

## SFC/UHPLC ハイブリッドシステムを用いた残留農薬一斉分析



### Authors

安田 恭子

山下 和之

澤田 浩和

アジレント・テクノロジー  
株式会社

### 要旨

Agilent Infinity Lab SFC/UHPLC ハイブリッドシステムと Agilent 6470 トリプル四重極検出器を用い、農薬の一斉分析を行いました。その結果、SFC、UHPLC どちらのシステムを用いても、1ng/mL 濃度の農薬が検出できました。また茶とオレンジのマトリックス効果を検証した結果、夾雑物の影響を受ける農薬の種類が異なることが分かりました。これにより、SFC/UHPLC ハイブリッドシステムを使用する事で農薬一斉分析における偽陽性ピークの検証やメソッド開発に有効であると思われる。

Key words: SFC、トリプル四重極検出器、残留農薬分析、QuEChERS

## 目的

平成18年に施行されたポジティブリスト制度の導入により、農作物中残留農薬分析は測定対象農薬が増加しています。その迅速な結果報告の必要性から、QuEChERS法と呼ばれる簡便な前処理法とトリプル四重極質量分析計を用いた一斉分析法が広く使用されています。一方、簡便な前処理を使用する事でイオンサプレッション/エンハンスメントが問題となる事もあります。

超臨界流体クロマトグラフィ (Supercritical Fluids Chromatography, SFC)は最近注目を集めているクロマトグラフィ技術の1つです。SFCとLCの分離を比較すると、化合物の溶出挙動は全く異なります。この特性から、SFCとLCでは異なるマトリックス効果を示すことが予測できます。

そこでこのアプリケーションノートでは、SFC/UHPLCハイブリッドシステムを用い、農薬の一斉分析を行いました。SFC/UHPLCハイブリッドシステムとは、標準のSFCシステムにバルブとポンプを追加することで、SFCとUHPLCの分離を同一システムで行うことができる装置のことです。流路の詳細については図1に示しました。

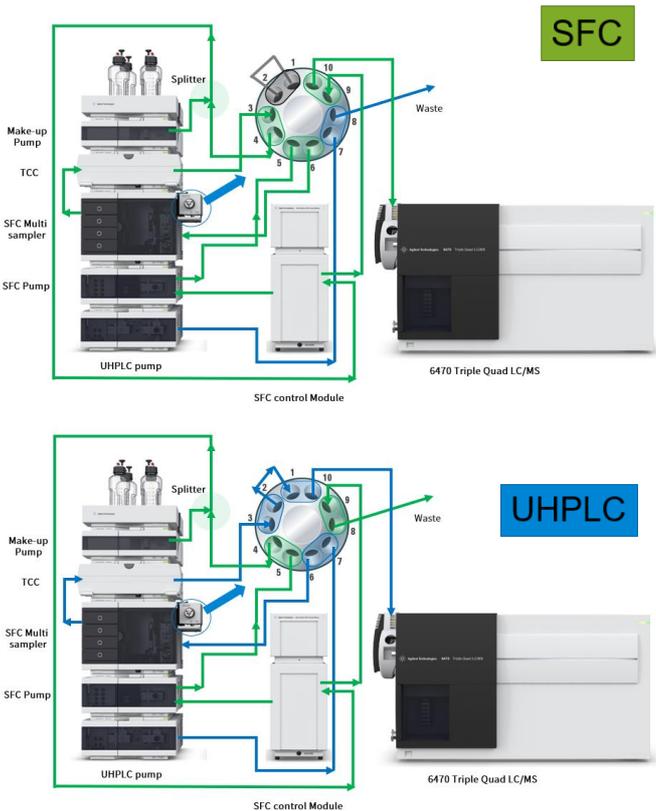


図1 SFC/UHPLCハイブリッドシステムの概要

## 試料前処理および分析条件

### 試料前処理

標準物質はLC/MSによる農薬等の一斉試験法 I (農産物) に対応する林純薬社製のPL2005農薬LC/MS Mix 4、5、6、および7を使用しました。マトリックスは市販の茶とオレンジを使用しました。茶は7.5gをQuEChERS抽出用の50 mL遠沈管に計量後、15 mLの蒸留水を添加して湿らせたものを、オレンジは皮ごと粉碎してQuEChERS抽出用の50 mL遠沈管に15 g計量したものを抽出用試料としました。前処理法はQuEChERS AOAC2007.01法(以下AOAC法)で抽出を行ない、分散固相抽出は陰イオン交換充点剤であるPSA(プライマリセカンダリ アミン)とC18を組み合わせたものと、これにさらにグラファイト カーボン ブラック(以下GCB)を追加したものの2通りを行ないました。試料前処理のプロトコルは図2にまとめました。

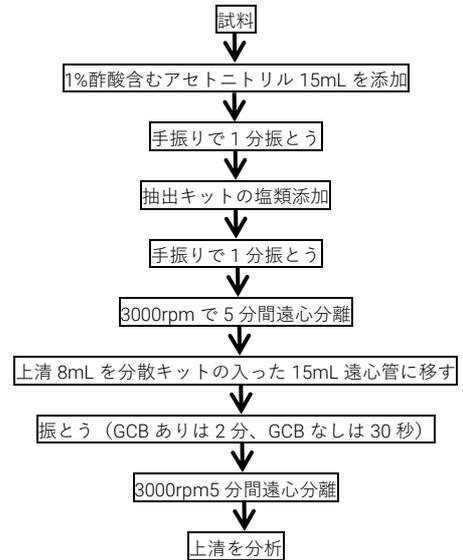


図2 前処理

表1 抽出、分散固相抽出に使用したキット

	内容	チューブ	P/N
AOAC 法 抽出キット	6 g 硫酸 Mg、1.5g 酢酸 Na	50mL	5982-5755CH
分散固相 抽出キット	400 mg PSA <sup>1</sup> 、400 mg C18、1200 mg 硫酸 Mg	15mL	5982-5198CH
	400 mg PSA <sup>1</sup> 、400 mg C18、1200 mg 硫酸 Mg、400 mg GCB <sup>2</sup>		5982-5456CH

<sup>1</sup> PSA：プライマリ セカンダリ アミン

<sup>2</sup> GCB：グラファイト カーボン ブラック

### 分析条件

測定に使用した機器は表2にまとめました。SFC/MSの測定においては、カラムから出た移動相をメイクアップ溶液と混合し、BPR (Back Pressure Regulator)を経由してからトリプル四重極検出器に導入しました。

SFCではZorbax NH2カラム (4.6×150mm, 5 μm) を、UHPLCではEclipse Plus C18 RRHD (2.1×100mm, 1.8 μm)をそれぞれ用いました。分析時間はSFCでは12分、UHPLCでは30分としました。そのほかの分析条件は表3にまとめました。

表2 機器一覧

型番	装置名
G6470A	トリプル四重極 MS 検出器
G4301A	1260 Infinity II SFC コントロールモジュール
G4767A	1260 Infinity II SFC マルチサンプラ
G4782A	1260 Infinity II SFC バイナリポンプ
G7116B	1290Infinity II マルチカラムサーモスタット
G7111B	1260 Infinity II クオータナリポンプ (メイクアップポンプ)
G7120A	1290 Infinity II バイナリポンプ (UHPLC ポンプ)
G1170A	1290 Infinity バルブドライブ
G4232B	2-position/10-port バルブ (ハイブリッドシステム用)

表3 分析条件

パラメータ	値 (SFC)
乾燥ガス	N <sub>2</sub> , 200 °C、10 L/min
シースガス	N <sub>2</sub> , 250 °C、12 L/min
極性	ポジティブ/ネガティブ
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)
ネブライザ	N <sub>2</sub> , 35 psi
ノズル電圧	1000 V
キャピラリ電圧	3500 V
カラム	ZORBAX NH <sub>2</sub> (4.6×150mm, 5 μm) P/N 883952-708
移動相	A : CO <sub>2</sub> B : メタノール
流速	3 mL/min
グラジェント	0分 (2%B) -> 10分 (20%B) -> 10.1分 (50%B) ->12分 (50%B)
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL
メイクアップ溶媒 (流速)	5 mM 酢酸アンモニウム含メタノール (0.05m L/min)
パラメータ	値 (UHPLC)
乾燥ガス	N <sub>2</sub> , 250 °C、10 L/min
シースガス	N <sub>2</sub> , 250 °C、12 L/min
極性	ポジティブ/ネガティブ
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)
ネブライザ	N <sub>2</sub> , 60 psi
ノズル電圧	0 V
キャピラリ電圧	3500 V
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(2.1×100mm, 1.8μm) P/N 959758-902
移動相	A : 5mM 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール
流速	0.2 mL/min
グラジェント	0分 (10%B) -> 25 (100%B) -> 35分 (100%B)
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL

## 結果および考察

### SFCとUHPLCのクロマトグラム比較

図3には10 ng/mL濃度におけるSFCとUHPLCで分離したMRMクロマトグラム (重ね書き) を示しました。標準物質ではすべての農薬が10 ng/mL濃度で検出できることがわかりました。またピーク形状もおおむね良好でした。さらに、SFCとUHPLCではイオン強度に大差がないことがわかりました。

LCで最も遅く溶出した農薬はTridemorphでした(保持時間24.39分)。SFCで最も遅く溶出した農薬はClothianidinでした(保持時間10.12分)。LCの分離においてClothianidinは5.51分と比較的早い時間に溶出しました。LCで最も早く溶出する農薬はAldoxycarb (保持時間2.98分)でした。

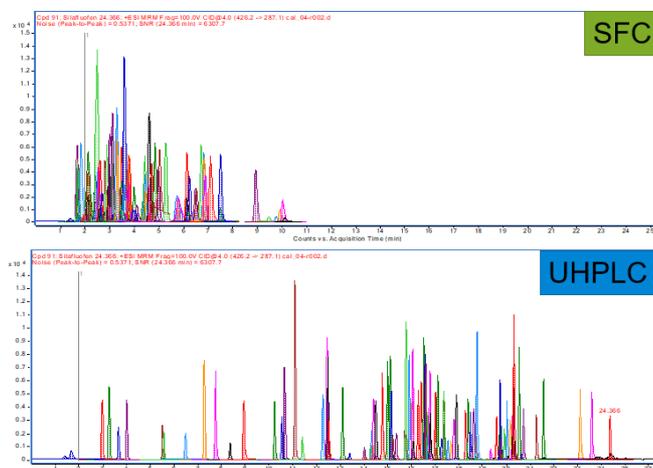


図3 各農薬のMRMクロマトグラム(重ね書き)

### マトリックス効果 ①茶

茶とオレンジについて、2つの前処理法 (①PSA+C18分散固相抽出と②PSA+C18+GCB分散固相抽出) を用いたときのマトリックス効果を検証しました。2つの前処理法で処理を行なった茶抽出液に農薬標準混合液10 ng/mLを添加した試料についてSFC-MSとUHPLC-MSで分析した結果、70~120%の適正回収率範囲にならなかった農薬を表4に示しました。

表4 適正回収率範囲に入らなかった農薬 (茶)

a) SFC-MS (PSA+C18 分散固相)		
農薬	保持時間(分)	回収率(%)
lprovalicarb	2.995	63.6
Epoxiconazole	3.019	39.2
Azinphos Methyl	3.053	22.0
Monolinuron	3.208	9.44
Aldicarb	3.217	22.0
b) SFC-MS (PSA+C18+GCB 分散固相)		
Acibenzorol-S-Methyl	2.451	64.4
lprovalicarb	3.061	65.1

Epoxiconazole	3.094	35.6
Monolinuron	3.149	11.5
Azinphos Methyl	3.179	16.4
Aldicarb	3.259	25.1
c) UHPLC-MS (PSA+C18 分散固相)		
Oxamyl	3.266	68.5
Methomyl	3.660	68.6
Imidacloprid	5.565	56.3
Chloridazon	6.489	46.8
Oxycarboxin	7.259	25.5
Tralkoxydim	12.422	64.9
Oryzalin	16.739	181.5
d) UHPLC-MS (PSA+C18+GCB 分散固相)		
Oxycarboxin	7.259	38.7
Isoxafultole	13.402	163.9
Cumyluron	16.041	126.1
Oryzalin	16.740	209.2
Pyrazolynate	18.711	136.1

SFCでは溶出時間3分付近に定量値が著しく低くなった農薬が多く、この溶出時間付近に前処理で除去できなかった夾雑物が存在すると思われます。また、GCBの有無による差があまりないことから、この夾雑物の除去にはGCBはほとんど関与しないことが推測されます。UHPLCではGCBなしの際に回収率が低かった農薬についてOxycarboxin以外はGCB処理で回収率が改善されているので、Oxycarboxinの溶出時間付近の夾雑物だけがGCB処理では除去できなかったと推測されます。

## マトリックス効果 ②オレンジ

オレンジ試料についてSFC-MSとUHPLC-MSで分析した結果、70~120%の適正回収率範囲にならなかった農薬を表5に示しました。SFCでGCBなしの場合に定量値が低くなった農薬についてGCB処理で全て改善しました。すべての農薬が適正回収率範囲の70~120%に入ったため、SFCでGCB ありの場合に表5に掲載対象となる農薬はありませんでした。一般的にGCBはカロテノイドやクロロフィルなど平面構造を有した化合物を吸着し除去できることが知られています。オレンジにはカロテノイド類を多く含むことから、GCBを使用することでカロテノイド類が除去されイオン化阻害が低減できたのではと予想されます。

一方、UHPLCでは溶出時間の早い農薬と溶出時間12分以後の農薬でイオン化阻害や増感を生じていますが、イオン化が阻害の原因となっている夾雑物はポリメトキシフラボン類と考えられ、GCBでは十分に除去できていないと考えられます。

表5 適正回収率範囲に入らなかった農薬 (オレンジ)

a) SFC-MS (PSA+C18 分散固相)		
農薬	保持時間(分)	回収率(%)
Silafluofen	1.664	65.0
Flufenacet	1.691	65.8
Acibenzoral-S-Methyl	2.443	43.3
Triflumuron	3.757	65.4

Dimethomorph	4.018	66.6
Lufenuron	4.310	48.5
Furametpyr	4.422	41.5
Diflubenzuron	4.483	55.6
Flufenoxuron	4.496	49.3
Tebuthiuron	4.543	35.5
Pyrifthalid	4.674	31.4
Fenamidone	4.725	63.7
Pencycuron	5.325	46.0
Methomyl	5.715	53.9
b) UHPLC-MS (PSA+C18 分散固相)		
Thiamethoxam	3.996	24.6
Clothianidin	5.501	7.0
Chloridazon	6.481	56.1
Tralkoxydim	12.414	57.5
Isoxafultole	13.397	164.1
Dimethomorph	15.212	62.6
Dymuron	15.772	19.6
Chloroxuron	16.032	62.3
Oryzalin	16.739	180.3
Diflubenzuron	16.988	43.1
c) UHPLC-MS (PSA+C18+GCB 分散固相)		
Oxamyl	3.266	63.0
Imidacloprid	5.565	62.5
Oxycarboxin	7.259	57.3
Thiabendazole	8.945	53.1
Tralkoxydim	12.405	64.7
Thiodicarb	12.512	44.2
Oryzalin	16.739	179.6
Pyrazolynate	18.711	56.4
Flufenoxuron	21.260	164.6
Spinosyn D	23.597	63.2

全体的に見て、SFCとUHPLCでは夾雑物も農薬も溶出時間、順番が異なるので、夾雑物の影響を受ける農薬の種類が異なり、両者を補完的に使用することが望ましいと思われます。

## まとめ

Agilent Infinity Lab SFC/UHPLC ハイブリッドシステムとAgilent 6470トリプル四重極検出器を用い、農薬の一斉分析を行いました。その結果、SFC、UHPLCどちらのシステムを用いても、1ng/mL濃度の農薬が検出できました。またSFCとUHPLCでは農薬の溶出挙動が異なり、試料のマトリックス効果を受ける農薬が異なる事が分かりました。SFCとUHPLCの相補的な利用はマトリックス効果の検証や偽陽性ピークの確認などにおいて、農薬一斉分析に有用であることが示されました。

ホームページ

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

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。  
本文書に記載の情報、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. 2019

Printed in Japan, December 18, 2019

DE44222.0014930556

LC-MS-201912YD-001