

Technical Report

トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた植物材料中の残留農薬分析

Residual pesticides analysis of botanical ingredients using gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry

北野 理基¹、小倉 泰郎¹、Nicole Lock¹、Robert Clifford¹、Julie Kowalski²、Jack Cochran²、Dan Li²

Abstract:

多くの国で消費されている様々な健康食品は、多種多様な植物材料から作られている。これらから品質を管理するために、使用されている植物材料中の残留農薬を検査する必要がある。しかしながら、使用される植物材料は乾燥しており、夾雑成分も多く含むことから通常の方法では分析が困難であることが知られている。本テクニカルレポートでは、改良を加えたQuEChERS法とGC-MS/MSを用いることで、高感度・高精度に定量分析が可能であることが分かった。

Keywords: 植物材料、QuEChERS、農薬、GC-MS/MS

1. はじめに

健康食品の消費量が年々増加しており、それらの材料となる様々な乾燥植物中の残留農薬を計測する必要性が高まってきている。しかしながら、一般的に用いられている前処理法QuEChERS¹⁾では、乾燥植物への適用が難しく、さらなる改善が必要となる。また、夾雑成分を多く含む分析では、ガスクロマトグラフィーが最適であり、トリプル四重極型質量分析計と組み合わせることにより、高感度で極微量の残留農薬までもも定量することが可能である。

本テクニカルレポートでは、通常のQuEChERS法に改善を加え、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS/MS) にて200成分以上の農薬一斉分析メソッドを用いて添加回収試験を行った。

2. 実験

農薬標準溶液、内部標準試料溶液、精度管理標準試料溶液およびQuEChERSキットは、すべてRestek社製を用いた。

- GC Multiresidue Pesticide Kit (Cat.#: 32562)
- GCMS Internal Standard Mix (Cat.#: 33267)
- SV Internal Standard Mix (Cat.#: 31206)
- Q-sep QuEChERS Extraction Kit (Original) (Cat.#: 23991)

農薬220、内部標準試料6、精度管理標準試料6成分の計232成分を測定対象とした。市場で購入可能な朝鮮人参をマトリックスとし、添加試料 (10、50 ng/gをそれぞれ2つずつ用意) とマトリックス検量線用標準試料 (1 ~ 200 ng/mL) を作成した。検量線はPCB52を用いた内部標準法とし、1/Cの重み付けを適用した。

MRMメソッドは、Smart Pesticides Database (Shimadzu) を用いて作成した。このデータベースには登録されている全成分に対して保持指標が登録されており、nアルカンのデータから保持時間を推測することが可能である (AART: Automatic Adjustment of Retention Time)。推測された保持時間を用いて、Smart MRM[®] が最適なデータ採取タイムプログラムを作成した (Fig. 1)。

2-1. 抽出・精製

- ▶ 1.0 ± 0.05 gの朝鮮人参パウダーを50 mLのポリプロピレン製チューブに秤量する
- ▶ HPLCグレードの水を10 mL加えて十分にボルテックスする
- ▶ 内部標準物質を加えた10 mLのアセトニトリルを加える
- ▶ 15分間静止させる
- ▶ 4 gの無水MgSO₄と1 gのNaClを加える
- ▶ シェイカーを用いて30分間攪拌する
- ▶ 3000–4500 rpmで5分間遠心分離する
- ▶ GCB/PSA (0.25 g/0.5 g) のSPEカラムのトップに約250 mgの無水Na₂SO₄を加えて、体積の3倍量のアセトンでコンディショニングする
- ▶ 15 mLのガラス遠心チューブをセットしたラックをSPE真空マニホールドに挿入する
- ▶ 1.25 mLのアセトニトリル抽出液をSPEカラムに加える
- ▶ 1 mLのアセトンで洗う
- ▶ 12 mLのアセトン/トルエン (3:1 v/v) で溶出する
- ▶ 50 °Cで100 μL以下になるまで濃縮する
- ▶ ブランクおよび添加試料にはトルエンを、マトリックス検量線用標準試料には各濃度の標準溶液を、それぞれ500 μL加える
- ▶ 20 μLの精度管理標準溶液 (12.5 μg/mL) を添加し、約50 mgの無水MgSO₄を加える
- ▶ 5秒間ボルテックスする
- ▶ 3000 rpmで5分間遠心分離する
- ▶ トルエン溶媒層をALS GCバイアルに移す



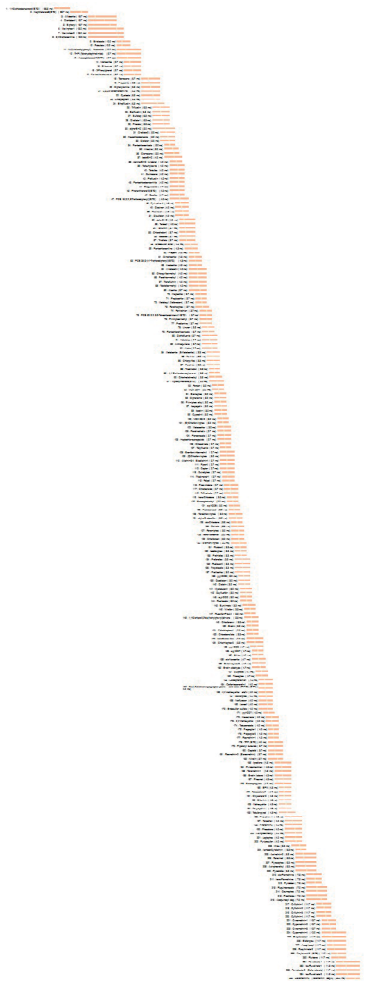


Fig. 1 Smart MRM®で作成された分析タイムプログラム

2-2. 分析条件

システム構成

GC-MS/MS	: GCMS-TQ8040 (Shimadzu)
オートインジェクタ、	: AOC-20i+20s (Shimadzu)
サンブラ	
カラム	: SH-Rxi-5MS 30 m×0.25 mm I.D., df = 0.25 μm (Shimadzu, P/N: 221-75940-30) + Rxi guard column 5 m×0.25 mm I.D. (Shimadzu, P/N: 227-36303-01)
ガラスインサート	: Sky Liner, Splitless Single Taper Gooseneck w/Wool (Restek, Cat.#: 23336.5)
ソフトウェア	: GCMSsolution Ver. 4.42

GC

注入口温度	: 250 °C
オープン温度	: 90 °C (1分) → (30 °C/分) → 130 °C → (10 °C/分) → 330 °C (2分)
トータルGC時間	: 24.33分
キャリアガスコントロール	: 線速度一定 (55 cm/秒)
注入モード	: Splitless with high pressure injection (250 kPa, 1.5分)
注入量	: 2 μL

MS

インターフェース温度	: 290 °C
イオン源温度	: 230 °C
イオン化法	: EI (イオン化電圧: 70 eV)
分析モード	: MRM (各化合物2トランジションを設定、 Table 1を参照のこと)
分解能	: Unit (Q1) – Low (Q3)
ループタイム	: 0.4 秒

3. 結果および考察

3-1. マトリックス検量線

Fig. 2に10 ng/mLのマトリックス検量線用標準試料のクロマトグラムを示す。230成分はAARTによって推定された保持時間に対して±0.1分以内に検出されており、低沸点から高沸点成分まで高精度に推定されていることが分かる。残りの2成分は精度管理用標準物質の1,4-Dichlorobenzene-d4およびNaphthalene-d8であり、これらは保持時間4分以内に溶出されるものである。使用する溶媒や注入量に影響しやすいものと考えられる。それでも、推定値の約±0.2分には検出されている。

検量線はマトリックス検量線用標準試料を用いて作成し、その

直線性と各検量点での検量線に対する逆計算値と理論値との差から評価した。逆計算においては、理論値から±20%を超えた場合は検量線から外して、近傍2点を用いて補完した。

最下点の1 ng/mLにおいて、全成分の93%が理論値の±20%以内の値を示した。20 ng/mL以上では、全成分において基準値内の値を示した (Fig. 3)。

今回用いた試料の前処理方法では、溶媒で希釈する手順が含まれている。Fig. 4に6成分の検量線を示す。低濃度においても高い直線性を示しており、全220成分においても寄与率は0.99以上を示した。

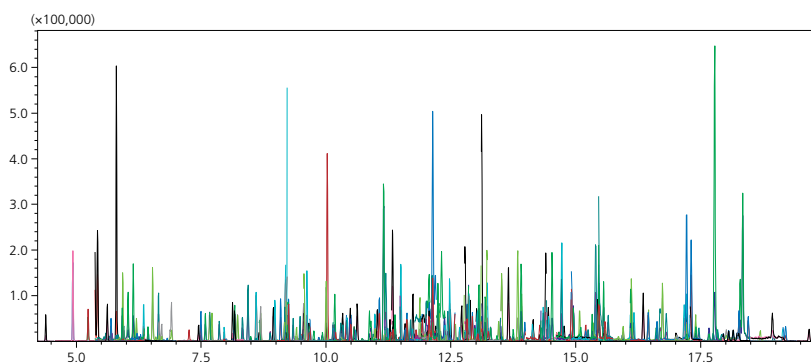


Fig. 2 10 ng/mLマトリックス検量線用標準試料のMRMクロマトグラム (内部標準および精度管理用成分は非表示)

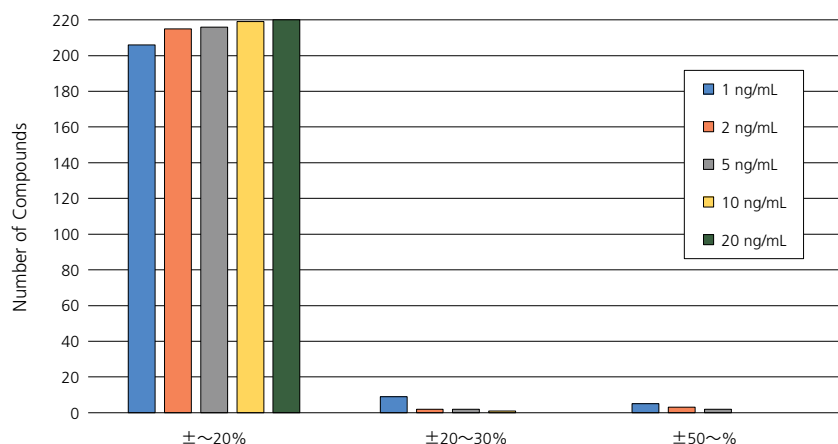


Fig. 3 各検量点における逆計算値と理論値との差の分布

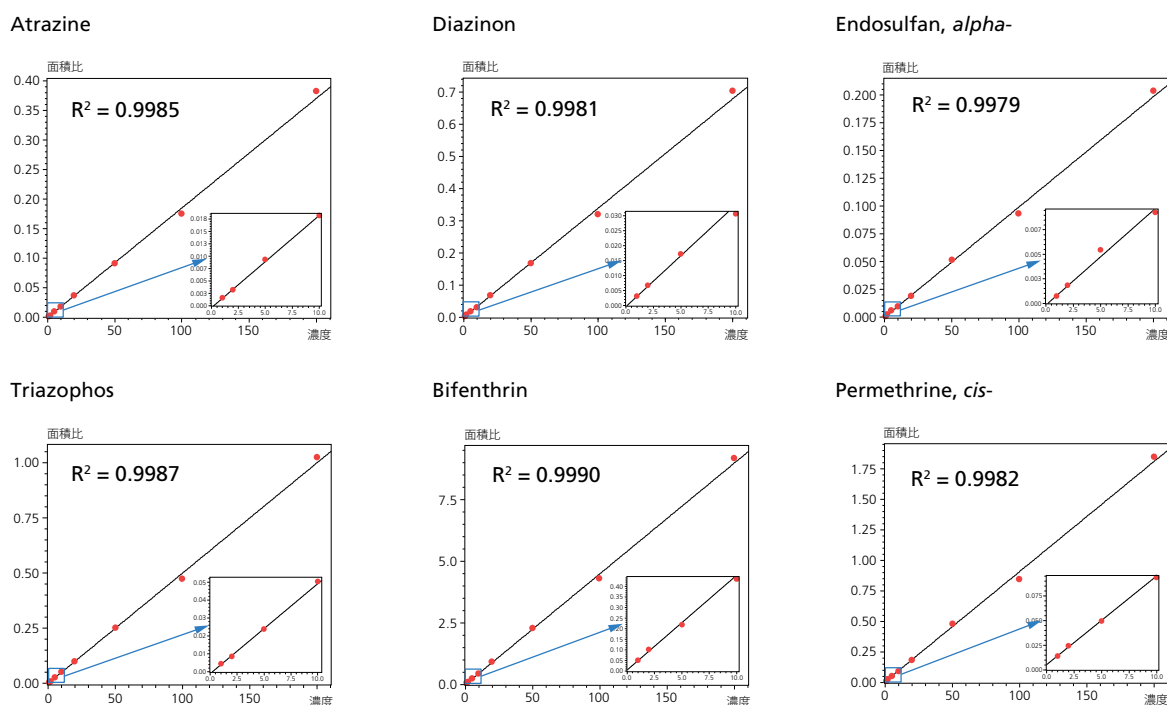


Fig. 4 代表的な6成分の検量線

3-2. 添加試料の回収率

10 ng/gおよび50 ng/gの添加試料をそれぞれ2つずつ用意し(10 ng/g-1、10 ng/g-2、50 ng/g-1、50 ng/g-2)、3回連続分析の平均値からそれらの回収率を算出した。

10 ng/g-1と50 ng/g-2に関しては、全成分の85%において良好な回収率(70~120%)が得られた。既述の通り、添加試料はそれぞれ2.5 ng/mLと12.5 ng/mLに希釈されているが、低濃度領域でも良好な直線性が得られている検量線と、SPEカラムでの精製を加えたQuEChERS法によって、夾雑物が大幅に除去されることにより、高精度な定量分析が可能であった。(いくつかの農薬に関しては、マトリックス自体に含まれていたことから、正確な定量値を算出することができなかった。検量線の定数項が大きくなることから、特に微量濃度域で誤定量を引き起こす原因となった。標準添加法から算出したところ、16成分が10 ng/g以上の濃度で

含まれていた。)

本テクニカルレポートでは、これらの回収率を定性情報となる相対確認イオン比と組み合わせて再確認した。確認イオン比は、100 ng/mLの標準試料のデータを基にSANCO/12571/2013²⁾の基準に応じて確認した。ここでは相対比±30%が推奨値とされており、その値を採用した。

Table 1に全成分の回収率と相対イオン比を、Fig. 5にはこのテーブルの回収率と相対イオン比を組み合わせたマップ図を示す。10 ng/g-1においては、全成分の76%が回収率(70~120%)と相対イオン比(±30%)共に良好な結果が得られた。50 ng/g-2においては、それらが83%となった。ここで、回収率が低かった成分/高かった成分および相対イオン比が基準値外であった成分について考察した。

回収率、相対イオン比共に基準値を外れた成分を4つのグループに分けることができた (Fig. 5)。

グループAは回収率が低かった成分で構成されている。主に低沸点成分で構成されており、濃縮過程で揮発した可能性が高い。グループBは、相対イオン比が高くなった成分群である。マトリックスからの夾雑の影響であると考えられる。グループCは回収率が120%を超えた成分群である。ここは10 ng/gの添加試料のみ

で構成されており、マトリックス自体に農薬が含まれていたため、感度・精度が低かったために正確に定量値が算出されなかったものである。グループDは相対イオン比が-30%を下回った成分で構成されている。感度がより高いトランジションの選定が必要である。試料の前処理方法、分析メソッドを見直すことで、これらの成分の各値が改善し、赤い四角の中へと近づけることが可能だろう。

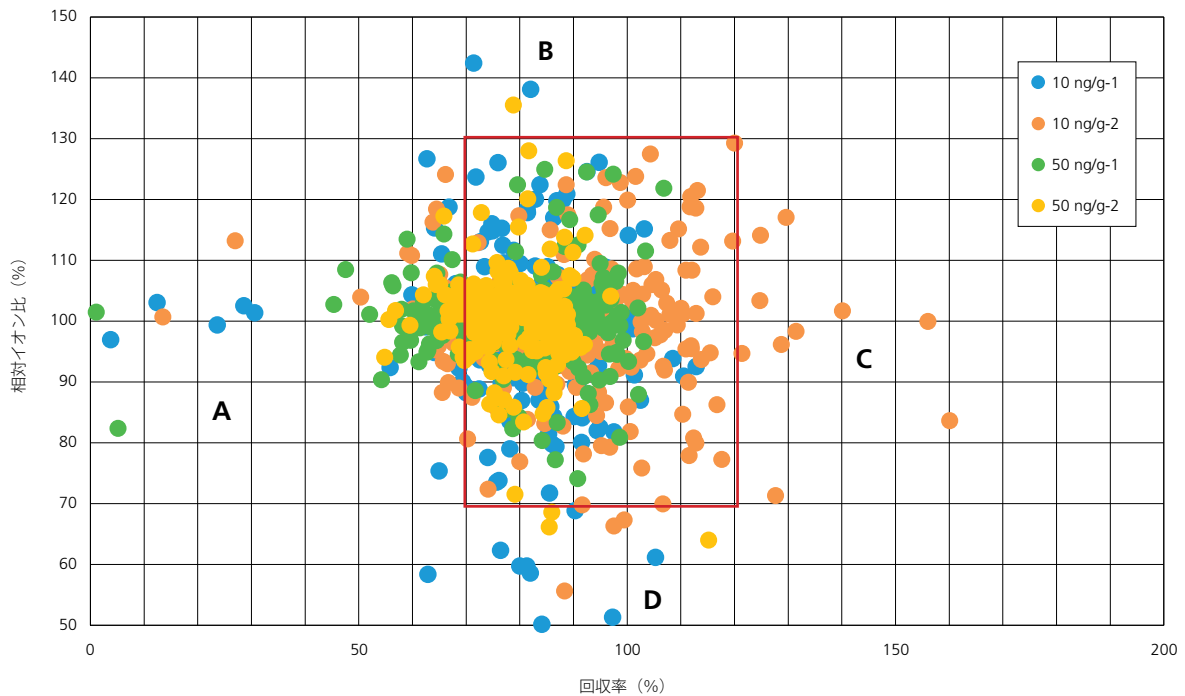


Fig. 5 回収率と相対イオン比によるマップ図 (赤色の四角は回収率が70~120%、相対イオン比が±30%共に満たす範囲を示す)

4. 結論

改良を加えたQuEChERS法とGC-MS/MSを用いることで、植物材料においても着実な残留農薬分析が可能であることが分かった。

乾燥植物は夾雑物が多く、微量の残留農薬分析は困難だと考えられてきた。今回、SPEカラムを用いた精製と溶媒希釈によって、夾雑物の影響を可能な限り抑えることができた。さらに、GC-MS/MSにより、希釈された極微量の農薬も高感度・高精度に検出することができた。加えて、このGC-MS/MSの分析時間は30分以下で200成分以上の農薬をカバーしており、高いスループットメソッドを提供することが可能である。

参考文献

- 1) M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck 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.*, **86** (2003) 412-431
- 2) European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013

トリプル四重極型 ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040

日常の分析を飛躍させるSmart性能

多種多様な試料に含まれるさまざまな化学物質を微量まで測定する場合、GC-MS/MSによる測定が有効ですが、多くのパラメータ設定や適切なメソッドの作成が必要になります。GCMS-TQ8040では、煩雑なメソッドの作成作業を自動化し、高感度な多成分一斉分析を可能にしたことで、生産性を飛躍的に向上させます。



Smart Productivity

- 新しいファームウェア・プロトコルを搭載
- より多くの化合物を高感度・高精度に一斉分析
- Twin Line MSシステムによりカラム交換作業を軽減

Smart Operation

- Smart MRMによる最適なメソッドを自動作成
- 最適なトランジションを自動探索
- AART機能による保持時間自動修正

Smart Performance

- 特許技術の高感度イオン源により、更なる高感度化を実現
- OFF-AXISイオン光学系によりノイズを低減
- シングルGC-MSとしても高感度分析可能

GC/MS残留農薬分析用データベース

Smart Pesticides Database Ver. 2

GC-MS (/MS) による食品中残留農薬530成分の分析をサポート

Smart Pesticides Databaseは、農薬530成分の保持指標、トランジションが登録されたデータベースです。Ver. 2では、SIMモードの測定イオンを追加登録しているため、SIMとMRMの両方の測定モードに適用することができます。

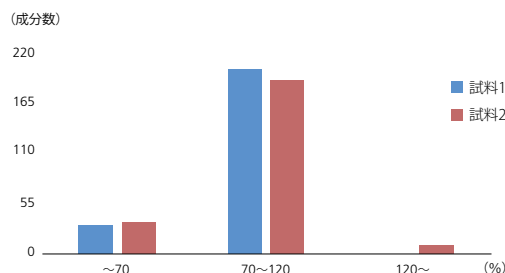
データベースの保持指標とAART機能により、農薬標準試料を使用することなく自動で保持時間を修正できます。さらにSmart MRM/SIM機能により、MRM、SIMモードの多成分一斉分析に最適な測定プログラムを自動で作成できます。

また、データベースはGC条件の変更や新規成分の追加などのカスタマイズが可能です。

化合物名 (J)	保持指標 1	保持指標 2	保持指標 3	イオン1				イオン2				イオン1			イオン2		
				タイプ	m/z	CE	比率	タイプ	m/z	CE	比率	タイプ	m/z	比率	タイプ	m/z	比率
ヒタガール	1201	1193	1191	T	99.0>71.0	8	100.00	Ref.1	99.0>54.0	26	6.13	T	99.0	100.00	Ref.1	71.0	18.40
アジチン	1240	1231	1229	T	141.0>95.0	8	100.00	Ref.1	141.0>79.0	22	31.28	T	141.0	100.00	Ref.1	94.0	337.84
ジカドホス	1248	1244	1243	T	109.0>79.0	8	100.00	Ref.1	185.0>93.0	14	56.91	T	185.0	100.00	Ref.1	109.0	403.23
特効殺菌	1285	1284	1274	T	149.1>71.1	8	100.00	Ref.1	149.1>102.1	6	67.94	T	70.0	100.00	Ref.1	149.0	51.20
アトカド	1290	1288	1283	T	132.1>56.0	8	100.00	Ref.1	138.1>96.0	6	26.15	T	138.0	100.00	Ref.1	173.0	6.98
ジカドホス	1348	1345	1335	T	170.9>136.0	14	100.00	Ref.1	170.9>100.0	24	98.06	T	171.0	100.00	Ref.1	173.0	76.00
EPTC	1359	1358	1353	T	189.1>128.1	4	100.00	Ref.1	189.1>86.0	12	22.96	T	128.0	100.00	Ref.1	189.0	25.60
ジアエチ	1393	1391	1380	T	154.1>128.1	22	100.00	Ref.1	154.1>115.1	24	74.03	T	154.0	100.00	Ref.1	153.0	37.60
アトカド	1394	1393	1390	T	188.2>72.0	4	100.00	Ref.1	188.2>173.2	4	72.45	T	58.0	100.00	Ref.1	129.0	2.40
アトカド	1420	1420	1419	T	127.0>109.0	12	100.00	Ref.1	192.0>127.0	12	61.12	T	127.0	100.00	Ref.1	192.0	31.60

健康食品を使用した添加回収試験により 有効性を確認済み

健康食品についてデータベースと推奨の前処理キット、前処理プロトコル、認証標準物質を使用して、農薬220成分の添加回収試験を実施したところ、8割以上の成分で良好な回収率が得られました。健康食品は夾雑物が多く含まれますが、データベースには夾雑物との分離を考慮したトランジションが登録されているため、夾雑物の影響を最小限に抑えることができます。さらに、対象農薬のピークが夾雑物のピークと重なった場合でも、異なるカラムを使用して分析することによりピークを分離できます。Twin Line MSシステムとあわせて使用することにより、MSの真空を停止することなくスムーズに異なるカラムで分析できます。



健康食品試料 (2検体) に農薬標準試料を最終濃度が2.5 ng/mL になるように添加した場合の回収率の分布

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2016年11月
© Shimadzu Corporation, 2016