

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

## アプリケーションノート

食品検査・農業

### 著者

Limian Zhao and Derick Lucas  
Agilent Technologies, Inc.

### 要約

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



**Agilent Technologies**

## はじめに

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

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

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

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

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

## 実験方法

すべての試薬と溶媒は、HPLC または分析グレードのものを使用しました。アセトニトリル (ACN) およびメタノールは Honeywell (マスキゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。試薬グレードの酢酸 (AA) は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。農業標準および内部標準は Sigma-Aldrich および AccuStandard (ニューヘブン、コネチカット州、米国) から購入しました。

## 溶液および標準試料

10 mL の酢酸を 990 mL の ACN に加えて 1 % AA を含むアセトニトリルを調製しました。標準原液および内部標準 (IS) 原液は 2.0 mg/mL の ACN またはメタノール中に一部の農業用に作成しました。残りの農業標準は市販の混合標準原液で、標準作業用溶液を調製するために直接使用しました。混合作業溶液は 25 µg/mL の ACN 溶液として調製しました。25 µg/mL の TPP IS 作業用溶液は ACN 溶液として調製しました。

## 機器

サンプル前処理法用に使用した機器および材料は以下のとおりです。

- ジェノグラインダー (SPEX、メアチエン、ニュージャージー州、米国)
- Centra CL3R 遠心管 (Thermo IEC、マサチューセッツ州、米国)
- エッペンドルフ小型遠心管 (Brinkmann Instruments、ウエストベリー、ニューヨーク州、米国)
- Vortexer およびマルチチューブ Vortexer (WWR、ラドナー、ペンシルベニア州、米国)
- ボトルトップ型ディスペンサ (WWR、サウスプレインフィールド、ニュージャージー州、米国)
- エッペンドルフピペットおよびリピーター
- Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid 分散キット (部品番号 5982-1010) および Agilent Bond Elut for QuEChERS EMR Lipid 脱水キット (部品番号 5982-0101)

## 使用機器

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

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

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

## 機器条件

### HPLC 条件

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

### MS 条件

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

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

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

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

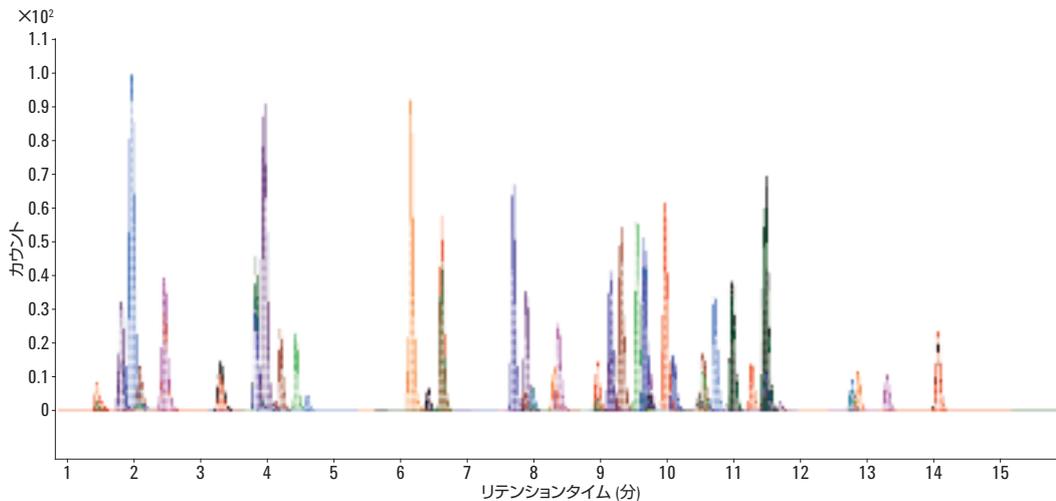


図 1. 50 ng/g の農薬を添加し QuEChERS で抽出した後、Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid でクリーンアップしたアボカドサンプルの典型的な LC/MS/MS クロマトグラム (MRM)

## サンプル前処理

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

1. ホモジナイズしたアボカド 15 g ( $\pm 0.1$  g) を計量し、50 mL 遠心管に入れる
2. アセトニトリル (1% AA) 15 mL を加え 10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌する
3. QuEChERS AOAC 抽出キットを 1 パッケージを加える
4. 振とう機で 2 分間混合する
5. 5,000 rpm で 5 分間遠心分離する
6. 水 5 mL を 15 mL EMR Lipid 分散キットに加える
7. 上澄み 5 mL を EMR Lipid 分散キットに移す
8. 直ちにボルテックスミキサーで攪拌してサンプルを分散した後、さらに 60 秒間マルチチューブ Vortexer にかける
9. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
10. 上澄み 5 mL を塩 (1:4、 $\text{NaCl}:\text{MgSO}_4$ ) 2 g を含む 15 mL EMR Lipid 脱水キットに移し 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌する
11. 5,000 rpm で 3 分間遠心分離する
12. ACN 層の上部 200  $\mu\text{L}$  と水 800  $\mu\text{L}$  を 2 mL のサンプルバイアルで混合しボルテックスミキサーで攪拌する

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

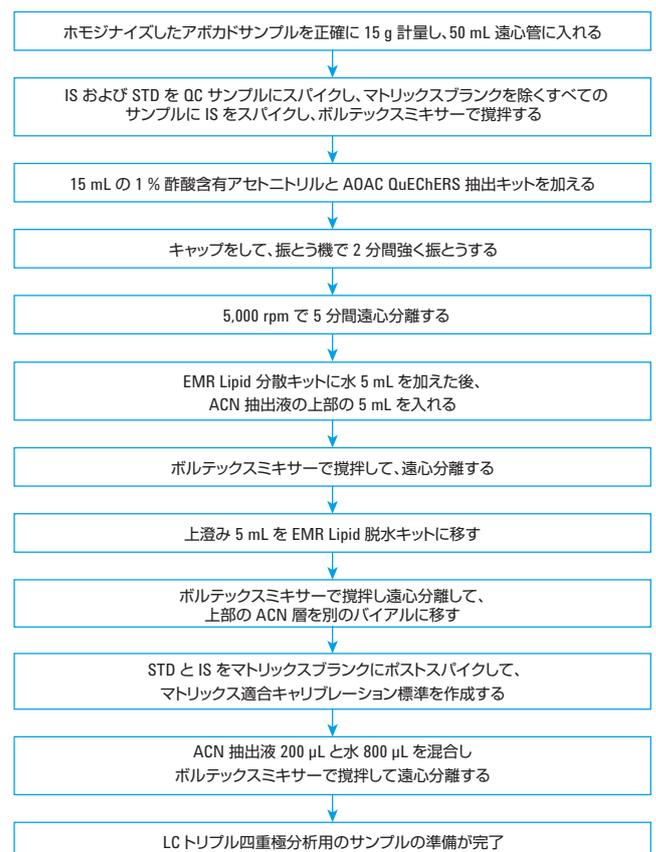


図 2. アボカド中の農薬の分析のための Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid を使用したサンプル前処理手順

## キャリブレーション標準と品質管理サンプル

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

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

## 共溶出量の測定

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

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

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

## マトリックス効果の評価

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

## メソッドの比較およびバリデーション

現在、QuEChERS メソッドは、アボカドなどの高脂質サンプルでのクリーンアップ用に PSA、EC-C18、MgSO<sub>4</sub> を含む高脂質対応 dSPE を推奨しています。また、ジルコニア充填剤は、C18/PSA dSPE よりも脂質除去においてより効率的とされています。今回のメソッド比較では、EMR Lipid クリーンアップ手法と他のクリーンアップ手法に焦点を当てました。回収率データはアボカド中の 50 ng/g 相当のプレスパイクサンプルとポストスパイクサンプルを比較しました。抽出は AOAC QuEChERS 手順を実行し、次に EMR Lipid、C18/PSA dSPE、ジルコニア充填剤の各クリーンアッププロトコルにより dSPE を実行しました。EMR Lipid クリーンアップの場合、図 2 に示されたプロトコルに従いました。EMR Lipid dSPE は従来の dSPE 充填剤とは異なり、材料を活性化するために水を添加する必要がありますが、マトリックス除去性能が大幅に向上しています。EMR Lipid からの上澄みを EMR Lipid 脱水キットに移し、ACN/水を相分離し、溶解固形分を除去します。QuEChERS と C18/PSA およびジルコニアクリーンアップの場合は、未処理の ACN 抽出液 1 mL を高脂質対応の 2 mL dSPE チューブ (p/n 5982-5122) または 100 mg のジルコニア充填剤を含む 2 mL バイアルに移しました。次にサンプルを 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌して小型遠心機により 13,000 rpm で 3 分間遠心分離しました。上澄み 200 µL を水 800 µL を含むサンプルバイアルに移しました。C18/PSA dSPE およびジルコニア充填剤のクリーンアッププロトコルでは双方ともこの段階で沈殿物が生じ、サンプルを LC/MS/MS 分析の前に再生セルロース 0.45 µm フィルタバイアルでろ過する必要があります。沈殿の原因は、高脂質対応の dSPE およびジルコニアクリーンアップでは除去されなかった脂質によるものと考えられます。EMR Lipid による未処理の抽出液クリーンアップのケースではこの沈殿はなく、希釈することにより沈殿のない透明な溶液を得ることができました。このため、ろ過は必要ありませんでした。マトリックスキャリブレーションサンプルを調製するために、対応するマトリックスブランクでポストスパイクキャリブラントを作成することは重要です。回収率は、プレスパイクサンプルとポストスパイクサンプルでの対象化合物のピーク面積の比によって計算しました。

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

## 結果と考察

### 共溶出の量

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

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

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

マトリックス共溶出の除去効率 (%)

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

### マトリックス効果の評価

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

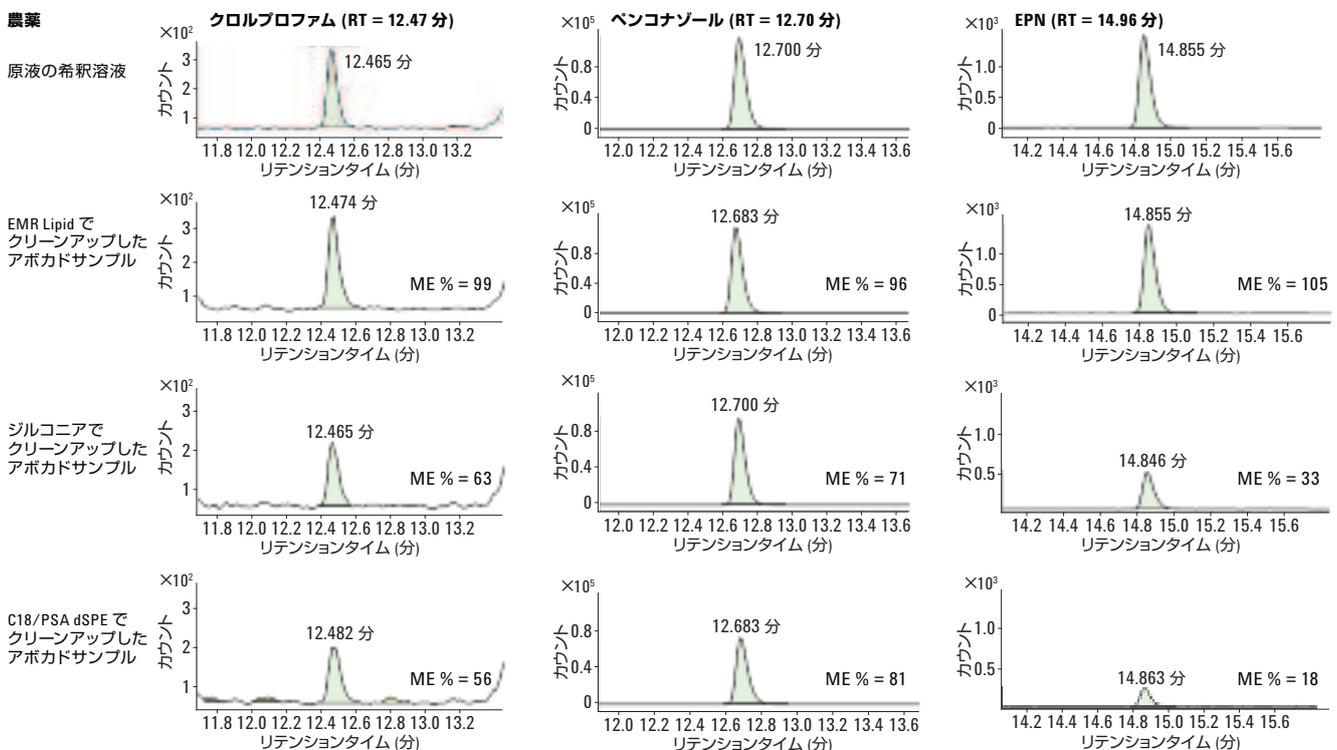


図 3. 疎水性物質でのマトリックス効果の比較マトリックスサンプルはマトリックスブランク内の農薬標準によって 50 ng/g でポストスパイクしました。

## 分析対象物の回収率についてのメソッドの比較

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

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

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

## メソッドバリデーション

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

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

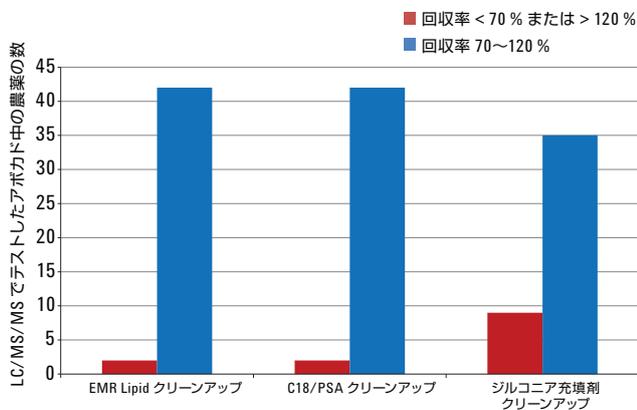


図 4. Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid、C18/PSA dSPE、ジルコニア充填剤の比較のための回収率の統計結果

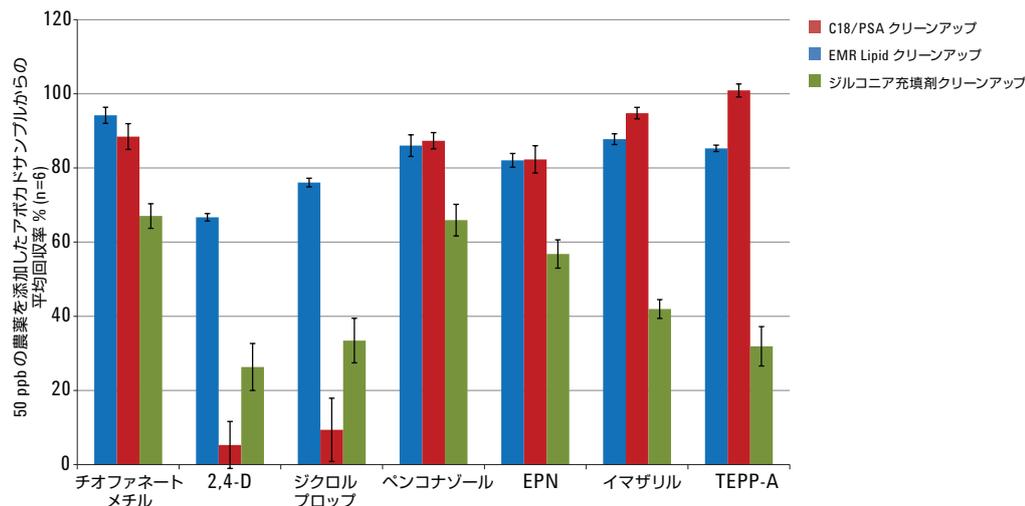


図 5. Agilent Bond Elut EMR Lipid (青)、C18/PSA (赤)、ジルコニア充填剤 (緑) での dSPE クリーンアップの回収率の比較結果

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

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

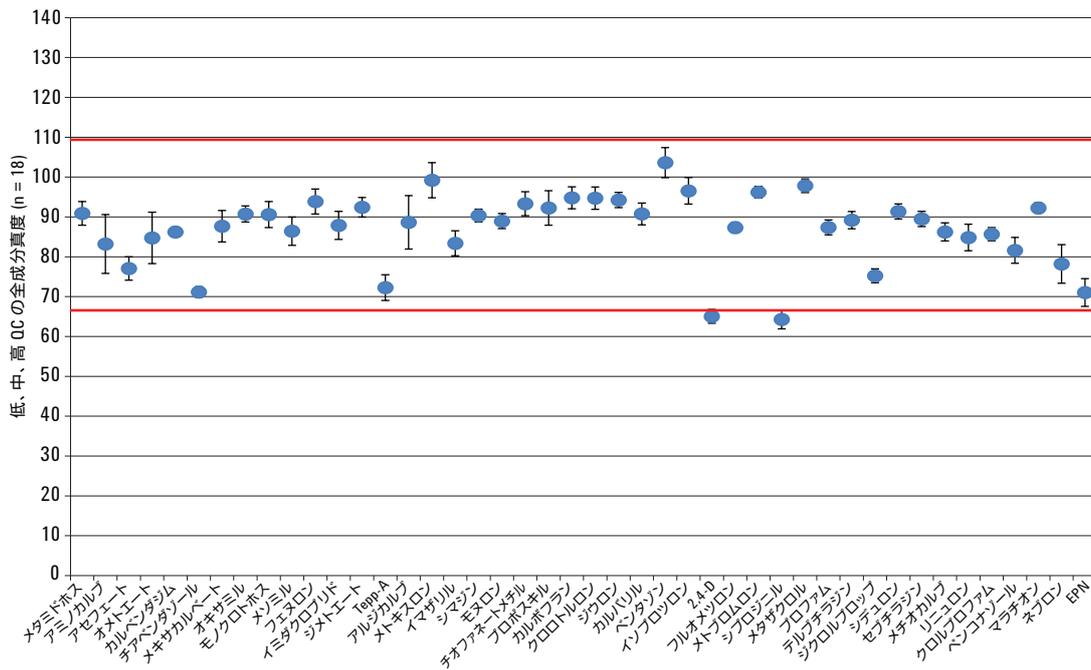


図 6. Agilent Bond Elut QuEChERS EMR Lipid ワークフローによるアボカド中の 44 の代表的な農薬の定量結果真度と精度のデータは、3 つの異なる濃度で合計 18 回繰り返した定量を基に計算されました。

## 結論

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

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

## 参考文献

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

## 詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

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

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

©Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

August 4, 2015

5991-6098JAJP



**Agilent Technologies**