

脂質除去剤

Z-Sep+, Z-Sep アプリケーション



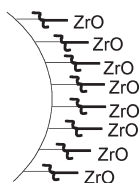
- Supel™ QuE Z-Sep, Z-Sep+ の特徴と脂質除去の仕組み
- 焼きハンバーグからの PAH 類の抽出と分析
- エビ中のクロラムフェニコール
- ピーナッツバター・トウモロコシ中のアフラトキシン
- アボカド中の残留農薬の分析
- 牛の腎臓中の農薬の分析
- オレンジ中の農薬残留物質の分析での色素除去

脂肪・脂質の多い試料の精製に

Supel™ QuE Z-Sep, Z-Sep+ の特徴と脂質除去の仕組み

Z-Sep (HybridSPE-PL)

・シリカゲルに ジルコニア を化学結合

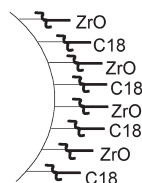


Z-Sep

担体 : シリカゲル
粒子径 : 20 μm
ポアサイズ : 120Å
表面積 : 350 m²/g
被覆率 : ZrO₂%=3.5

Z-Sep+

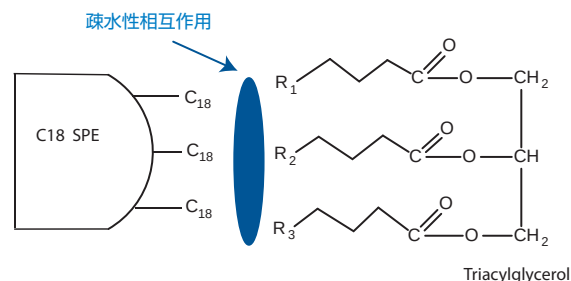
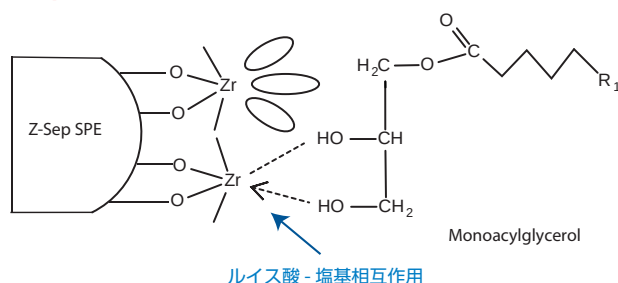
・シリカゲルに ジルコニア と C18の両方を化学結合



Z-Sep+

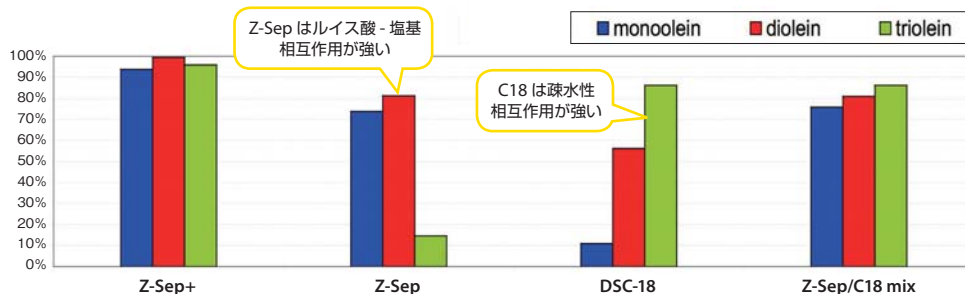
担体 : シリカゲル
粒子径 : 50 μm
ポアサイズ : 70Å
表面積 : 480 m²/g
被覆率 : ZrO₂%=4.5,
C18%=16

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

25mg の充填剤に 1mL のオレイン溶解アセトニトリル溶液 (400mg/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
上げたい場合は **Z-Sep/C18**

食品中の多量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、凍結乾燥等の既存の前処理法よりも、Supelco の新しい脂質除去剤「**Z-Sep+**」&「**Z-Sep/C18**」は簡単な操作法で高い精製効果を発揮し、**モノ・ジ・トリグリセリド**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。

ルイス塩基 Hydroxide Phosphate Fluoride Citrate Sulfate Acetate Formate Nitrite Chloride Water

保持が強い ← ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ 保持が弱い

↑ リン脂質、一部の有機リン系農薬
↑ モノアシルグリセライド、ジアシルグリセライド

焼きハンバーグからの PAH 類の抽出と分析

Supel™ QuE Z-Sep (QuEChERS 法) および SPB®-608 キャピラリー GC カラムを用いた分析

緒言

多環芳香族炭化水素 (PAH) は 2 つ以上の芳香環が結合した化合物の総称です。疎水性で、有機物が不完全燃焼することにより、環境中どこにでも存在しています。構造中に 5 つ以上の環を有するものは毒物研究の対象となることが多く、発がん性や変異原性のあるものも見つかっています¹。

肉をグリルで焼くと、脂肪や肉汁が炎と接触した時に PAH 類が生成し肉に付着します²。米国では、現在 PAH 類を含む食品の消費に関するガイドラインはありませんが²、欧州連合 (EU) では 2011 年に規制 835/2011 が採択され、様々な食品中の基準値が定められました。熱処理した肉の最大許容レベルは、ベンゾ [a] ピレンとして 5 µg/kg、ベンゾ [a] ピレン、ベンゾ [a] アントラセン、ベンゾ [b] フルオランテンおよびクリセンの 4 種の PAH を合わせて計 30 µg/kg と定められています³。

PAH 類は疎水性のため、ハンバーグの肉のように脂肪の多い試料から抽出すると、同時に多量のマトリックスを共抽出することになります。GC-MS 分析を用いる場合、脂肪分の多いマトリックスは注入口やカラム、検出器をすぐに詰まらせてしまいます。高沸点成分をバックフラッシュすれば GC カラムや検出器の汚染を防げますが、インレットライナーへの残留物の蓄積は防げません。そのため、GC 分析を行うには試料の精製が必須となります。従来の精製方法には、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) や、シリカゲル、アルミナ、Florisil® 等を使用し分画する方法があります。本報告では、迅速 (Quick)、容易 (Easy)、安価 (Cheap)、効果的 (Effective)、失敗がなく (Rugged) かつ安全 (Safe) な QuEChERS “方法” を使って、焼きハンバーグの肉から 28 種の PAH 類を抽出し、精製する簡単な方法を開発しました。抽出後の精製は、新しい充填剤であるシリカゲルにジルコニアを結合させた Z-Sep および Z-Sep+ を含む数種の充填剤を用いて行いました。分析には、キャピラリーカラム SPB-608 を用いて選択イオンモード (SIM) で GC-MS によって分析しました。このカラムは、ベンゾ [b]、[j] および [k] フルオランテンを含む数種の異性体の分離に必要な選択性と効率を有しています。長さが短く径の細いものを用いることで、高効率を維持しながら分析時間を短くしました。

実験

ハンバーグをグリルでウェルダンまでよく焼いた後、細かく挽き、PAH 類の混合物を 100 ng/g の割合で添加しました。その後ナフタレン-d₈、フルオランテン-d₁₀ およびペリレン-d₁₂ を含む内部標準溶液を加えました。10 分後、この混合物を表 1 に示した抽出と精製の手順に供しました。抽出溶媒にはアセトニトリルを選択しました。これは、アセトニトリルが PAH 類の抽出の最大化と脂肪分マトリックスの抽出の最小化のバランスが優れているためです。精製には次の 4 種の吸着剤を評価しました：(1) Z-Sep+, 500 mg、(2) Z-Sep+/PSA, 500 mg/400 mg、(3) Z-Sep, 500 mg および (4) PSA/C18, 400 mg/150 mg。

Katherine K. Stenerson, Principal Scientist katherine.stenerson@sial.com

PAH を同じように添加したハンバーグ試料 3 つと添加していないものの 1 つをそれぞれ 4 種の精製法で処理しました。GC/MS 分析は選択イオンモード (SIM) で、表 2 に示す条件で実施しました。定量はアセトニトリルを使って得た五点校正曲線を用いて行いました。

表 1 焼きハンバーグ用の抽出・精製手順

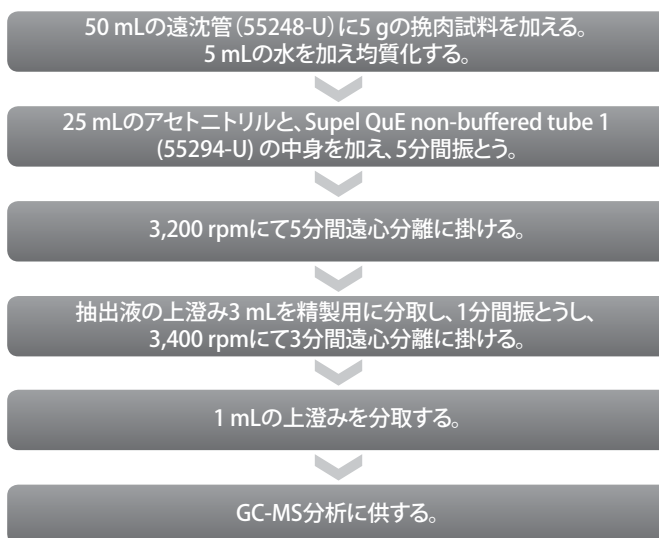


表 2 GC-MS 分析条件

column:	SPB-608, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 µm
inj. temp.:	265 °C
oven:	60 °C (1 min), 25 °C/min to 275 °C, 10 °C/min to 300 °C (13 min)
flow rate:	1.5 mL/min constant
injection:	1 µL, splitless (1 min)
liner:	4 mm FocusLiner™ w/taper
ms tune:	ATUNE
ms temps.:	quads = 160 °C, source = 240 °C, transfer line = 300 °C

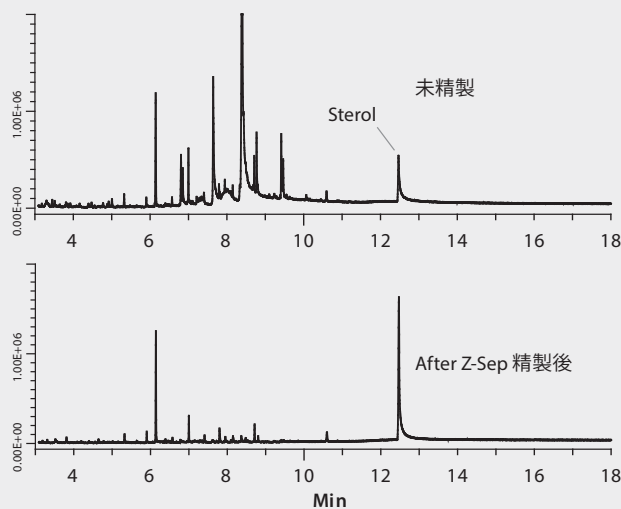
結果と考察

バックグラウンド除去

精製した抽出物をフルスキャンモードで GC-MS 分析して、バックグラウンドの低減を評価しました。Z-Sep で精製した抽出物が最も低いバックグラウンドを示しました (図 1)。12 ~ 13 分の間に溶離している大きなピークはステロールと特定されました。SIM モードでは、ステロールはこの領域で溶離する PAH の定量に用いるイオンを妨害しませんでした。Z-Sep で精製した焼きハンバーグ中の PAH 類のクロマトグラムを図 2 に示します。

(continued on next page)

図1 Z-Sepによる精製前後のGC-MSバックグラウンド



PAH 回収率

図3に精製後の回収率をまとめました。意図的にPAHを添加していないハンバーグからもPAH類が検出され、添加試料の回収率はこれらの値を差し引くことで求めました。%RSDはほとんどの場合10未満で、今回の抽出法の再現性が優れていることが示されました。総合的に最高の回収率が得られたのは、Z-Sepでの精製でした。ピレン以降のPAHでは、Z-Sep+をはじめとするC18を含む吸着剤を用いた精製後に回収率が低くなりました。Z-Sepはジルコニアを結合させたシリカゲル（シリカゲルの表面にジルコニア）であって、C18を全く含んでいないのに対し、Z-Sep+はシリカゲルにジルコニアとC18を両方結合したものです。

GC-MS分析の最初の3分の1には、幾分マトリックス干渉が見られました。これにより、最初の内部標準であるナフタレン-d₈の測定を正確に行うことができませんでした。そのため定量には使いませんでした。このため、フルオランテン-d₁₀およびペリレン-d₁₂だけを用いました。SPB®-608カラムは、トリフェニレンとクリセンを除くすべての異性体を分離できました。

図2 PAH類を100 ng/gの割合で添加した網焼きハンバーグのGC-MS/SIM分析。Z-Sep精製後

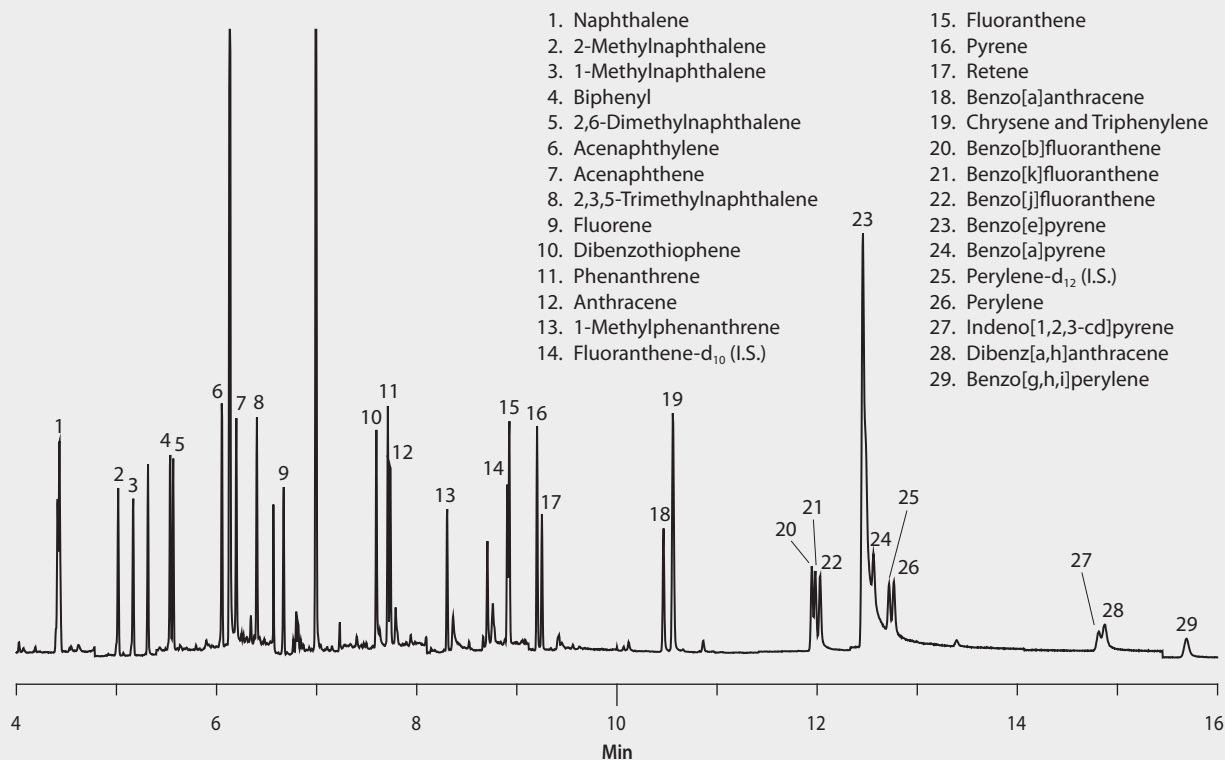
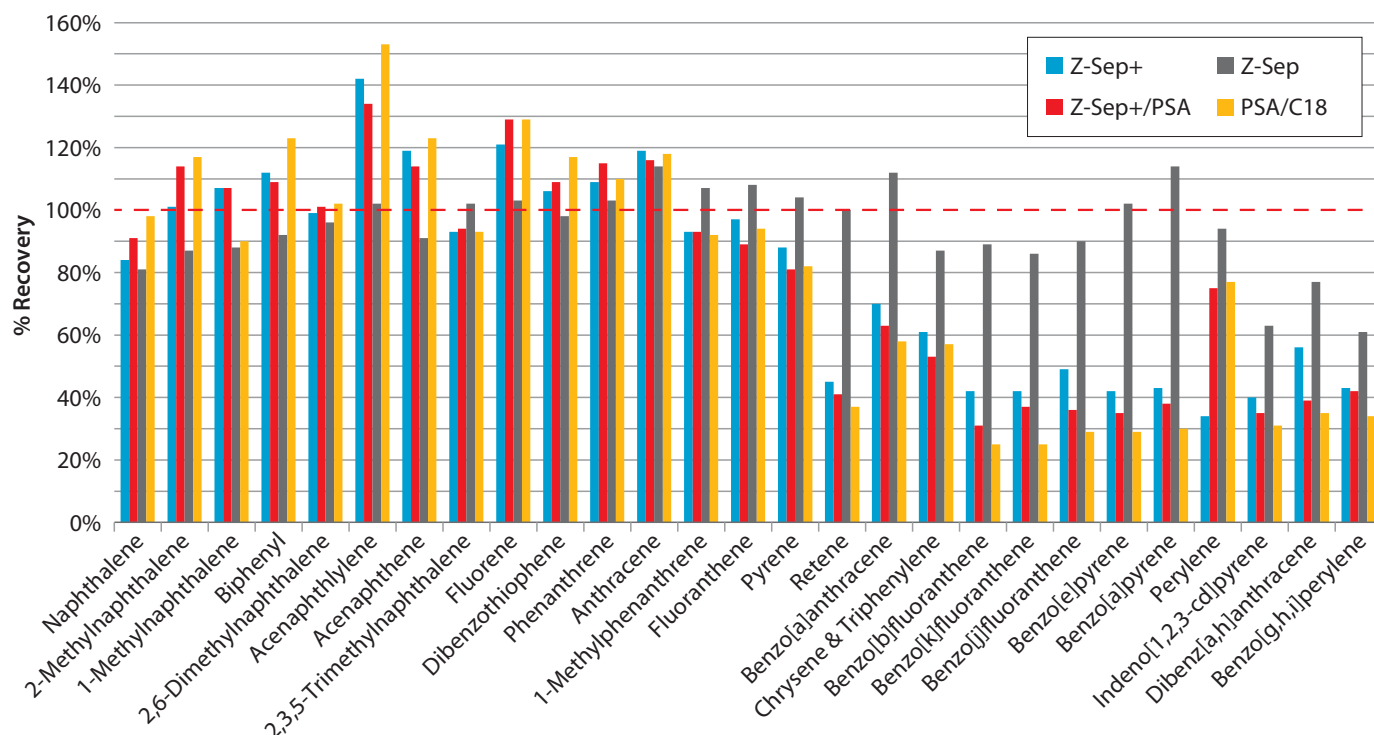


図3 焼きハンバーグからの平均 PAH 回収率。異なる吸着剤で精製後。添加レベル 100 ng/g



結論

QuEChERS 法は、焼きハンバーグの肉から PAH を抽出するのに効果的に使用できました。精製では、4 環以上の芳香環を含む PAH において、C18 を含む吸着剤では、回収率が低く、C18 を含まないジリコニア結合シリカゲルである Z-Sep では平均回収率が最も高くなりました。また、Z-Sep で、GC-MS のバックグラウンドが低い抽出液が得られました。SPB®-608 カラムは選択性が高く、1 組を除いてすべての異性体を分解できました。用いたカラムのサイズが小さいため、GC 分析は 20 分未満で完了しました。

References

1. Wenzl, T., Simon, R., Kleiner, J., Anklam, E., Analytical methods for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Food and the Environment Needed For New Food Legislation in the European Union. *Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25(7), 716-725.
2. National Cancer institute website: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/cooked-meats. (accessed 8/28/2013)
3. EU Commission Regulation No. 835/2011; Official Journal of the European Union; August 20, 2011.



Featured Products

Description	Cat. No.
Supel™ QuE QuEChERS Products	
Supel QuE Z-Sep Tube, 500 mg/12 mL, 50 ea	55403-U
Supel QuE Z-Sep+ Tube, 500 mg/12 mL, 50 ea	55296-U
Supel QuE Non-Buffered Tube 1, 12 mL, 50 ea	55294-U
Capillary GC Column	
SPB-608, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 µm	お問い合わせください
Analytical Solvent	
Acetonitrile CHROMASOLV®, gradient grade for HPLC	34851

無償サンプルをご用意しています！

ご希望の方は、弊社テクニカルサポートまで

TEL : 03-5796-7330 FAX : 03-5796-7355 E-mail : sialjpsp@sial.com

エビ中のクロラムフェニコールの高速抽出と低濃度検出

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 jennifer.claus@sial.com

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と分かっており、ヒトの発がん物質である可能性もあります。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な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レベルは決められていません¹。したがって、食品のような困難なマトリックス中のクロラムフェニコールの残留量を高精度かつ高感度で制御しモニターする分析手法が必要とされています。

QuEChERS 法 (迅速、容易、安価、効果的、失敗がなくそして安全) 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 の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果を比較しました。

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し、次いで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 μ L 加え、それぞれ 500 mg の Z-Sep+、Z-Sep、C18 分散型吸着剤、マッチング法また、精製用吸着剤なしと混合しました。次いで試料を振とうし遠心分離したのち、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添加していない抽出液を複数再現し処理しました。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 で分析しました。その後この試料を、溶媒校正標準液を用いて、ならびに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を用いて定量化しました。

結果

図 1a および 1b は、吸着剤による色素の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効果的に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は、時間が経つと沈殿を生じる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体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不可欠です。

図 1a QuEChERS による精製を用いて得たエビの最終抽出物 図 1b QuEChERS による精製を用いずに得たエビの最終抽出物



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。図から分かるように、全般的なクロラムフェニコール回収率は、調べた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再現性が高い結果が得られました。

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)

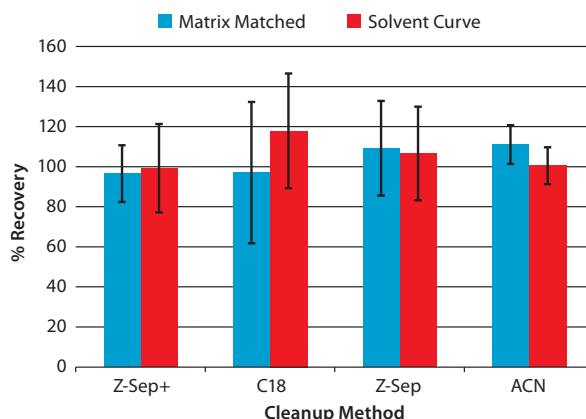


図 3 は、それぞれの精製法に対するイオン化効果を、絶対検量線からの偏差で示しています。QuEChERS による精製を行わなかった場合、アセトニトリル抽出に対してマトリックス抑制が明らかに見られます。C18 精製法の場合にマトリックス増進が見られます。図 4 に、0.3 ng/g でクロラムフェニコールを添加したエビ試料のクロマトグラムを示します。

図3 溶媒曲線からの偏差によるマトリックスイオン化効果

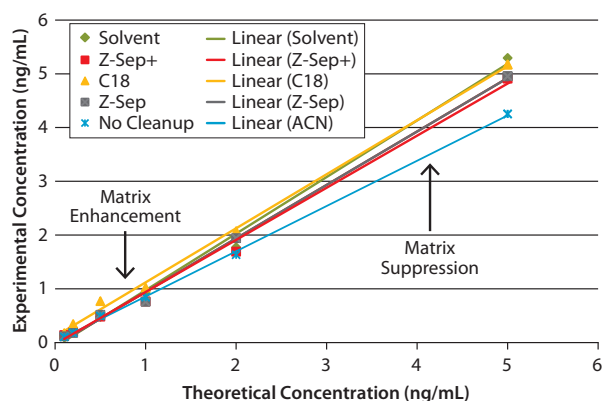
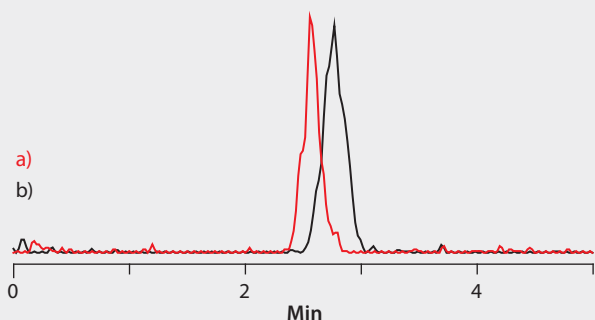


図4 LC-MS/MS 抽出イオンクロマトグラム (XIC)。

a) エピ抽出液中のクロラムフェニコール (0.3 ng/g)。

b) エピ抽出液中の内部標準 (0.6 ng/g)。

mobile phase: (A) water; (B) acetonitrile
gradient: 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
flow rate: 0.5 mL/min
pressure: 190 bar
detector: MS/MS, ESI(+), MRM, 320.9/151.9, 326/157
injection: 10 µL
sample: 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 を用いた高選択性かつ高感度の分析法を開発しました。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、許容できる回収率が得られ、Z-Sep あるいは C18 による精製を用いた場合より、再現性が優れた結果が得られました。Fused-Core® Ascentis® Express C18 カラムを用いた場合、短い時間で十分な分解能と保持時間が得られました。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となりました。

References

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 Products

Description	Cat. No.
Supel QuE QuEChERS Products	
Empty Centrifuge Tube, 50 mL, 50 ea	55248-U
Z-Sep+ Cleanup Tube, 12 mL, 50 ea	55296-U
Z-Sep Cleanup Tube, 12 mL, 50 ea	55403-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 CHROMASOLV®, >99.9%	34967
Water, LC-MS CHROMASOLV®, >99.9%	39253
Analytical Standards	
Chloramphenicol, ≥98%	C-0378
DL-threo-Chloramphenicol-d ₅ , ≥97.0%	41724

+ Related Products

Description	Cat. No.
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, 12 mL, 50 ea	55401-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

無償サンプルをご用意しています！

ご希望の方は、弊社テクニカルサポートまで

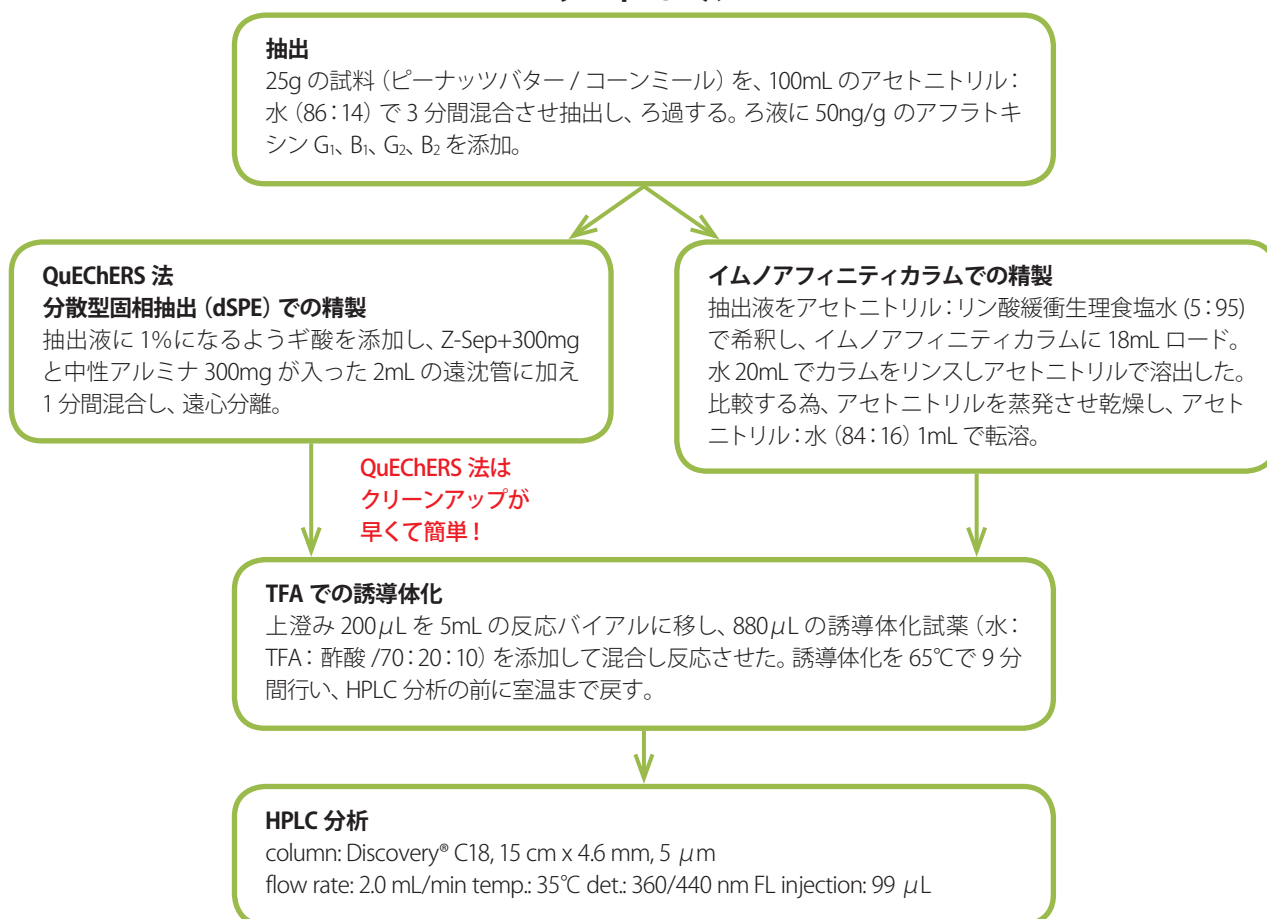
TEL : 03-5796-7330 FAX : 03-5796-7355 E-mail : sialjpsp@sial.com

Supel™ QuE Z-Sep+ を使用したピーナッツバター・コーンミール中のアフラトキシンの分析

ピーナッツバターおよびコーンミール中のアフラトキシンを、新しい脂質除去剤 Supel QuE Z-Sep+ を用い、QuEChERS 法 / 分散型固相抽出 (dSPE) で前処理を行い分析した結果、イムノアフィニティカラムと比較しても遜色ない精製効果と回収率を得る事ができました。

**QuEChERS 法を使用することにより、
前処理時間を大幅に削減し、効果的に妨害物質を除去する事が可能となります。**

プロトコール



このアプリケーションで使用した製品

製品名	Cat. No.	価格 (¥)
Supel QuE Z-Sep+ 充填剤 20g	55299-U	40,200
中性アルミナ充填剤 100g	57208	13,700
Discovery C18, 15 cm x 4.6 mm, 5 μm	504955	65,100



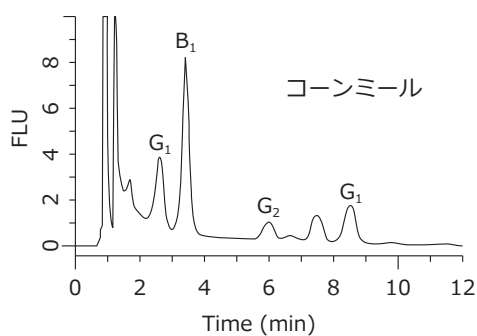
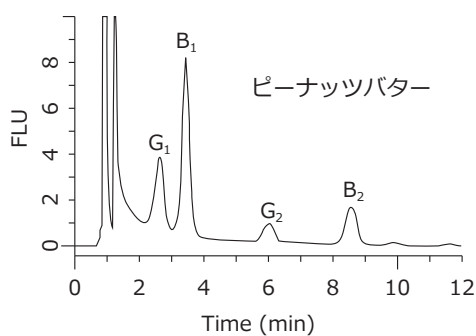
結果

**Supel™ QuE Z-Sep+ は
イムノアフィニティカラムと比べ遜色ない精製効果と回収率
前処理時間の大幅削減が可能に**

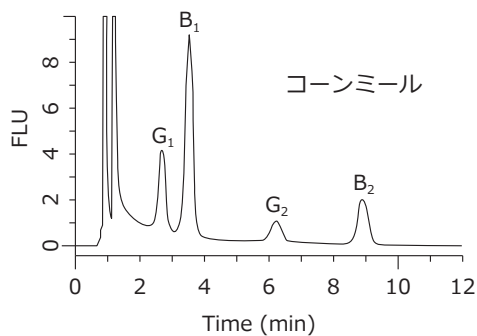
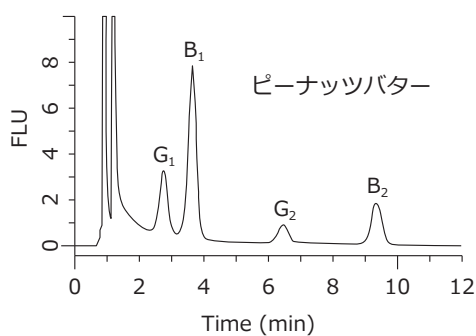
回収率

アフラトキシン	ピーナッツバター				コーンミール			
	G1	B1	G2	B2	G1	B1	G2	B2
QuEChERS (n = 3)	91% (11)	88% (1)	91% (1)	88% (1)	91% (2)	93% (1)	104% (1)	91% (1)
イムノアフィニティ	87% (2)	95% (3)	93% (3)	93% (6)	102% (4)	98% (4)	99% (4)	100% (3)

QuEChERS法



イムノアフィニティ



カビ毒の分析

アフラトキシン、マイコトキシンの分析における、ワークフローに沿った製品のご案内やアプリケーションを掲載しています。

弊社のカビ毒の分析関連製品については <http://www.sigmaaldrich.com/myco-jp> をご覧ください。

アボカド中の残留農薬分析における脂質による妨害の軽減

SupelTM 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、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。アボカドの脂肪含有量は通常 10 ~ 15% で、そのため残留農薬の分析を特に難しくしています。サンプル抽出物から脂肪を除去しないと検出限界が高くなり、GC および LC システムが汚染されます。

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe の頭文字) 法は、果物や野菜の残留農薬分析時の抽出や精製の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 を用いた塩析効果を用います。その後、クリーンアップとして分散型 SPE (dSPE) と遠心分離を行い、分析します。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用
- **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用
- **C18:**
脂質および非極性成分の除去用
- **ジルコニア:**
脂質成分の除去用

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肪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 (-OH) 基のような電子供与基を有する化合物を引きつけ保持します。

実験

アボカド抽出物からの脂肪除去効率について、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 にまとめました。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 (LVI) を用いて GC-MS (SIM モード) で直接分析しました。定量は、マトリックスマッチング標準溶液で調製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 (Cat. No. 55248-U) に移す。
2. アセトニトリル 25 mL を加え、1 分間撹拌する。
3. Acetate Extraction Tube (Cat. No. 55234-U) を加え、1 分間撹拌する。
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 (Cat. No. 55296-U) に移して、撹拌、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 (Cat. No. 55229-U) に移して、撹拌、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っていました (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留物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行いました (図 2)。クリーンアップを行わ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留物が少ないことが分かります。

図 1 Avocado Extracts after Cleanup.

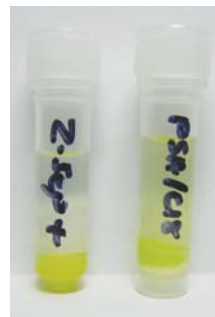
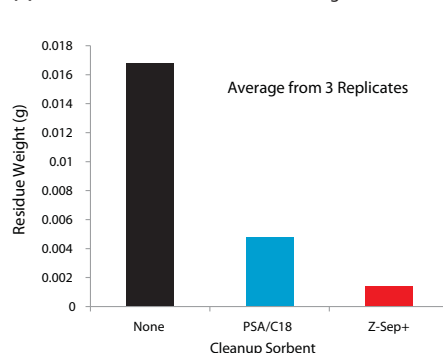


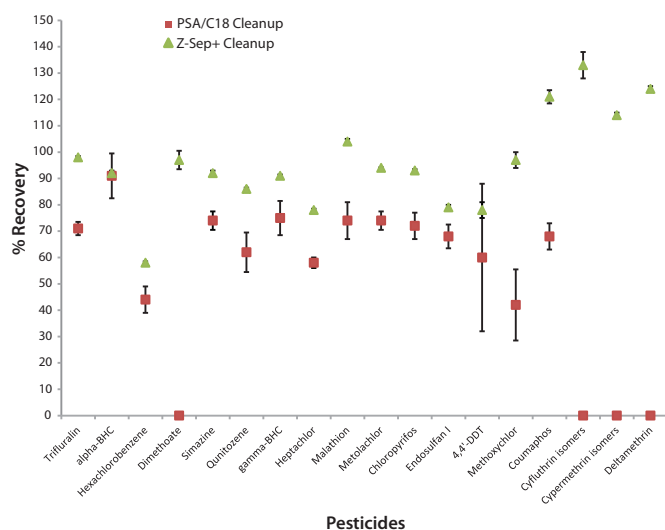
図 2 Amount of Matrix Residue Remaining



農薬回収率

回収率データを算出できるように、農薬添加したサンプルと添加しなかったサンプルをそれぞれ複数回分析しました。感度を改善できるように MS は SIM モードで行いました。ほとんどすべての農薬について、回収率データは 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データ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。

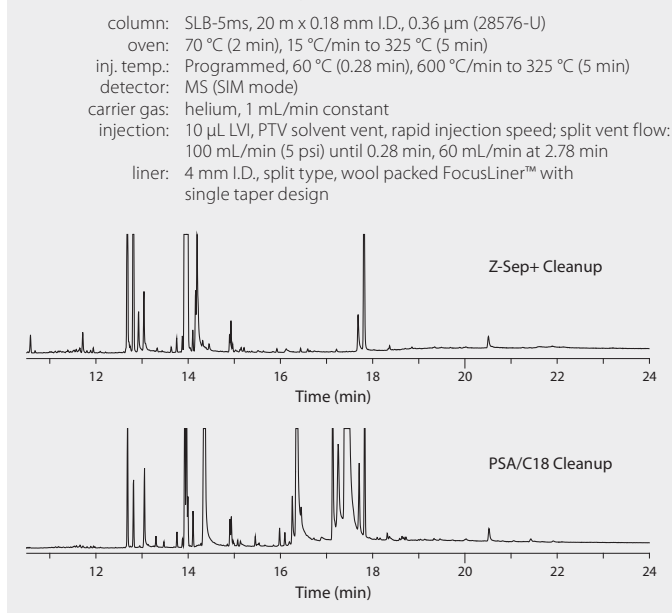
図 3 分析物の回収率と広がり (n=3)



クロマトグラフィー

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+ クロマトグラムの方がマトリックス妨害が著しく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の分析の精製においてとても優れています。不要なマトリックスをより多く除去するため、目的の物質の回収率が高まります。

図 4 GC-MS Chromatograms (same y-axis)



Featured and Related Products

Description	Qty.	Cat. No.
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, 12 mL	50	55296-U
PSA/C18/ENVI-Carb™ Cleanup Tube, 12 mL	50	55286-U
PSA/C18 Cleanup Tube, 12 mL	50	55229-U
PSA/ENVI-Carb Cleanup Tube 1, 12 mL	50	55230-U
PSA/ENVI-Carb Cleanup Tube 2, 12 mL	50	55233-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 μ m	1	28471-U
30 m x 0.25 mm I.D., 0.50 μ m	1	28473-U
20 m x 0.18 mm I.D., 0.18 μ m	1	28564-U
20 m x 0.18 mm I.D., 0.36 μ m	1	28576-U
Analytical Solvents		
Acetonitrile, for pesticide residue analysis		34481

無償サンプルをご用意しています！

ご希望の方は、弊社テクニカルサポートまで

TEL : 03-5796-7330 FAX : 03-5796-7355 E-mail : sialjpsp@sial.com

牛の腎臓中の農薬の分析におけるマトリックスバックグラウンドの減少 および回収率の改善

Katherine K. Stenerson and Jennifer Claus jennifer.claus@sial.com

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レベル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親油性農薬は、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可能性があります。

肉から農薬を抽出する現在の方法では有機溶媒を使用する必要があるため、その結果、妨害となる不要な脂肪マトリックスも一緒に抽出されます。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) などの技術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¹²。

QuEChERS クリーンアップ充填剤

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe の頭文字をとった QuEChERS 法は、近年、残留農薬の分析の前処理として、果物、野菜および脂質のマトリックスの抽出および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た塩析効果を用います。精製は、以下のような充填剤を用いた分散型 SPE (dSPE) で完了します。

- **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用
- **カーボン:**
クロロフィルおよびカロテノイド類の除去用
- **C18:**
脂質および非極性成分の除去用

通常、脂質マトリックスを減らすには、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、脂肪および色素の除去用に開発されたものです。SupelTM QuE Z-Sep+ は、ひとつのシリカ粒径に 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 (-OH) 基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、牛の腎臓中の残留農薬の GC-MS 分析前の脂質成分除去について、Supel QuE Z-Sep+ を使用する効果を評価しました。PSA/C18 と比較します。牛の組織中によく見られる親油性農薬および防カビ剤 (有機塩素、ピレスロイド類、ジフェニル防カビ剤および農薬共力剤) を分析しました^{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、これを表 1 にまとめました³。農薬を添加腎臓抽出サンプルと非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、親油性農薬をそれぞれ 10 µg/mL となるようアセトニトリルで調整し混合したものを、50 ng/g になるようにサンプルに添加しました。

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 (Cat. No. 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 (Cat. No. 34481) 25 mL を加え、1 分間振とうする。
3. Acetate Extraction Tube (Cat. No. 55234-U) の内容物を加え、1 分間振とうする。
4. 5 分間遠心分離する。
5. 上澄み 3 mL を、クリーンアップチューブ、Z-Sep+ Cleanup Tube (Cat. No. 55296-U) あるいは PSA/C18 Cleanup Tube (Cat. No. 55229-U) に移す。
6. 1 分間振とうした後、3 分間遠心分離する。
7. 抽出物を GC-MS に直接注入して分析する。

マトリックス除去

フルスキャンモードで抽出物を分析し、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が、これはいずれの吸着剤によっても著しく減少しました。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、クリーンアップで著しく減少しています。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おさえ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の結果と同様、SIM モードで行った農薬添加サンプルの全イオンクロマトグラム (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が、マトリックス効果ははっきり見られます。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、ビフェントリンおよびベ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 より高い平均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せんでした。有機塩素やピレスロイド類のような親油性の農薬に対して、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減ら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減らし、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 フルスキャンデータによって分かりました。

図 1 GC-MS full scan chromatograms of beef kidney extract (a) with no cleanup (b) PSA/C18 cleanup (c) Z-Sep+ cleanup. All are on the same Y-scale.

column: SLB-5ms, 20 m x 0.18 mm I.D., 0.36 μ m (28576-U)
oven: 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)
inj. temp: programmed, 60 °C (0.28 min), 600 °C/min to 325 °C (5 min)
detector: MS
carrier gas: helium, 1 mL/min constant
injection: 10 μ L, PTV solvent vent, 100 mL/min vent flow at 0.28 min, 5 psi vent pressure
liner: 4 mm I.D. FocusLiner™ with taper

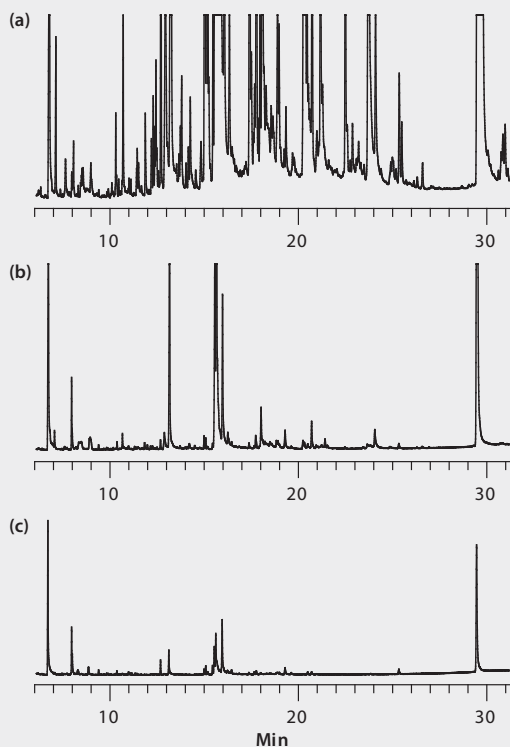


図 2 TICs of GC-MS/SIM Analysis of Pesticides at 50 ng/g in Beef Kidney Extract, Cleaned Using (a) Z-Sep+ and (b) PSA/C18.

Conditions same as Figure 1.

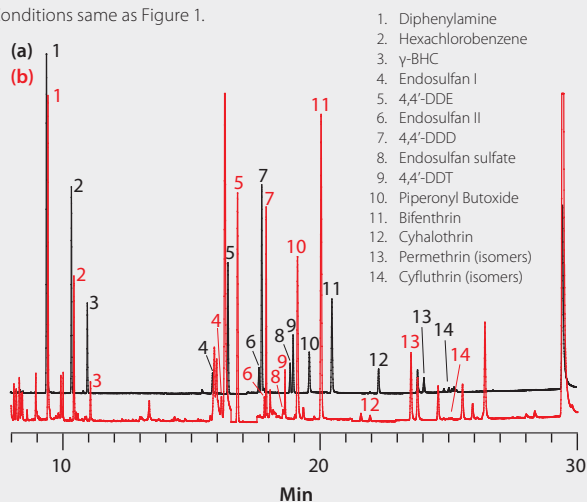


表 2 Average Pesticide Recoveries from Beef Kidney Spiked at 50 ng/g, Average of n=3 with (%RSD)

	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)

References

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. Leepipatiboon, *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 Products

Description	Cat. No.
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, 12 mL, 50 ea	55296-U
PSA/C18 Cleanup Tube, 12 mL, 50 ea	55229-U
SLB®-5ms Capillary GC Column	
20 m x 0.18 mm I.D., 0.36 μ m	28576-U
Analytical Solvent	
Acetonitrile, for pesticide residue analysis	34481

無償サンプルをご用意しています！

ご希望の方は、弊社テクニカルサポートまで

TEL : 03-5796-7330 FAX : 03-5796-7355 E-mail : sialjpsp@sial.com

オレンジ中の農薬残留物質の分析での色素除去

オレンジ抽出物のクリーンアップにおいて、吸着剤として Supel QuE Z-Sep/C18、PSA/C18 および PSA QuEChERS を、色素除去および農薬回収率の点で比較したところ、Z-Sep/C18 は PSA を含む両吸着剤より色素除去に優れ (図 3)、農薬回収率も同等もしくはそれ以上 (図 4) であることが分かりました。図 5 のクロマトグラムは、Z-Sep/C18 吸着剤でクリーンアップした農薬添加オレンジサンプルから抽出した 38 種の農薬の LC-MS/MS 分析結果です。これらの結果から、Supel QuE Z-Sep/C18 は、PSA を含む吸着剤の代替として使うことができ、困難なサンプルマトリックスにおける色素除去を改善できることが分かります。

図 3 Visual Comparison of Orange Extracts after Cleanup

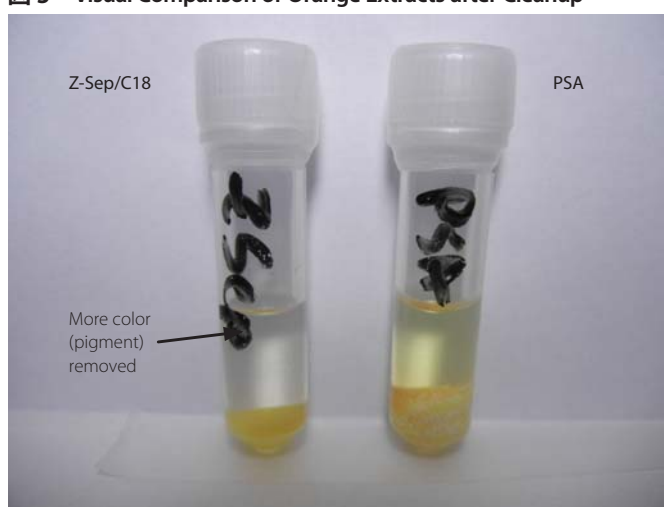


図 4 Average Recovery of Selected Pesticides from Spiked Oranges (n=3)

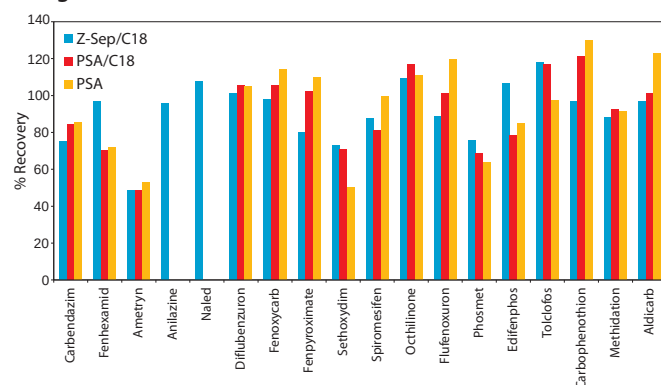


図 5 LC-MS/MS MRM Transition Chromatograms of a Spiked Orange Extract after Z-Sep/C18 Cleanup

sample/matrix: 10 g of pureed oranges (homogenized with rind); spike at 50 ppb (add 16.75 μ L of a custom-made pesticide mix, each analyte at 30 μ g/mL)

extraction: Add 10 mL acetonitrile; shake for 1 minute; add contents of a Supel QuE citrate extraction tube (55227-U); shake immediately for 1 minute; centrifuge at 3200 rpm for 5 minutes; transfer 0.7 mL of the acetonitrile layer into a Supel QuE Z-Sep/C18 cleanup tube (55284-U); shake for 1 minute; centrifuge at 5000 rpm for 5 minutes; transfer 0.2 mL of the supernatant into an empty 1.5 mL centrifuge tube; add 0.2 mL of water; centrifuge at 5000 rpm for 2 minutes

column: Ascentis Express C18, 5 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 μ m particles (53822-U)

mobile phase: (A) 10 mM ammonium acetate in water
(B) 10 mM ammonium acetate in acetonitrile

gradient: Hold at 30% B for 1 min; 30% to 80% B in 2 min; hold at 80% B for 4 min; hold at 100% B for 3 min; hold at 30% B for 3 min

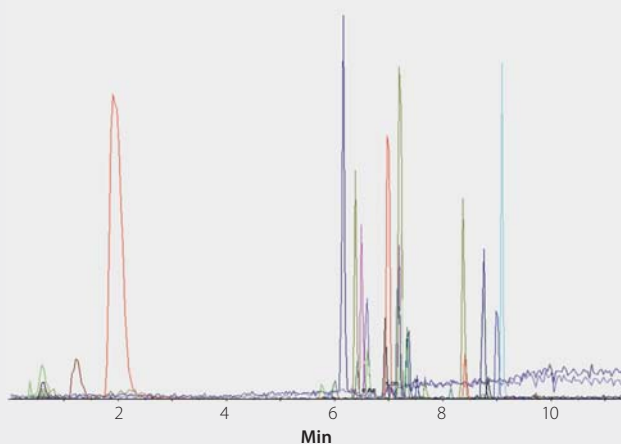
flow rate: 0.3 mL/min

pressure: 2730 psi

column temp: 30 $^{\circ}$ C

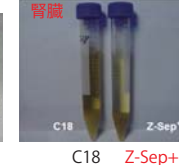
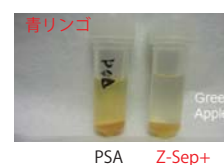
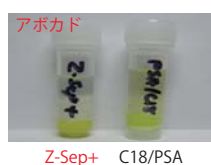
detector: MS/MS, ESI positive

- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1. Methomyl (0.60 min) | 20. Quinalphos (7.23 min) |
| 2. Trichlorfon (1.22 min) | 21. Edifenphos (7.28 min) |
| 3. Carbendazim (1.94 min) | 22. Etrifos (7.33 min) |
| 4. Aldicarb (2.70 min) | 23. Fenthion (7.34 min) |
| 5. Parathion-methyl (5.87 min) | 24. Fenitrothion (7.36 min) |
| 6. Methabenzthiazuron (6.16 min) | 25. Diazinon (7.37 min) |
| 7. Naled (6.37 min) | 26. Tolclofos (7.52 min) |
| 8. Methidathion (6.38 min) | 27. Phorate (7.53 min) |
| 9. Clethodim (6.42 min) | 28. Chlorpyrifos-methyl (7.67 min) |
| 10. Phosmet (6.50 min) | 29. EPN (7.68 min) |
| 11. Ametryn (6.58 min) | 30. Terbufos (8.14 min) |
| 12. Sethoxydim (6.61 min) | 31. Ethion (8.36 min) |
| 13. Anilazine (6.78 min) | 32. Lufenuron (8.40 min) |
| 14. Fenhexamid (6.94 min) | 33. Spiromesifen (8.74 min) |
| 15. Mecarbam (7.00 min) | 34. Octhilinone (8.74 min) |
| 16. Oryzalin (7.06 min) | 35. Pyraclostrobin (8.75 min) |
| 17. Diflufenuron (7.18 min) | 36. Carbophenothion (8.83 min) |
| 18. Fenoxycarb (7.19 min) | 37. Flufenoxuron (9.02 min) |
| 19. Iprobenfos (7.21 min) | 38. Fenpyroximate (9.10 min) |



Supel™ QuE Z-Sep による食品サンプルの色素除去効果

Z-Sep は 黄色～橙色～桃色の色素除去を得意とします。





QuEChERS 法用 dSPE CLEAN-UP TUBE

製品名 / 詳細		遠沈管サイズ	入数	CAT.NO.	価格 (¥)
Z-Sep	Z-Sep : 75 mg	2 mL	100	55411-U	19,800
	Z-Sep : 500 mg	12 mL	50	55403-U	17,900
Z-Sep+	Z-Sep+ : 75 mg	2 mL	100	55408-U	19,800
	Z-Sep+ : 500 mg	12 mL	50	55296-U	17,900
Z-Sep/C18	Z-Sep : 20 mg C18 : 50 mg	2 mL	100	55284-U	19,800
	Z-Sep : 120 mg C18 : 300 mg	12 mL	50	55401-U	19,800
Z-Sep/MgSO ₄	Z-Sep : 50 mg MgSO ₄ : 150 mg	2 mL	100	55417-U	19,800
	Z-Sep : 300 mg MgSO ₄ : 900 mg	12 mL	50	55407-U	19,800
Z-Sep+/MgSO ₄	Z-Sep+ : 50 mg MgSO ₄ : 150 mg	2 mL	100	55414-U	19,800
	Z-Sep+ : 300 mg MgSO ₄ : 900 mg	12 mL	50	55406-U	19,800
製品名 / 詳細			入数	CAT.NO.	価格 (¥)
充填剤					
Z-Sep (20 μ m, 120 Å, 350 m ² /g)			20 g	55418-U	40,200
Z-Sep+ (50 μ m, 70 Å, 480 m ² /g)			20 g	55299-U	40,200
関連製品					
50 mL 遠心分離用エンブティチューブ (抽出操作用)			50	55248-U	7,000

新発売



Z-SEP+ Z-SEP/C18 固相抽出管

ご希望の高かった Z-SEP+ Z-SEP/C18 のシリンジタイプ ついに発売

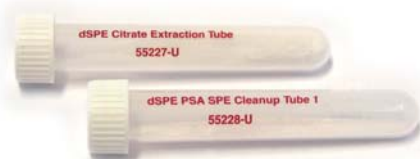
製品名 / 詳細	入数	CAT.NO.	価格 (¥)
Z-Sep +			
Z-Sep + : 500 mg	30	118LOT#118J399	42,400
シリンジサイズ : 6mL			
Z-SEP/C18			
Z-Sep (55418-U) 120mg と C18 (52600-U) 300mg のブレンド	30	118LOT#118J398	42,400
シリンジサイズ : 6mL			

製品名 / 詳細	入数	CAT.NO.	価格 (¥)
Z-Sep/HybridSPE-PL			
HybridSPE-PL(Z-Sep) : 30 mg シリンジサイズ : 1mL	100	55261-U	29,800
	200	55276-U	53,200
HybridSPE-PL(Z-Sep) : 500 mg シリンジサイズ : 6mL	30	55267-U	40,000

Z-Sep, Z-Sep+ の無償サンプルをご用意しています！

【例えば、脂肪・脂質が多いサンプルでお困りの場合に…】

- 残留農薬一斉分析の C18 代替
- アフラトキシン分析で多機能カラムやイムノアフィニティカラム負荷前の精製
- 色素（香辛料由来など）除去
- GPC の代替



ご希望の方は、弊社テクニカルサポートまで

E-mail : sialjpsp@sial.com

© 2015 Sigma-Aldrich Co. LLC. All rights reserved. SIGMA, SAFC, SIGMA-ALDRICH, ALDRICH, and SUPELCO are trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC, registered in the US and other countries. FLUKA is a trademark of Sigma-Aldrich GmbH, registered in the US and other countries. SAFC brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see product information on the Sigma-Aldrich website at sigma-aldrich.com. Ascentis, Discovery, SLB, and SPB are registered trademarks of Sigma-Aldrich Co. LLC. CHROMASOLV is a registered trademark of Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH. Supel is a trademark of Sigma-Aldrich Co. LLC. Fused-Core is a registered trademark of Advanced Materials Technology, Inc. Florisil is a registered trademark of U.S. Silica Company. FocusLiner is a trademark of SGE Analytical Science Pty Ltd.

本記載の製品および情報は2015年12月1日現在の情報であり、収載の品目、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。／最新の情報は、弊社Webサイト (sigma-aldrich.com/japan) をご覧ください。／掲載価格は希望納入価格(税別)です。詳細は販売代理店様へご確認ください。／弊社の試薬は試験研究用のみを目的として販売しております。医薬品原料並びに工業用原料等としてご購入の際は、こちらのWebサイト (sigma.com/safc-jp) をご覧ください。

SIGMA-ALDRICH®

シグマ アルドリッチ ジャパン

<http://www.sigma-aldrich.com/japan>

SAJ1932 2015.12

SIGMA-ALDRICH®