

食品および環境サンプルに含まれる高極性農薬の安定的かつ高感度な非誘導体化一斉分析法

Wim Broer¹, Ugo Chiuminato², Jianru Stahl-Zeng², Daniel McMillan³ and Phil Taylor³ 98

1. Nofalab Laboratories, Schiedam, NL; ² SCIEX, Darmstadt, DE; ³ SCIEX, Warrington, UK

高極性農薬分析の課題

食品および環境サンプル中の農薬の定量において、LC-MS/MS による残留農薬一斉分析法の使用が長年にわたり着実に増加しており、これらの領域に関連するほぼ全ての検査機関において、この方法は今や必要最低条件とみなされています。最新のタンデム四重極質量分析計では、QuEChERS 等の最小限のサンプル調製で、このような規制された化合物を非常に低濃度で検出することができるため、多検体中の多成分の迅速な分析が可能となっています。しかし、非常に極性の高い化合物の中には、抽出方法やクロマトグラフィーが適用できない、あるいは十分にイオン化しないものもあるため、そのような残留農薬成分のためのメソッドとして、時間のかかる前処理と分離を追加する必要が生じ、さらに検出感度を向上させるために多くの場合、誘導体化を必要とします。



関心の高まり

近年、グリホサートの残留に対する人々の関心の高まりに伴い、食品、飼料および環境中のグリホサートおよびその代謝物の分析がより一層求められているため、効率的で安定的な分析メソッドへのニーズがますます高まっています。これらの化合物の抽出およびクロマトグラフィーは EURL-QUPPE 法に明示されていますが、実際の分離は安定性が低いいため、システムおよびメソッドの徹底したメンテナンスが必要です。HPLC または HILIC をベースとするいくつかのメソッドでは、再現性および感度の問題に対処することが不可能であるため、グリホサート、AMPA およびグルホシネートには、多くの場合、分析前の FMOC 誘導体化が使用され続けています。この方法を自動化することは可能ですが、時間がかかる上に高価であり、しかも他の極性農薬には適用できません。

ハイスループットメソッドの作成

NofaLab は、オランダのロッテルダム近郊を拠点とする独立したサンプリングおよび検査機関であり、食品、飼料および環境安全を専門としています。迅速な定量分析を提供することへのプレッシャーの高まりから、NofaLab は LC-MS/MS 装置のポートフォリオの強化および 1 回の分析でできる限り多くの極性農薬をカバーできるメソッドの開発に乗り出しました。分離にはイオンクロマトグラフィーが有用であることが示されていますが、イオンクロマトグラフィーに必要なサプレッサーは質量分析には好ましくなく、またほぼ常時稼働している質量分析計のインレットシステムを交換することは非効率的であり、逆相 LC を中心として使用している多忙な検査機関においては実現が困難です。

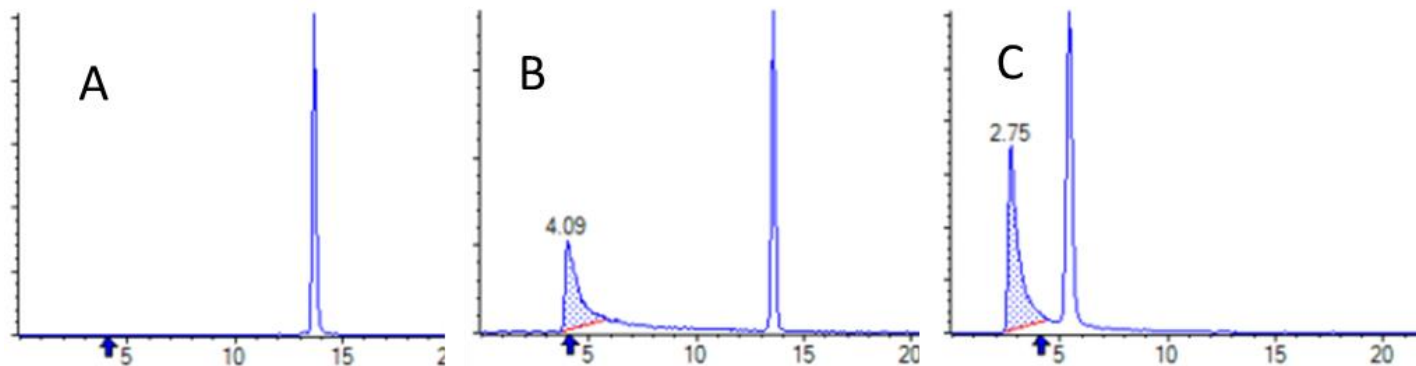


図 1 設置、コンディショニング、繰り返し、最後に交換 Aは、設置直後の分析に推奨されているカラムの状態が示されています。グリホサートのピークは存在しません。Bは、ホウレン草抽出物を30回注入してコンディショニングした後の同じカラムの性能が示されています。グリホサートのピークが4.09分に検出されています。Cは、A、Bと同一カラムで100回注入した後のグリホサートの保持時間(RT)の変化が示されています。

そこで、ここに示す最終メソッドでは、質量分析に適した pH 9 付近の移動相を用いたメソッド・スイッチング逆相(RP)システムの LC カラムを使用しました。この条件により、グリホサートの良好な保持、他の化合物やマトリクス妨害物質との分離が得られ、質量分析による理想的な検出が可能となりました。この方法は、再現性(<20%)および回収率(80~110%)に関する DG-SANTE¹ 基準を満たしており、LOD は 0.01 mg/kg を下回っています。QUPPE 法により抽出した食品サンプルに関する本法の検証を通して、優れた長期安定性および頑健性が達成されました。

環境サンプルの検査では、規定の検出限界濃度はさらに低く、保持時間の短い従来の分析法ではマトリクスによる妨害がより大きな問題となるため、誘導体法が唯一の選択肢でした。しかし、ここに示す新しい分析法ではグリホサートが良好に保持されるため、この方法をさらに発展させて大容量の直接注入法を開発できないか、SCIEX と共同研究を行い検討しました。グラジエント条件を改良し注入のパラメーターを最適化することにより、環境水サンプル専用の第 2 の方法が開発されました。大容量注入(LVI)は、例えば、移動相の蒸発のため、pH 変化の影響をより受けやすいと考えられますが、良好な頑健性が維持されており、食品サンプルのメソッドと同一の化合物を 0.02 ng/L 未満の LOD で検出できました。

実験における留意事項

食品サンプル

Anastassiades et al. CVUA Stuttgart²において開発された、植物および動物起源サンプルからの高極性農薬の QuPPE 抽出法は、十分に確立された方法であり、数回の改良が行われています。化合物が水溶性であるため、水抽出をベースとしており、効率を改善するためにメタノールやギ酸が添加されています。

内部標準の添加は、殆どのクロマトグラフィーにおいて保持時間のずれを補正するために必要であり、マトリクス効果が存在する場合にはその相殺に役立ちます。これは、クロマトグラフィー性能の低下や MS のイオンソースの汚れ、感度の急速な低下が起きやすい、穀物および種子サンプルにおいては特に重要です。QuPPE-AO3 法に記載されている分散的 C18 クリーンアップを検討し、最終的に SPE フィルターを使用する 2 種類の吸着剤によるブッシュスルー法を採用しました。

様々なクロマトグラフィーメソッドを検討した結果、いくつかの欠点が明らかとなりました。イオンクロマトグラフィーを用いて、分析前に通常行われるコンディショニング後、通常 30 回~50 回程度サンプル注入するのに対し、比較的少ない注入回数で実施した結果が図 2 です。この図から、ピーク形状および保持時間を維持するためにはイオンクロマトグラフィーが最も有望であることが示されました。しかし、溶離液が ESI のイオンソースに適合しないため、サプレッサーの使用が必要であり、その結果、ピーク幅に好ましくない影響が現れます。しかし、四級アンモニウム基を有するポリビニルアルコールをベースとするカラムと重炭酸アンモニウム緩衝液を使用すること、また、非常に高感度の四重極質量分析計で検出することにより、サプレッサーを使用する必要がなくなりました。

表 1 メソッドの検証に使用した食品マトリクスの一覧

検証した食品の一覧

A	果物および野菜
B	種子
C	植物油、脂肪および脂肪酸
D	穀物
E	薬草および香辛料
F	食肉および海産物
G	動物油、脂肪および脂肪酸
H	卵および卵製品
I	乳および乳製品
V	脂肪酸

様々な食品マトリクス(表 1)について、前述のクリーンアップを行い、メソッドの検証を実施しました。10 μ L の注入では、性能は安定的で再現性がありましたが、約 200 回のサンプル注入後にピーク形状が悪化し始め、350 回目の注入では内径 2 mm のカラムの容量限度のため、ピークが著しく変形していました。最終のクロマトグラフィーメソッドでは 150 x 4 mm のカラムを使用し、カラムと同一の充填剤を有するガードカラムと 0.5 μ m のフィルターを 250 サンプル毎に交換して使用することにより、性能を維持すると同時に質量分析計のイオンソースの汚染を防ぎました。

水サンプル

環境水サンプルおよび飲料水サンプルには、様々な濃度で微粒子が含まれているため、LC での注入が困難になり、再現性に好ましくない影響を与えます。しかし、ハイスループットを必要とする検査機関では最小限のサンプル調製が望ましく、SPE タイプのクリーンアップは時間とコストを著しく増大させる可能性があります。これらの課題を解決するために、サンプルを LC バイアルに移す際に、17 mm シリンジフィルター (Chromacol 17-SF-02 (RC)) を用いて、簡単なる過ステップを行うことにしました。内部標準を最終濃度が 1 ppb となるようにサンプルおよび標準品に添加し、水道水中の QC サンプルも同様の方法により調製しました。マトリクス効果のあらゆる可能性を検討するために、サンプルへ標準品を添加した試験も行いました。

分離には、LC-30AD ポンプ、SIL-30AC オートサンプラー、500 μ L サンプルループ、および CTO-20A カラムオープンで構成された Shimadzu Nexera UHPLC システムを使用しました。クロマトグラフィーメソッドの注入容量は、食品サンプル用に使用したものに近い 500 μ L としました。メソッド検証の主な目的は、すべての化合物について

安定したピーク形状および保持時間を達成することとしました。ループサイズ(注入容量に関係なく)、初期条件、グラジエントおよび移動相の pH は極めて大きな影響を与えるため、最終的な最適メソッドは固定される必要があり、移動相も定期的に新しく調製する必要があります。

メソッド検証は実際の飲料水サンプルを使用して行い、AMPA およびグリホサートのいずれにおいても 20 ng/L の LOQ を達成することができました。

MS-MS 分析

SCIEX QTRAP® 6500+質量分析計を使用して、負イオンモードのエレクトロスプレーイオン化による分析を行いました。すべてのサンプルにおける各化合物の濃度を定量および確認するために、表 3 に示すように、各化合物に関して 2 種類以上の MRM トランジションの最適化を行いました。データは Analyst® 1.6.3 を使用して取得し、データ処理は MultiQuant™ 3.0.2 ソフトウェアを用いて、内部標準法による定量および確認を行いました。

表 2 SCIEX QTRAP® 6500+システムのイオンソースパラメータ

イオンソースパラメーター

カーテンガス(CUR)	30 psi
コリジョンガス(CAD)	9 psi
イオンスプレー電圧(IS)	-3000 v
温度(TEM)	500°C
イオンソースガス(GS1)	55 psi
イオンソースガス(GS2)	65 psi

表 3 化合物および使用した MRM トランジション一覧（本メソッドには内部標準が極めて重要であり、その使用は不可欠です。）

化合物	Q1 m/z	Q3 m/z
グリホサート 1	167.9	150.0
グリホサート 2	167.9	78.8
グリホサート 3	167.9	62.8
エセホン 1	142.9	106.8
エセホン 2	142.9	79.0
N-アセチルグルホシネート 1	222.0	136.0
N-アセチルグルホシネート 2	222.0	62.8
N-アセチルグルホシネート 3	222.0	59.1
AMPA 1	110.0	81.2
AMPA 2	110.0	79.1
AMPA 3	110.0	62.9
グルホシネート 1	180.0	136.0
グルホシネート 2	180.0	95.0
グルホシネート 3	180.0	85.0
グルホシネート 4	180.0	63.1
3-MPPA 1	151.0	132.9
3-MPPA 2	151.0	107.0
3-MPPA 3	151.0	63.1
ホスホン酸 1	81.0	62.9
ホスホン酸 2	81.0	79.0
クロレート 1	82.8	67.1
クロレート 2	84.8	69.2
ホセチルアルミニウム 1	108.9	80.9
ホセチルアルミニウム 2	108.9	62.9
グルホシネート IS	183.0	63.0
グリホサート IS	171.0	63.0
AMPA IS	112.0	63.0
エセホン IS	147.0	111.0
ホセチルアルミニウム IS	114.0	82.0
3-MPPA IS	154.0	63.0
クロレート IS	88.9	70.9
ホスホン酸 IS 1	87.0	85.0
ホスホン酸 IS 2	87.0	67.0

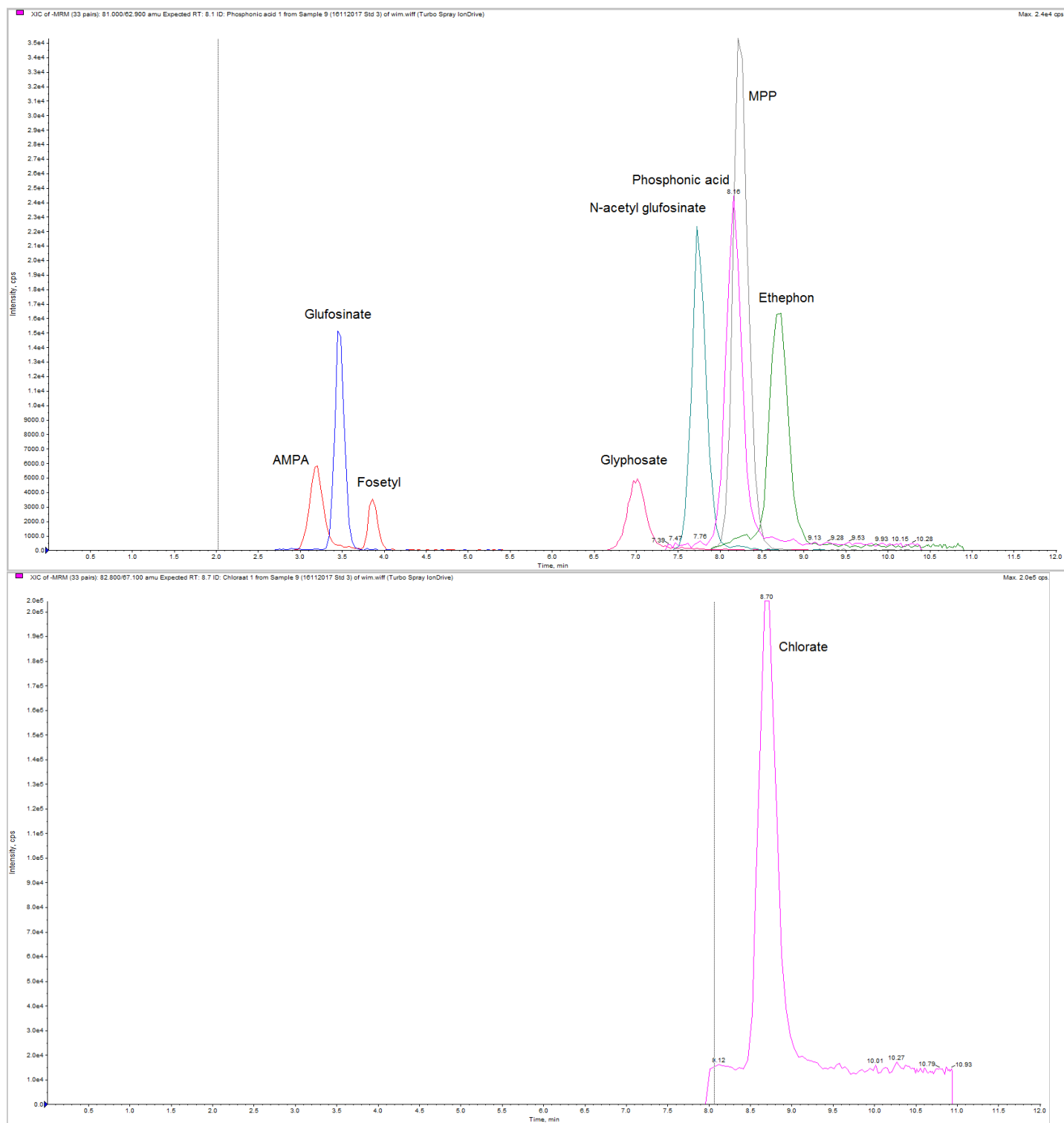


図 2 高極性農薬のクロマトグラム例 本 NofaLab メソッド使用のクロマトグラム例(穀物サンプル)

結果および考察

食品サンプル

食品サンプルの QuPPE 抽出物用の NofaLab メソッド、および水サンプル用の改変メソッドを使用したクロマトグラフィーのどちらも、化合物間および妨害マトリクスからの良好な分離が得られました。加えて、ピーク形状および保持時間について優れた再現性も達成しました。

食品サンプル中のこれらの化合物に関する EU の残留農薬基準の上限値は、作物および化合物により $10 \mu\text{g/kg}$ ~ $2000 \mu\text{g/kg}$ の範囲にあるため⁴、各化合物に関して目標値は異なります。水の規制に関しては現在議論が進行中ですが、将来の規制を考慮すると、環境サンプルにおいては 20 ng/L の検出限界が望ましいと考えられます。

化合物とマトリクスのいくつかの組み合わせは分析が困難であることが明らかとなりましたが、メソッド検証ではすべてのサンプルに関してこれらの目標濃度が容易に達成されました。NofaLab では、様々な作物由来の 1000 を超える食品サンプルの分析を実施しました。この分析法は、システムのメンテナンスを必要とせずに実施することができ、保持時間、ピーク幅、ピーク面積およびテーリングに関して安定性が極めて優れていることが明らかとなりました。図 5 には、各項目についてグリホサート IS の再現性の結果が示されています。

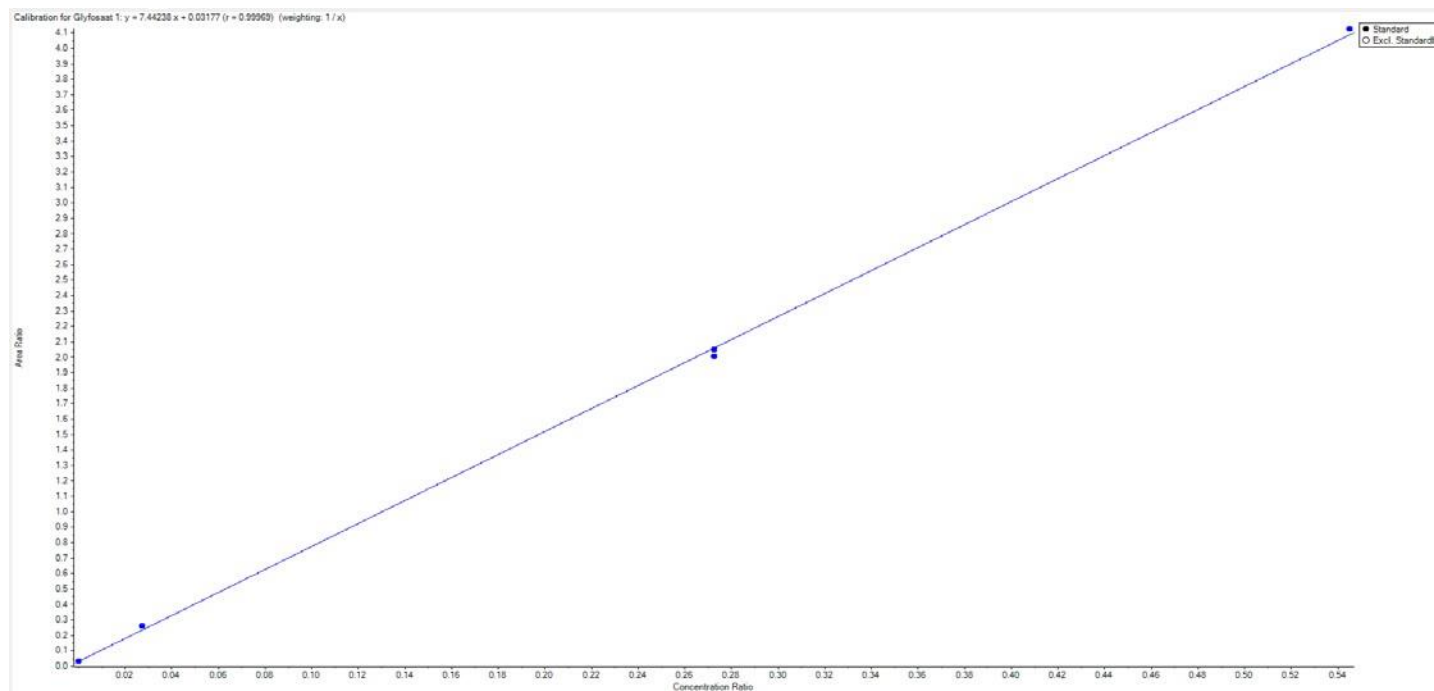


図 3. グリホサートの検量線

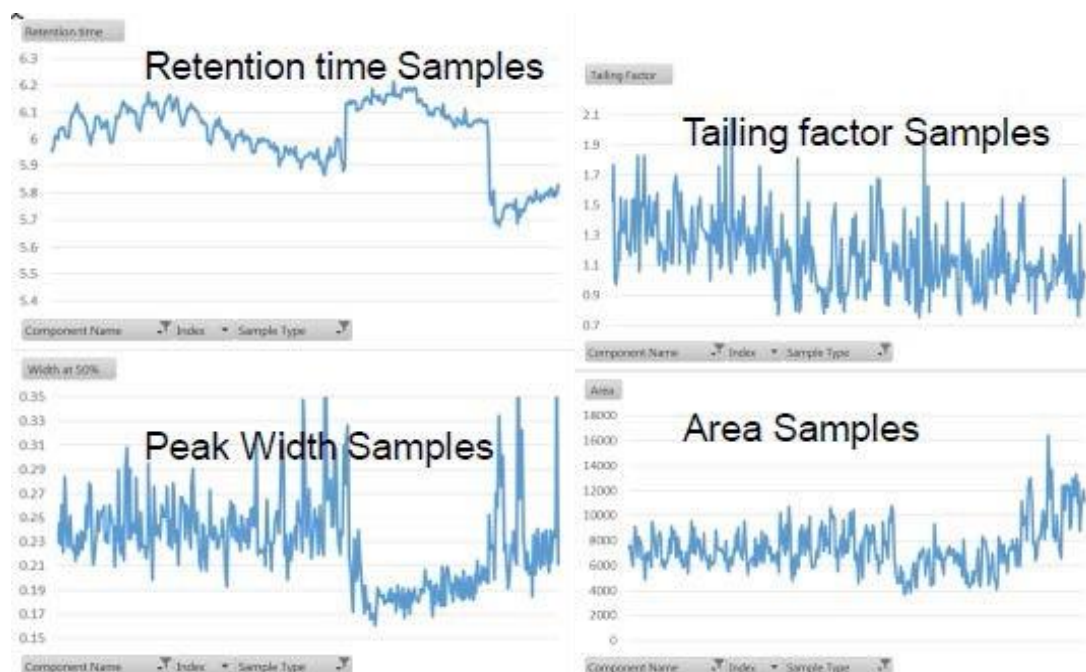


図 4. グリホサート IS の再現性データ 食品サンプル用の NofaLab メソッドによる、果物／野菜、種子、植物油／脂肪、穀物、薬草／香辛料、食肉／海産物、動物油／脂肪、卵／卵製品、乳／乳製品およびその他の脂肪酸の抽出物の 1000 回以上の再現性結果。

食品	全グルホシネート			全ホセチルアルミニウム			グリホサート			クロレート			エセホン		
	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL
果物および野菜	16	30	11%	25	2000	13%	5	100	15%	8	10	15%	18	50	11%
種子	12	30	12%	90	2000	15%	8	100	15%	3	10	10%	6	50	14%
植物油、脂肪および脂肪酸	15	30	19%	40	2000	12%	7	100	22%	2	10	6%	3	50	7%
穀物	18	30	12%	71	2000	14%	8	100	7%	7	10	14%	9	50	6%
薬草および香辛料	25	100	8%	87	2000	13%	23	100	6%	8	10	15%	8	100	16%
食肉および海産物	19	30	15%	23	100	12%	9	50	23%	4	10	8%	4	50	10%
動物油、脂肪および脂肪酸	14	30	20%	51	100	11%	9	50	25%	10	10	16%	7	50	12%
卵および卵製品	18	30	12%	33	100	11%	4	50	13%	12	10	9%	6	50	17%
乳および乳製品	17	30	9%	20	100	6%	8	50	22%	5	10	12%	5	50	13%
脂肪酸	21	100	14%	70	1000	14%	3	100	18%	4	10	9%	3	100	10%

表 4. NofaLab メソッドによるを用いた各種食品マトリクスの検出限界(LOD) (EU の残留農薬基準の上限値(MRL)¹ も記載)

水サンプル

環境水サンプルの目標感度を達成するためには、サンプル量を増やして注入することが必要であったため、注入容量の増加および異なるループサイズの使用を検討しました。容量が増える毎にループ内の溶離液の組成が変化するため、分析の初期条件並びに化合物の保持時間およびピーク形状が変化します。これを補正するためには移動相の初期組成を変更することが必要となりましたが、パラメーターが完全に確立された最終メソッドは、食品サンプル用の NofaLab メソッドと同等の安定性および頑健性を示しました。すべての化合物は良好に保持され、妨害物質となる可能性のあるバックグラウンド化合物の大部分が溶出した後に検出することができました。化合物を明確に同定できるほど十分な化合物間の分離も得られ、保持時間には再現性がありました。環境水に添加した標準品の感度は、標準品のみ感度と同等であり、実際の飲料水サンプルにおいても、目標検出限界である 20 ng/L が容易に達成されました。結果を検証するために、ターゲット化合物の標準品添加試験も行いました。

食品サンプル抽出物用の NofaLab メソッドおよび水サンプルの直接注入用の改変メソッドのいずれにおいても、マトリクスの影響は殆ど受けませんでした。しかし、非常に複雑なサンプルマトリクスでは、MRM イオン比が正常の $\pm 20\%$ 許容範囲外となる場合もありました。QTRAP[®]の使用がプロダクトイオンスペクトルによる陽性結果の確認に有用であると考えられますが、今後はバックグラウンド妨害物質を除去するためのクリーンアップ方法の変更または追加を検討する予定です。

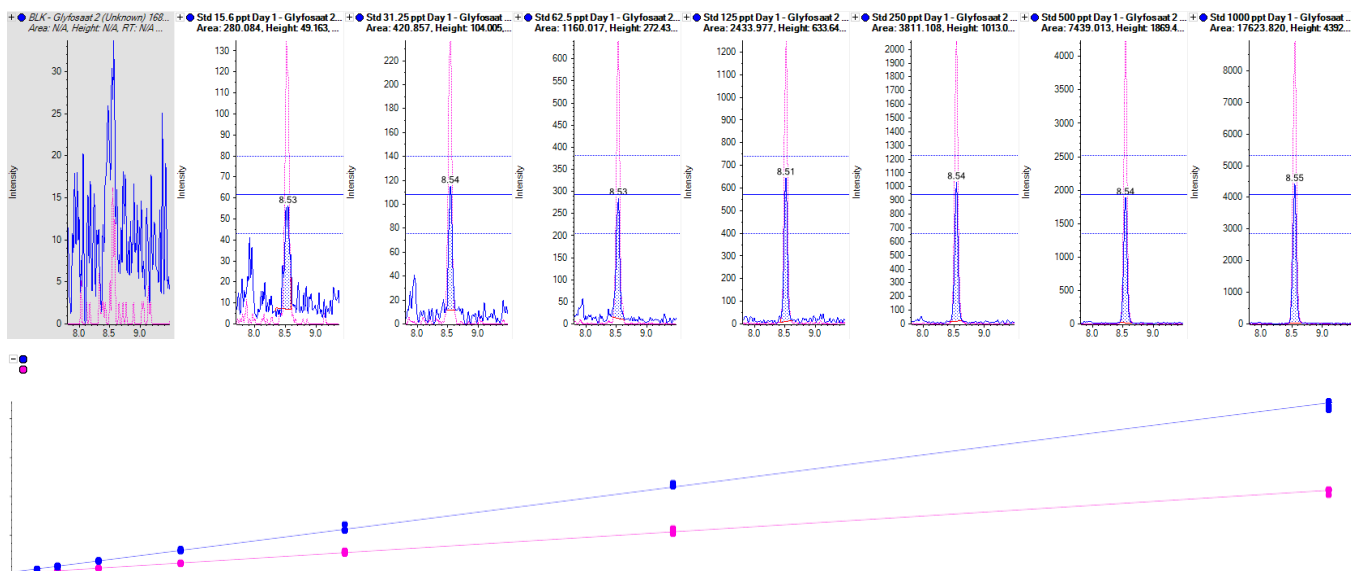


図 5. グリホサートの感度と直線性 水サンプル用の改良メソッドを用いて、15.6ng/L ~ 1000ng/L の範囲でグリホサート標準品による検量線を作成しました。イオン比は全て、規定である $\pm 20\%$ の範囲内に収まっています。

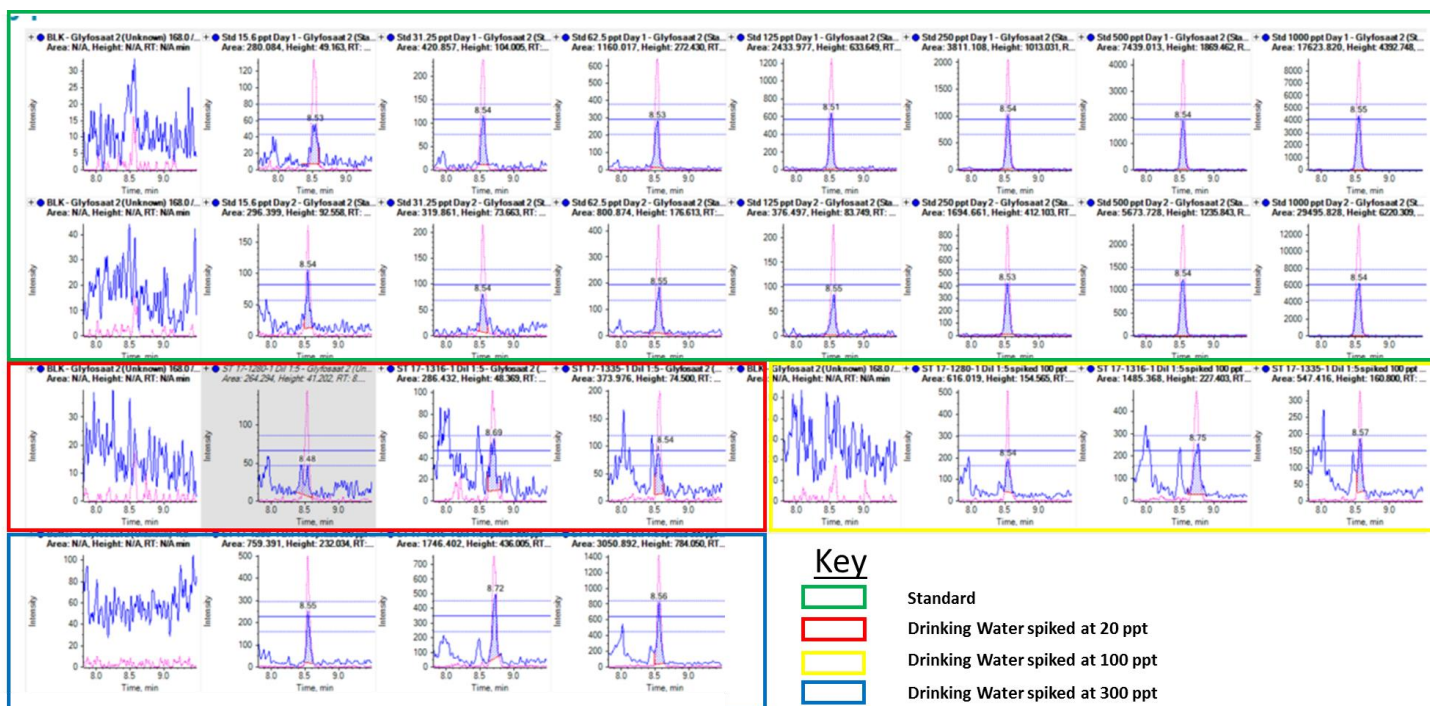


図 6. 水サンプル用の改変メソッドを使用した飲料水サンプルのクロマトグラム例

結論

ここに示した高極性農薬の分析のためのイオンクロマトグラフィーにより、誘導体化を必要とせずに 1 回の注入で複数の化合物を検出することが可能となります。従来とは異なる LC の移動相を使用することにより、質量分析計による検出が可能となり、さらに SCIEX 6500+ QTRAP[®] 質量分析計の高い感度のおかげで、イオンサプレッサーを必要とせずに標準的な逆相 LC ベースのシステムを使用して分析が行えました。このため、一般的な農薬の分析間でインレットを交換する必要がなくなり、ハイスループットを必要とする検査機関においてサンプル効率の管理や稼働費用を少なく抑えることが可能となります。システムのメンテナンスも予想範囲を超えることなく、約 250 サンプルのインジェクション後にガードカラムを交換することが必要なだけでした。

ここに示したメソッドは、様々な文献に記載されている他の方法よりも極めて安定的で高感度であり、現行の規制や提案されている将来の規制を満たすのに必要な検出限界目標を達成しています。殆どのサンプルで、分離によりマトリクスによる妨害が最小限に抑え

られることが示されましたが、今後は、非常に複雑なマトリクス中においても検証可能な結果を達成するために、クリーンアップの改善の可能性を検討する予定です。

参考文献

1. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/glyphosate_en
2. http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPPE.pdf
3. <http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN>
4. http://ec.europa.eu/environment/archives/ppps/pdf/ma_reding_annex4.pdf
5. [Glyphosate and AMPA in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality](#)

本製品は研究用にのみ使用できます。診断目的及びその手続き上での使用はできません。

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2018 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

Document number: RUO-MKT-02-7221-A MKT02-663A



株式会社 エービー・サイエックス

本社: 〒140-0001 東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー21F
TEL: 0120(318)551 FAX: 0120(318)040

大阪: 〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎3-19-3 ピアスタワー3F

www.sciex.jp Email: jp_sales@sciex.com