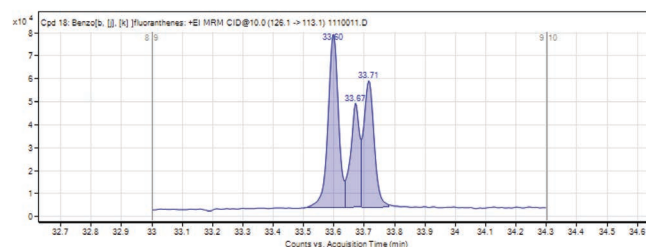


図3. ベンゾ[b]、[k]、および[j]フルオランテンのGC/MS/MSクロマトグラム(パプリカ抽出物に10 ppbで含有)

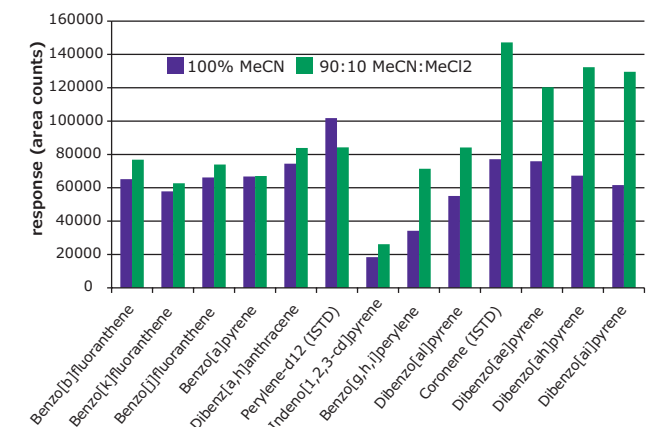


図4. 5環および6環PAHs回収に対する抽出溶媒の効果

表2. GC分析条件

カラム	SLB™-PAHms, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μm
オープン	60 °C (1 min), 40 °C/min to 180 °C, 3 °C/min to 230 °C, 1.5 °C/min to 235 °C (10 min), 15 °C/min to 280 °C (3 min), 15 °C/min to 350 °C (15 min)
注入口温度	300 °C
キャリアーガス	helium, 0.8 mL/min, constant
検出器	MRM, per Table 1
MS source temp.	250 °C
Quadrupole temps	200 °C (Q1 & Q2)
注入力	1 μL, pulsed splitless (60 psi until 0.75 min, splitter on at 0.75 min)
ライナー	2 mm I.D. FocusLiner with taper

試料調製手順の最適化

試料は、「QuEChERS法に類似した」方法に基づいて抽出しました。QuEChERSに通常使用される100%アセトニトリルから抽出溶媒の組成を最適化し、より質量が大きいPAHsの回収率を向上させました。図4に、10 ng/gで添加したパプリカから100%アセトニトリルおよび90:10アセトニトリル：塩化メチレン混合溶媒で抽出した、5環および6環PAHsの絶対感度を示します。抽出溶媒の効果のみ評価するために、得られた抽出物はSPEによるクリーンアップをする前に測定しました。90:10混合溶媒を使用した5環および6環PAHsの回収率の方が良いことが感度の高さから示されます。90:10混合溶媒を使用した抽出物の方が、油性残渣として認められる高いバックグラウンドを示しました。そのため、塩化メチレンの割合を高めた抽出溶媒の評価はしませんでした。

EZ-POP NP SPEカートリッジを使用する方が、QuEChERS法によるクリーンアップより良好な結果が得られました。そもそ

も、EZ-POP NPカートリッジは食用油、特にオリーブオイル中のPAHs分析用に開発されました。アセトニトリルは分析物質の回収とバックグラウンドの保持を均衡させるため、食用油試料とともに使用するのが推奨される溶出溶媒です。従来の研究では、塩化メチレンを加えるとPAHsの回収率は向上するものの、最終抽出物中のバックグラウンドの量が増えるという好ましくない副作用があることが示されていました⁴。しかし、パプリカの溶媒抽出物に含まれる油成分は極めて少ないため、クリーンアップ手法を改良し、バックグラウンドの低減と5環および6環PAHsの回収率を向上させることができました。改善箇所は、塩化メチレンを含むように溶出溶媒組成の変更です。図5に、EZ-POP NPクリーンアップ中にさまざまな溶出溶媒を使用して得た4〜6環のPAHs感度の比較を示します。処理した試料は、パプリカ（10 ng/gを添加）を90:10アセトニトリル：塩化メチレンで抽出したものでした。溶出溶媒に塩化メチレンを加えると、すべてのPAHsの感度が増えました。いくつかの化合物で10%添加と20%添加での感度差が最小になりましたが、最終抽出物中のバックグラウンドは増えました。したがって、EZ-POP NPクリーンアップに使用する溶出溶媒として90:10アセトニトリル：塩化メチレンを選択しました。

バックグラウンドの低減

パプリカなどの乾燥試料の場合、弱い吸着剤を使用するQuEChERS法によるクリーンアップはバックグラウンドを許容できるレベルまで低減させる能力を備えていません。農薬の分析では、活性炭と第1級、第2級アミン（PSA）、またはアミノプロピル基で官能化したシリカを含む二層SPEカートリッジをクリーンアップに使用できますが、活性炭はこれらの化合物を強く保持して回収率を低下させるため、PAHsには使えません。EZ-POP NPは活性炭を含まないのでPAHsに適しています。EZ-POP NPカートリッジにあるものと類似した吸着剤を含む混合物を使

(次のページへ続く)

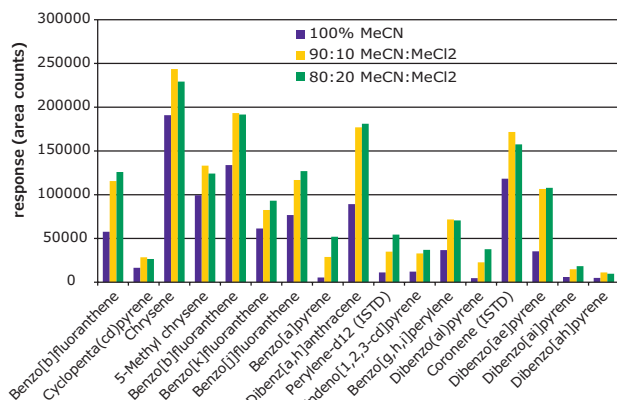


図5. 添加パブリカ (10 ng/g) からの4~6環PAHs回収用EZ-POP NPクリーンアップ中に使用する溶出溶媒組成の効果

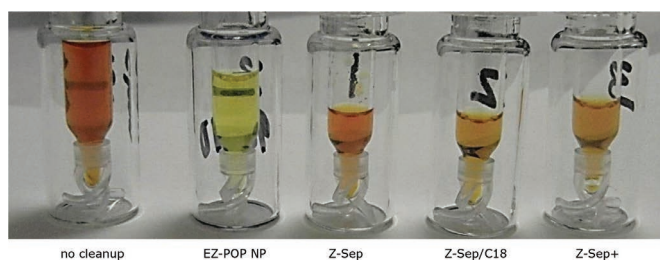


図6. EZ-POP NP SPE, および類似した吸着剤のQuEChERSを使用してクリーンアップしたパブリカ抽出物。Z-Sep、Z-Sep/C18、およびZ-Sep+はQuEChERS クリーンアップ

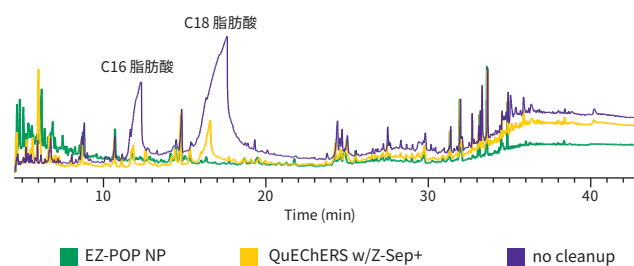


図7. パブリカ抽出物のGC/MSスキャンの比較 (EZ-POP NP、Z-Sep+を使用した QuEChERS、およびクリーンアップなし)

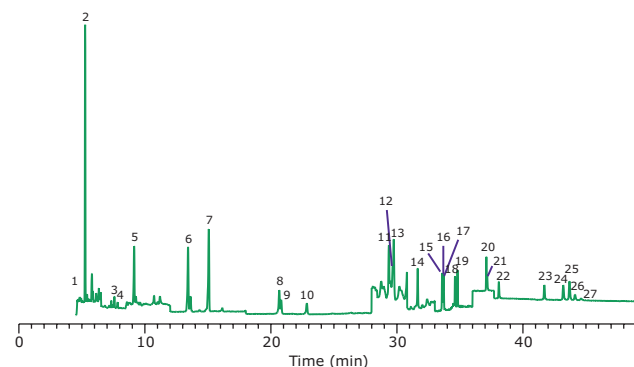


図8. 10 ng/gを添加し、EZ-POP NPでクリーンアップした後のパブリカに含まれる PAHsのGC/MS/MS分析。ピークIDは表1に示す

用し、EZ-POP NPのクリーンアップ性能をQuEChERSと直接比較しました。90:10=アセトニトリル：塩化メチレンを使用して生成し、EZ-POP NPとQuEChERSでクリーンアップしたパブリカ抽出物を図6に示します。クリーンアップなしのものに比べていずれの方法でも色が薄くなり、EZ-POP NPで最も薄くなりました。Z-Sepでクリーンアップした試料には、瓶の内部にあるような油の残留成分が認められました。比較のためにGC/MSスキャンを使用すると（図7）、EZ-POP NPクリーンアップでバックグラウンド（特に、C16およびC18脂肪酸の除去に関して）が最も低くなりました。比較に含めた3種類のQuEChERS吸着剤の中でZ-Sep+のバックグラウンドが最も低かったため、ここにはZ-Sep+のデータのみ示します。EZ-POP NPで最適化したクリーンアップ法を使用すると、図8に示すすべてのPAHsを検出できました。

10 ng/gを添加したパブリカ試料の分析に対する回収率と再現性のデータを表3に示します。回収率の値は内部標準による補正なしで測定した絶対的な値です。フルオレンとジベンゾ[a,h]ピレン以外の回収率は全般的に良好（>70%）であり、RSD値は15%以下でした。フルオレンのピークとともに溶離するマトリックス干渉がいくらかあり（モニターした両MRMに存在）、ジベンゾ[a,h]ピレンの感度は添加により不安定であったために再現性が低下しました。

添加回収率の測定に使用したパブリカに加え、さらに2種類のブランドを未添加で分析しました。1つには「燻製パブリカ」というラベルがあったため、はるかに高いレベルのPAHを含むと予想されました。いずれのブランドも繰り返して分析し、その結果を表4にまとめました。ブランドAでは数種類のPAHsが検出されましたが、ハーブやスパイスに対するEUの限界値を超えるレベルのものはありませんでした。一方、燻製された試料は、EU

表3. 添加レベルが10 ng/g (n = 3) であるパブリカからのPAHs回収率および再現性

n=3	avg. % Recovery	% RSD
Naphthalene	124%	11%
Acenaphthene	78%	13%
Acenaphthylene	76%	15%
Fluorene	52%	27%
Phenanthrene	102%	4%
Anthracene	78%	12%
Fluoranthene	95%	7%
Pyrene	100%	3%
Benz[a]anthracene	99%	9%
Cyclopenta[c,d]pyrene	70%	12%
Chrysene	99%	6%
5-Methyl chrysene	91%	10%
Benzo[b]fluoranthene	89%	6%
Benzo[k]fluoranthene	82%	6%
Benzo[j]fluoranthene	97%	8%
Benzo[a]pyrene	91%	12%
Dibenz[a,h]anthracene	84%	6%
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	86%	12%
Benzo[g,h,i]perylene	80%	5%
Dibenzo[a,l]pyrene	108%	12%
Dibenzo[a,e]pyrene	82%	5%
Dibenzo[a,i]pyrene	108%	15%
Dibenzo[a,h]pyrene	147%	36%

の規制リストにある4種類のPAHsのすべてを検出可能なレベルで含んでいました。ベンゾ[a]ピレンは最大許容レベル（10 ng/g）未満でしたが、このPAHとベンゾ[a]アントラセン、クリセン、およびベンゾ[b]フルオランテンを合わせたレベルは、最大許容レベル（50 ng/g）をはるかに超えていました。これは、

表4. 無添加パブリカ試料の分析 (RPD率 = 再現率)

n=2	Brand A		Brand B*	
	Conc. (ng/g)	%RPD	Conc. (ng/g)	%RPD
Naphthalene	69.8	5%	302	3%
Acenaphthene	3.0	10%	211.6	1%
Acenaphthylene	ND		27.7	4%
Fluorene	ND		272.2	6%
Phenanthrene	25.1	2%	2833	56%
Anthracene	ND		677	4%
Fluoranthene	ND		995	8%
Pyrene	ND		884	7%
Benz[a]anthracene	ND		177.6	7%
Cyclopenta[c,d]pyrene	7.1	1%	99	7%
Chrysene	ND		103.1	8%
5-Methyl chrysene	ND		0.6	25%
Benzo[b]fluoranthene	ND		10.8	5%
Benzo[k]fluoranthene	ND		ND	
Benzo[j]fluoranthene	ND		6.4	5%
Benzo[a]pyrene	ND		8.3	6%
Dibenz[a,h]anthracene	ND		ND	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	ND		2.3	2%
Benzo[g,h,i]perylene	ND		2.6	5%
Dibenzo[a,i]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,e]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,i]pyrene	ND		ND	
Dibenzo[a,h]pyrene	ND		ND	

*燻製パブリカ

燻製加工によってPAHsが生成され、最終的にパブリカ中に蓄積したものと予想されます。しかし、燻製ハーブの消費量は一般的に少ないことから、EU規制では燻製ハーブに規制限界値を適用しないことを規定しています。

感度とピーク形状の問題により、質量の重いPAHsをGC/MSによって低レベルで分析するのは困難な場合があります。装置の性能は夾雑物を含む試料の注入に伴って急激に低下するおそれがあります。パブリカ抽出物の分析でもそうであるか確認するために、分析対象外である4〜6環のPAHsの内部標準を分析前に抽出物へ加えました。その後、これらの化合物の感度を測定全体でモニターしたところ、どの内部標準でも感度低下は観察されず、各エリアの偏差は15%以下でした。

結論

パブリカパウダーに低レベルで含まれるPAHsを分析するための試料調製法を開発しました。抽出プロトコルでは、塩化メチレンを抽出溶媒に加えて回収率を向上させる「改良QuEChERS」法を利用しました。クリーンアップは、塩化メチレンをアセトニトリル溶出溶媒に加え、EZ-POP NPカートリッジによるSPEを使用して達成しました。この改良により、4〜6環のPAHsのほとんどで絶対回収率が80%を超え、RSD値は15%未満になりました。SPEクリーンアップによって抽出物のバックグラウンドが低下し、特にC16とC18の脂肪酸は、弱い吸着剤を使用するQuEChERSクリーンアップと比べて大幅に低下しました。MRMで識別できない異性体群をクロマトグラフィーで分離するには、アプリケーション固有のGCカラム (SLB™-PAHms) のPAHs分析が必要でした。

参考文献

1. Commission Regulation (EU) 2015/1933 of 27 October 2015 amending Regulation EC/1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in cocoa fibre, banana chips, food supplements, dried herbs and dried spices. *Off. J. Eur. Union* **2015**, L282/11.

2. Rozentale, I.; Lun, A. Y.; Zacs, D.; Bartkevics, V., The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in dried herbs and spices. *Food Control*. **2018**, 83, 45-53.

3. Monado-Maraña, O.; Pérez, R.L.; Escandar, G.M.; Muñoz de Peña, A.; Galeano-Díaz, T., Combination of liquid chromatography with multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS) in the quantitation of polynuclear aromatic hydrocarbons present in paprika samples. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 8254-8262.

4. tenerson, K.K.; Shimelis, O.; Halpenny, M.; Espenschied, K.; Ye, M.M, Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in olive oil after solid-phase extraction using a dual-layer sorbent cartridge followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 4933-4939.

5. Cabillic, J.; Fallot, C., Final Report on the Feasibility Study of QuEChERS Extraction and / or Purification for Analysis of PAHs in Biota, AQUAREF Report 2015 - 22 p.

6. Anderson, K.A.; Szelewski, M.J.; Wilson, G; Quimby, B.D.; Hoffman, P.D., Modified ion source triple quadrupole mass spectrometer gas chromatograph for polycyclic aromatic hydrocarbon analyses. *J. Chrom. A*. **2015**, 1419, 89-98.

Featured Products

製品名	カタログ番号
Supelclean™ EZ-POP NP SPE Cartridge	54341-U

多環芳香族炭化水素(PAHs)標準物質の一覧は <https://bit.ly/3Z7vdTM> をご覧ください。

Related Products

製品名	カタログ番号
Sample Preparation	
Empty extraction tubes, 50 mL	55248-U
QuEChERS Shaker and Rack Starter Kit, USA compatible plug	55278-U
Visiprep™ DL SPE Vacuum Manifold, 12 port	57044
Visiprep™ DL SPE Vacuum Manifold, 24 port	57265
Disposable Valve Liners, PTFE, Pk.100	57059
Solvents & Reagents	
Acetonitrile, SupraSolv™ for GCMS	1.00665
Methylene chloride, puriss ACS reagent grade	32222
GC Accessories	
Inlet Liner, Split/Splitless Type Single Taper FocusLiner Design (wool packed)	2879901-U
Molded Thermogreen™ LB-2 Septa, solid discs	28676-U
Inlet Liner O-Ring	21003-U
Gold-Plated Inlet Seal (Straight Design)	23318-U
Capillary Column Nut for Agilent MS	28034-U
Vials	
Certified Vial Kit, Low Adsorption (LA), 2 mL, amber w PTFE-silicone septa, pk of 100	29652-U

畜水産物中における残留農薬等の一斉分析

ジルコニアコート化シリカゲル/C18混合固相抽出カラム

本製品は、畜水産物中における残留農薬分析用に開発されました。Supelclean™ Z-Sep / C18混合ミニカラムは、Z-Sep（ジルコニアコート化シリカゲル）とODS（C18）シリカゲルで構成されています。Z-Sepは、難易度の高いマトリックス（脂質または色素含有）の前処理において多くの実績があります。Z-Sepは、脂肪族マトリックスの干渉を取り除くことで、従来法のC18よりもサンプルのクリーンアップと回収率を改善し、分析カラムの寿命と機器のスループットを向上させます。これらの製品を用いる事により、GPCメソッドに比べて簡便且つ低コストな手法としての利用が期待されています。

抽出、精製手順

サンプル10 gに対して
2%酢酸5 mL+n-ヘキサン15 mLで均質化
アセトニトリル25 mL + 15 mL、セライト2 gで均質化
遠心分離後、上澄みをろ過

アセトニトリルで50 mLに調整

サンプル抽出物5 mLをZ-Sepカラムへロード

溶出液を硫酸アンモニウムにて塩析
無水硫酸ナトリウムで脱水

上澄みをSAX/PSA 固相カラムへロード
アセトン5 + 5 mLで溶出

溶出液を濃縮乾固し
50%アセトン:n-ヘキサンで2 mLに調整

クロマトグラフへ



参考文献

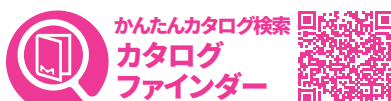
“ジルコニアコート化シリカゲル/C18混合ミニカラムを用いたGC-MS/MSによる畜水産物中の残留農薬等の一斉分析”
日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 Vol.112, P56

使用上の注意

Z-Sep+ は、ジルコニアおよびODSとの相互作用により、水酸基を持つ農薬を強力に保持する傾向があります。事前に農薬標準物質による添加回収試験による評価をお勧めします。

Featured and Related Products

製品名	カタログ番号
Supelclean™ Z-Sep/C18 Mixed Bed SPE Tube, 420 mg/6 mL	54282-U
Supelclean™ Z-Sep+ SPE Tube, 500 mg/6 mL	52972-U
Supelclean™ SAX/PSA SPE Tube, 500 mg/500 mg/6 mL	52577-U



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2023年2月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Supelco are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

シグマ アルドリッチ ジャパン

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/JP/ja

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ

E-mail: sialjpcs@merckgroup.com Tel: 03-6756-8275

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。