

Agilent Bond Elut HLB 固相抽出 カートリッジの評価

サルファ剤の回収率、再現性、サンプル通液性の比較

著者

澤田 有司
栗原 絵里奈

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

Agilent Bond Elut HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced) は、疎水性基のジビニルベンゼンと親水性基の N-ビニルピロリドンを特定の比率で配合した共重合体ポリマーであり、極めて高性能で汎用性の高い固相抽出カートリッジの吸着剤です。このアプリケーションノートでは Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジと同等品の性能評価を行うためにサルファ剤の回収率、再現性、サンプル通液性を比較しました。この結果、9 種のサルファ剤の回収率、再現性はすべての HLB 固相抽出カートリッジで良好でした。通液性は粒子径が 60 μm 以上の製品では良好ですが、粒子径が小さくなると通液に時間がかかることが確認できました。これらの検証の結果、70 μm の粒子径の Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジを使用すれば、優れた通液性を示しつつ、他社の類似のカートリッジと同等の固相抽出処理後の回収率と再現性を示すことが分かりました。

はじめに

LC/MS 分析では、サンプル由来の夾雑物の有無でイオン化効率が増減します。このため、定量性の高い LC/MS 分析を実現するためには固相抽出カートリッジによるサンプルの前処理が有効です。このアプリケーションノートでは、新しい固相抽出カートリッジの吸着剤 Agilent Bond Elut HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced) の回収率、再現性、通液性を評価しました。この HLB は、疎水性基のジビニルベンゼンと親水性基の N-ビニルピロリドンとを特定の比率で配合したの共重合体ポリマーであり、極めて高性能で汎用性の高い固相抽出カートリッジの吸着剤です (図 1)。

このアプリケーションノートで使用したサルファ剤は、スルホンアミド基をもつ抗菌性薬剤です。サルファ剤は細菌を殺さずに、成長や繁殖を抑えることで機能します。現在、サルファ剤は獣医アプリケーションの抗生剤として広く使用されています。主な利用方法は感染を予防するために家畜の飼料にサルファ剤を加えて経口投与します。また、ミツバチの疾病治療にも用いられています。こうした抗生剤の残留物は、食品からしばしば検出されているため、毒性やアレルギー反応に関する消費者の懸念が高まっています。

このアプリケーションノートでは、Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジの性能を評価するために、9 種のサルファ剤の回収率、再現性、サンプル通液性を比較しました。

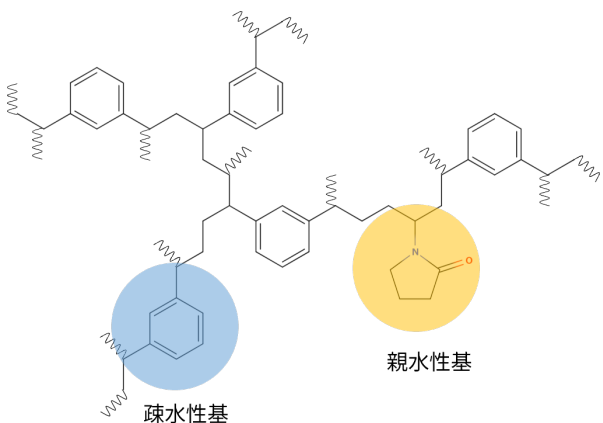


図 1. HLB の構造 (疎水性基:ジビニルベンゼン, 親水性基:N-ビニルピロリドン)。

システム

表 1. 装置構成

型番	装置名
G6470B	6470 トリプル四重極 LC/MS
G7167A	1290 Infinity II マルチサンプル
G7120A	1290 Infinity II ハイスピードポンプ

実験方法

材料

サルファ剤の標準品は関東化学の食品分析用混合標準液 1 (サルファ剤 LC 対象 9 種が各 10 ppm 含まれている) を使用しました (表 2)。移動相および試薬としてアジレントの InfinityLab Ultra-Pure LC/MS 用溶媒の超純水、アセトニトリル、メタノールを使用しました (表 2、表 3)。移動相に添加するギ酸は、関東化学から購入しました (表 2、表 3)。サンプル測定には、アジレントのバイアル、バイアルキャップ、インサートを使用しました (表 2)。

検量線用のサンプルは、10 % メタノール水溶液で 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$) の食品分析用混合標準品 1 を希釈し、1, 2.5, 5, 10, 25 ppb (ng/mL) に調製しました。

HLB 固相抽出カートリッジの操作

Agilent Bond Elut HLB と他社製品 HLB (Vendor 1-3) の固相抽出カートリッジは、図 2 の条件で 100 ppb の試験サンプル水溶液を調製し、コンディショニング、サンプル添加、洗浄、溶出を行い、回収率を計算する LC/MS 測定用のサンプルを調製しました。このサルファ剤の HLB 固相抽出カートリッジ処理を製品 (アジレントと他社製品 3 種類) ごとに独立で 3 回行い、LC/MS で分析しました (終濃度 10 ppb)。

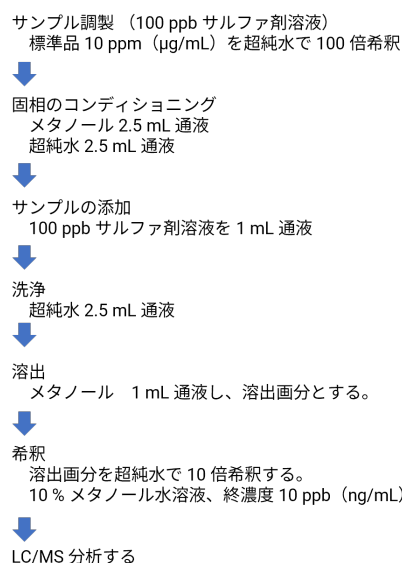


図 2. HLB 固相抽出カートリッジの操作。

HLB 固相抽出カートリッジの通液性の確認

Agilent Bond Elut HLB と他社製品 HLB (Vendor 1 ~ 3) の固相抽出カートリッジは、5 mL の超純水を通液し、通液性を確認しました。

表 2. 試薬と消耗品

メーカー	型番	品名
アジレント	5610-2145	*Bond Elut HLB, 60 mg, 3 mL tube, 50 個入り
アジレント	5191-4498	超純水
アジレント	5191-4496	アセトニトリル
アジレント	5191-4497	メタノール
アジレント	5182-0717	一体型セプタム付きポリプロピレンスクリューキャップ
アジレント	5188-6535	スクリューバイアル, 2 mL, 茶色
アジレント	5181-8872	不活性化ガラスインサート
関東化学	16246-96	食品分析用混合標準液 1
関東化学	16233-97	ギ酸、高速液体クロマトグラフィー用、25 mL

*他社製の HLB 固相抽出カートリッジも 60 mg の吸着剤が 3 mL の固相抽出カートリッジに入ったものを利用しました。

LC/MS 分析条件

検量線のサンプルと HLB 固相抽出カートリッジの操作で調製したサンプルは、表 3 と表 4 の条件で LC/MS 分析しました。検量線で算出した定量値からサルファ剤の回収率 (サンプルの定量値/10 ppb の標準液の定量値)、再現性 (Relative standard deviation, RSD %) を比較しました。

表 3. LC/MS 分析条件

パラメータ	分析
HPLCカラム	Poroshell 120 CS-C18, 2.7 um, 2.1 x 50 mm (P/N 699775-942)
移動相	移動相 A : 0.1 % ギ酸 + LC/MS 用超純水 移動相 B : LC/MS 用アセトニトリル溶液
流速	0.3 mL/分
グラジエント条件	%B : 0 分, 5 %; 0.5 分, 5 %; 8 分, 50 %; 11 分, 99 %; 11.1 分, 5 %; 15 分, 5 %.
注入量	1 µL
カラム温度	30 °C
MS 検出	イオンソース設定 乾燥ガス : 300 °C, 12 L/min シースガス : 250 °C, 12 L/min ネブライザ : 30 psi 極性 : ポジティブ キャピラリー電圧 : 3000 V

表 4. 9 種サルファ剤の Multiple reaction monitoring (MRM) 条件

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Fragmentor (V)	Collision Energy (eV)
Sulfadimethoxine	311	156	140	20
Sulfadimidine	279	186	140	12
Sulfameradine	265	92	120	28
Sulfamethoxazole	254	65	100	40
Sulfamethoxypyridazine	281	156	120	12
Sulfamonomethoxine	281	92	120	28
Sulfaquinoxaline	301	156	120	12
Sulfisoxazole	268	156	100	20
Sulfadiazine	251	92	100	24

MRM はポジティブモードで検出しました。

表 5. HLB 固相抽出カートリッジの評価

製品名	粒子径 (µm)	通液性	回収率 (%)	再現性 RSD (%)
Agilent Bond Elut HLB	70	Fast	98-79	5-1
Vendor 1 HLB	30	Slow	99-82	7-3
Vendor 2 HLB	45-75	Fast	96-76	8-4
Vendor 3 HLB	60	Fast	94-79	3-0.2

結果および考察

LC/MS で検量線用の標準品 (25 ppb) を測定し、良好な分析結果が得られました (図 3)。9 種サルファ剤の溶出時間は、1.9 分から 5.1 分であり、グラジエント測定 (移動相 B : 5-50 %) の範囲で幅広い極性の分析種が含まれています。HLB 固相抽出カートリッジの操作 (図 2) で処理したサンプルの定量値を検量線 (1, 2.5, 5, 10, 25 ppb) から算出し、回収率 (%), 再現性 (relative standard deviation, RSD %) を調べた結果、Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジは、9 種サルファ剤で他社製品と同等の良好な回収率と再現性を示しました (図 4)。

次に、通液性を調べるために各社の HLB 固相抽出カートリッジに 5 mL の超純水を通液しました。この結果、粒子径が 60 μm 以上の HLB 固相抽出カートリッジで良好な通液性が確認されました。これらは、加圧、減圧を必要としない重力落下で 5 mL の超純水が一分以内に通過します (表 5 の通液性で Fast と表記)。一方、30 μm の HLB 固相抽出カートリッジは通液性が悪く、サンプル量が増えた場合は減圧、加圧処理が必須です。この 30 μm の HLB 固相抽出カートリッジは 5 mL の超純水の通液時間に 30 分以上かかることがわかりました。また、この通液性を調べる実験で利用したコンディショニング不要の HLB 固相抽出カートリッジは、操作は簡便である反面、30 μm の HLB 固相抽出カートリッジより通液性が悪く、重力落下で通液出来ないため、今回のサルファ剤を利用した評価から除外しました。実サンプルを利用する場合は、通液性が良好で回収率と再現性の高い HLB 固相抽出カートリッジの利用が有効であると考えられます (表 5)。固相抽出カートリッジの吸着剤の粒子径は小さいほど分離性能は上がりますが、通液時の背圧は粒子径の 2 乗に反比例するため、粒子径を半分にした場合、吸着剤の背圧の理論値は 4 倍高くなります。このため、対象とするサンプルで良好な回収率、再現性が確認できた場合は、通液性の良い粒子径の固相抽出カートリッジを選択した方が使いやすいといえます。

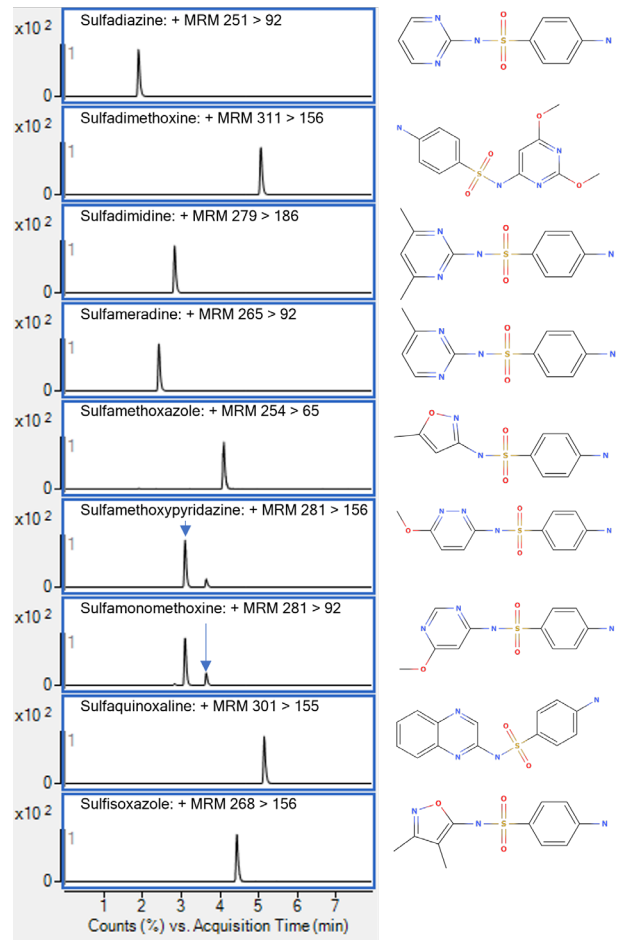


図 3. 9 種サルファ剤の構造と各サルファ剤の MRM クロマトグラム (25 ppb の検量線用標準溶液)。ピークが複数確認されるサルファ剤のクロマトグラムには定量解析に利用したピークを矢印で示しました。

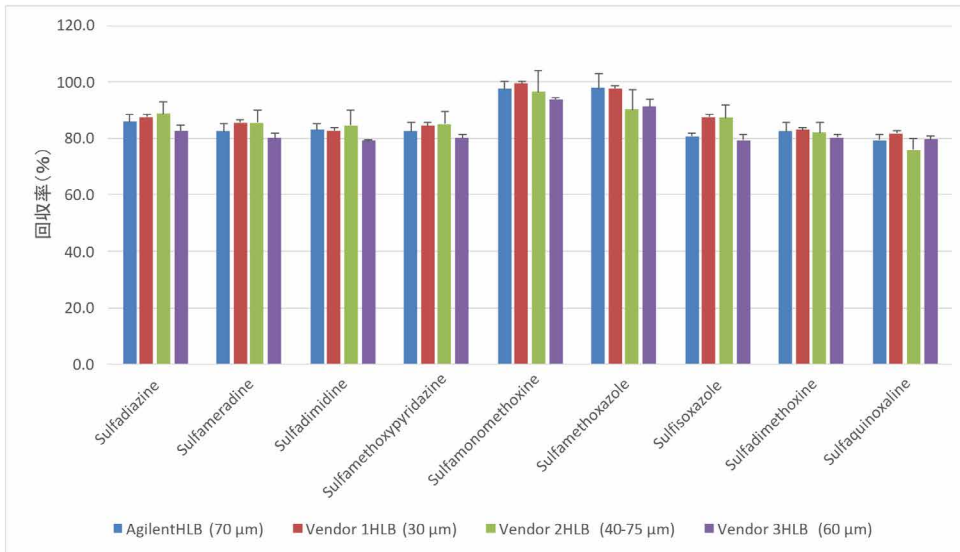


図 4. HLB 固相抽出カートリッジの回収率と再現性の比較。各サンプルは 3 回の LCMS 分析を行い、回収率の平均と相対標準偏差のエラーバーを示しました。各 HLB 固相抽出カートリッジの粒子径を括弧内に示しました。

結論

本アプリケーションノートでは、幅広い極性を示す 9 種のサルファ剤を利用して、低極性から高極性まで対応可能な Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジの評価を行いました。この結果、Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジは、9 種すべてのサルファ剤で他社製品と同等の良好な回収率・再現性を確認できました。さらに、粒子径サイズが 70 µm の Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジは、粒子径 30 µm の HLB 固相抽出カートリッジより良好な通液性を示しました。粘性の高い実サンプルを処理する場合は、通液性が良好で回収率と再現性の高い Agilent Bond Elut HLB 固相抽出カートリッジの利用が有効であると考えられます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

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いません。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。

DE61624333

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, December 1, 2023

5994-6970JAJP