

農薬分析におけるピーク形状の向上と LOQ の改善

Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラを用いた
極性農薬の LC/MS 分析

著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、溶出強度の高い有機溶媒に溶解した極性農薬の LC/MS による多成分残留分析における、アジレントの Feed 注入モードでの Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラの使用について説明します。1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラを使用して、溶媒効果を軽減し、カラムで極性化合物をトラップして濃縮しつつ、さまざまなフィード速度でサンプルを導入します。この手法はブレイクスルーを解消し、優れたピーク形状を得ることで、検出や定量を向上させ、完全自動化されたピーク積分を実現します。この手法を適用可能な一般的な多成分残留分析メソッドは、QuEChERS サンプル前処理で純アセトニトリルを使用した、果物や野菜から抽出した農薬の分析です。

はじめに

極性化合物の LC/MS 分析における一般的な問題は、サンプル溶媒の溶出強度により、クロマトグラフィー分離が損なわれるということです。逆相クロマトグラフィーでのサンプル溶媒の溶出強度と注入量が增大するのに伴い、早期に溶出する極性化合物の最高性能が損なわれ、結果として溶媒先端での完全なブレイクスルーの原因にもなります。

また、HPLC 機器へのサンプル注入のモードが、サンプルに含まれる化合物の分離に大きな影響を及ぼす可能性もあります。最新の HPLC 機器は、最高の性能を実現するために、拡散を最小限にするように高度に最適化されています。ただし、この最適化により、溶媒がカラムヘッドに達するときに、サンプル溶媒中の極性化合物が非常に高濃度になる可能性が高くなります。ピークの割れやブレイクスルーを防ぐために、開始溶媒への極性化合物の移行は通常、サンドイッチ注入や追加のミキサーなどによって促進します。1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラでは、流路を変更したり、最高の性能を損なったりすることなくサンプルと開始溶媒を混合する、Feed 注入によりサンプルを導入できます。この注入モードでは、LC システムでの手動操作は必要ありません。1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラは従来のフロースルーモードも実行できます。メソッド設定でマウスを 1 回クリックするだけで、フロースルーメソッドに対応させることができます。

野菜や果物からの極性農薬の多成分残留分析においては、多くの場合に前述の分析課題が発生します。QuEChERS サンプル前処理の手順で、最終的に農薬がアセトニトリルに溶解してしまうからです。

このアプリケーションノートでは、新しく開発された注入原理、Feed 注入について取り上げます。この注入モードは、QuEChERS サンプル前処理の後によく見られる、アセトニトリルなどの溶媒に溶解した極性農薬の LC/MS による多成分残留分析を対象に、サンプル導入による溶媒モジュレーションを実現します。注入量の増加による最高の性能と最高の感度に対するサンプル導入での溶媒モジュレーションのプラス効果を明らかにし、説明します。

実験

装置構成

- Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラ (G7167C)
- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS (G6465B)

カラム

Agilent ZORBAX StableBond C18、2.1 × 100 mm、1.8 μm (部品番号 858700-902)

LC メソッド

パラメータ	値
溶媒	A) 水 + 5 mM ギ酸アンモニウム (AmFormate) + 0.1 % ギ酸 (FA)、 B) メタノール (MeOH) + 5 mM AmFormate + 0.1 % FA
流量	0.5 mL/min
グラジエント	0 分 - 5 % B 5 分 - 30 % B
ストップタイム	5 分 ポストタイム: 2 分
カラム温度	40 °C
フロースルー注入	注入量: 0.5、1.0、1.5、2.0 μL
Feed 注入	注入量: 0.5、1.0、1.5、2.0 μL フィード速度: 35 μL/min オーバーフィード容量: 6 μL フィード溶媒 (S2): 水 + 5 mM AmFormate + 0.1 % FA 内側洗浄: 150 μL S2 再コンディショニング: S2
ニードル洗浄 (S1)	3 秒、水/アセトニトリル (ACN) (50/50) + 0.1 % FA

MS メソッド

パラメータ	値
イオン源	Agilent Jet Stream
ガス温度	120 °C
ガス流量	12 L/min
シースガス温度	325 °C
シースガス流量	12 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
キャピラリー電圧	+3,500 V
ノズル電圧	+300 V
タイムフィルタ	0.02 分
MRM 条件	表 1 参照

ソフトウェア

- Ultivo LC/TQ 用 Agilent MassHunter acquisition ソフトウェア、V1.1
- Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア、V10.0
- Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア、V10.0

農薬

メタミドホス、アセフェート、アミノカルブ、オメトエート、プロパモカルブ、ピメトロジン、ジノテフラン、オキサミル。

キャリブレーション

1,000 ppb の濃度になるように、8 種類の農薬の原液を混合しました。この溶液をアセトニトリルで希釈し、100、20、10、2、1、0.2 ppb の濃度のキャリブレーション系列を調製しました。

サンプル

アセトニトリル溶液中のイチゴからの QuEChERS 抽出物、すべての農薬を 10 ppb の濃度で添加あり、および添加なし。

サンプル前処理

1. ホモジナイズしたイチゴサンプル 10.00 ± 0.01 g を計量し、50 mL 遠心管に入れます。
2. 必要に応じてスパイクし、10 mL のアセトニトリルを加えて蓋をし、1.5 分間ボルテックスします。
3. Agilent QuEChERS 抽出キット、オリジナルメソッド (部品番号 5982-5550) 抽出塩 (4 g) を加え、1.5 分間ボルテックスします。
4. 4,000 rpm で 4 分間遠心分離します。
5. 6 mL の上澄みを 15 mL Agilent QuEChERS 分散汎用 SPE チューブ (部品番号 5982-5056) に移します。
6. 1.5 分間ボルテックスし、4,000 rpm で 4 分間遠心分離します。
7. 上澄みをきれいな試験管に移します。

表 1. 農薬の選択のための MRM 条件

	プリカーサ (m/z)	フラグメント (V)	定量フラグメント (m/z)	CV (V)	定性フラグメント (m/z)	CV (V)
メタミドホス	142.0	88	125.9	12	93.9	12
アセフェート	184.0	60	143.0	4	49.1	20
オメトエート	214.0	88	155.0	12	125.0	20
プロパモカルブ	189.2	106	102.0	16	74.0	28
アミノカルブ	209.1	101	137.0	24	122.0	48
ピメトロジン	218.1	106	105.1	24	78.0	48
ジノテフラン	203.1	78	157.0	4	129.1	8
オキサミル	237.1	70	90.0	4	72.0	16

8. Agilent Captiva プレミアムシリンジ フィルタ (部品番号 5190-5083) で、オートサンプリングバイアルにろ過します。

溶媒と試薬

- すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。
- 試薬はドイツの Merck 社から購入しました。
- 超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 µm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を装着した Milli-Q Integral システムで精製しました。

結果と考察

注入モード (Feed 注入またはフロースルー注入モード) の影響を明らかにするために、8 種類の溶出の早い極性農薬の混合物を、各化合物に対し最終濃度 10 ppb でアセトニトリルに溶解させました。このサンプルを 0.5、1.0、1.5、2.0 µL の注入量で注入し、両方の注入モードで得られた最高性能を調査しました。図 1 は、両方の注入モードでの、最初に溶出した農薬、メタミドホスの MRM 定量イオンピーク形状を示しています。0.5 µL の注入量で、Feed 注入により優れた形状のピークが得られました (図 1 : A1)。フロースルー注入モードで得られたピークも良好なピーク形状を

示しましたが、上部に若干の割れが生じています (図 1 : A2)。注入量の増加に伴い、Feed 注入モードでピーク高さが増加した一方で、優れたピーク形状が維持されています (図 1 : B1 ~ D1)。反対に、フロースルー注入モードでは、1.0 µL の注入量からピークに割れが生じ始めています (図 1 : B2)。1.5 µL および 2.0 µL のより多い注入量では、農薬メタミドホスのピークは溶媒先端でブレイクスルーが生じ始めています (図 1 : C2 ~ D2)。

MRM 定量および定性イオンのピークに対し、1.0 µL と 1.5 µL の注入量による両方の注入モードでの 8 種類すべての農薬で得られた結果を付録の図 A および図 B に示します。メタミドホスよりも後に溶出した化合物は、両方の注入モードで 0.5 µL の注入量において、割れのない優れたピーク形状を示しました。ただし、フロースルーモードでは、1.0 µL の注入量でいくつかのピークに割れが生じ始めています (付録 : 図 A)。1.5 µL の注入量で、すべてのピークに、溶媒先端で割れやブレイクスルーが生じ始めています (付録 : 図 B)。およそ 3.7 分に溶出している最後の農薬でも、2.0 µL の注入量で割れが生じ始めています。

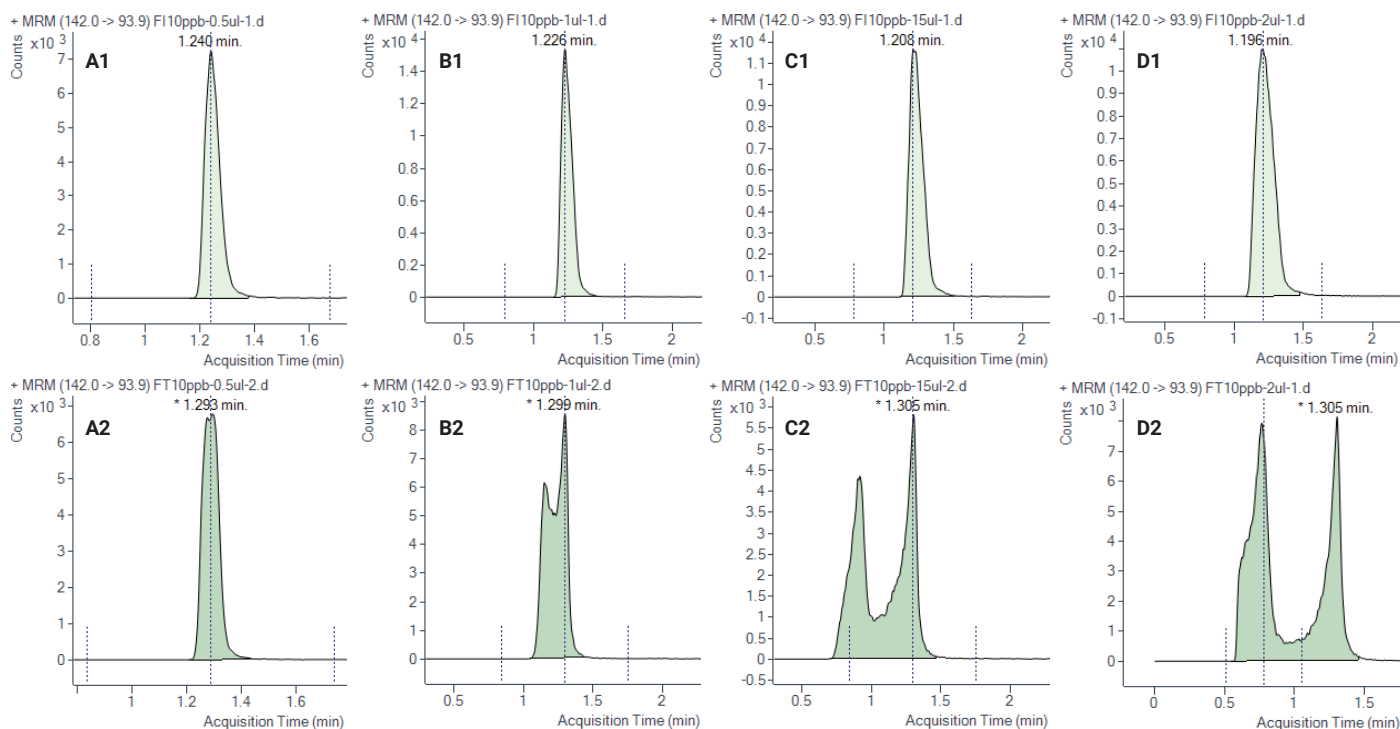


図 1. 溶出の早い極性農薬メタミドホス (アセトニトリル中に 10 ppb) の、さまざまな注入量 (A : 0.5 μ L、B : 1.0 μ L、C : 1.5 μ L、D : 2.0 μ L) での、アジレントの Feed 注入モード (シリーズ 1、上の行) およびフロースルー注入モード (シリーズ 2、下の行) による比較

結果をより定量的に調査するために、両方の注入モードおよび前述のすべての注入量で、すべての化合物に対し 0.2 ~ 100 ppb の検量線を取得しました (n = キャリブレーションレベルごとに 6、アセトニトリル溶液)。

注目すべき最初のパラメータは、化合物と 1.5 μ L の注入量に関連する、注入モード影響下のピーク面積の RSD です (図 2)。RSD 値は、両方の注入モードにおいて 0.5 μ L と 1.0 μ L のより少ない注入量で、すべての化合物で概して 2 % 未満でした。ただし、フロースルー注入では、注入量が 1.5 μ L に増加するに伴い、ピーク面積 RSD が大幅に増加しました。メタミドホス、アセフェート、オメトエートの 3 種類の化合物では、RSD は最大で 14 % 増加しています。より遅く溶出する化合物、プロパモカルブとアミノカルブは 2.0 μ L の注入量の影響を強く受け、RSD 値は最大 30 % まで増加しました。溶出時間が遅い化合物でも同じような様子が確認されましたが、より低いレベルでした。Feed 注入では、すべて

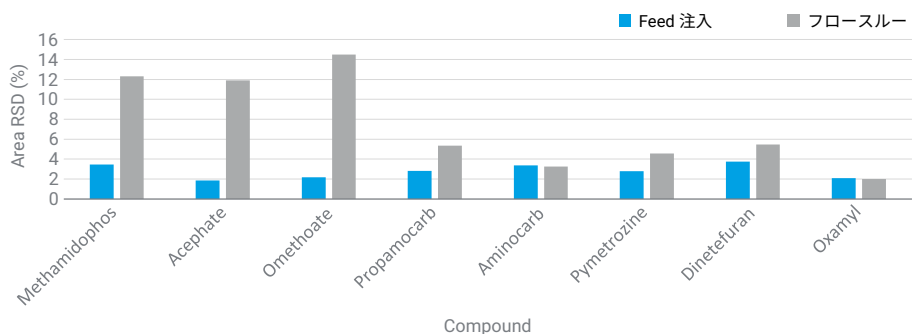


図 2. 1.5 μ L の注入量で、ピーク面積 RSD に対する注入モードの影響は化合物 (各 10 ppm) によって異なります。

の化合物のピーク面積 RSD は概して 3 % 未満でした。最大注入量でも、ピーク面積 RSD は概して 5 % を超過しませんでした。

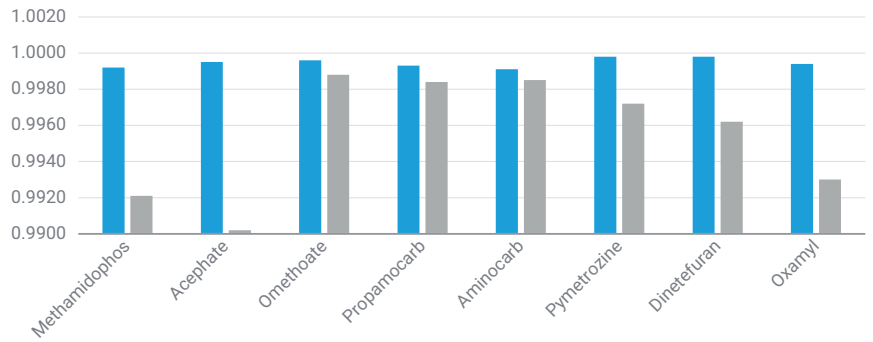
同様に測定データから計算されたリテンションタイム RSD 値は、Feed 注入とフロースルー注入で概して 0.1 % 未満でした。フロースルーモードで得られたリテンションタイムは、追加の

サンプリンググループディレイボリュームにより、若干高くなりました。

測定されたすべての検量線から、 R^2 値に関して、得られた直線性を比較しました。Feed 注入を使用して作成された検量線から、すべての化合物に対し得られた R^2 値は、適用されたすべての注入量で概して >0.999 でした。

フロースルー注入モードでは、1.5 μL 以上の注入量で、すべての化合物に対し R^2 値の低下が確認されます (図 3)。0.5 μL と 1.0 μL の注入量でのフロースルー注入により得られた結果から作成された検量線では、メタミドホス、アセフェート、オメトエートの R^2 値は概して >0.99 でした。溶出時間が遅い農薬の R^2 値は概して >0.999 でした。2.0 μL の注入量では、得られた R^2 値は大きく損なわれ、概して 0.93 ~ 0.99 でした。

より多い注入量のフロースルー注入における、より低い面積精度と直線性も、定量下限 (LOQ) に影響を及ぼします。LOQ ($S/N = 10$) は最小のキャリブレーションポイントから計算しました。得られた値は、Feed 注入では注入量範囲全体で概して 30 ~ 40 ppt でした。フロースルー注入では 1.5 μL の注入量で、LOQ は 70 ~ 120 ppt でした (図 4)。フロースルー注入では、メタミドホス、アセフェート、アミノカルブに対し、注入量の増加に伴い LOQ が着実に高くなりました。すべての農薬で、2.0 μL の注入から得られた LOQ は非常に高く、約 200 ppt でした。溶出時間が遅い農薬、ジノテフランとオキサミルの場合、それぞれの保持力の高さから、この効果は低下しました。



■ Feed Injection	0.9992	0.9995	0.9996	0.9993	0.9991	0.9998	0.9998	0.9994
■ Flow-through	0.9921	0.9902	0.9988	0.9984	0.9985	0.9972	0.9962	0.9930

図 3. 1.5 μL の注入量でアジレントの Feed 注入とフロースルー注入を使用して測定したすべての農薬の検量線から得られた直線性

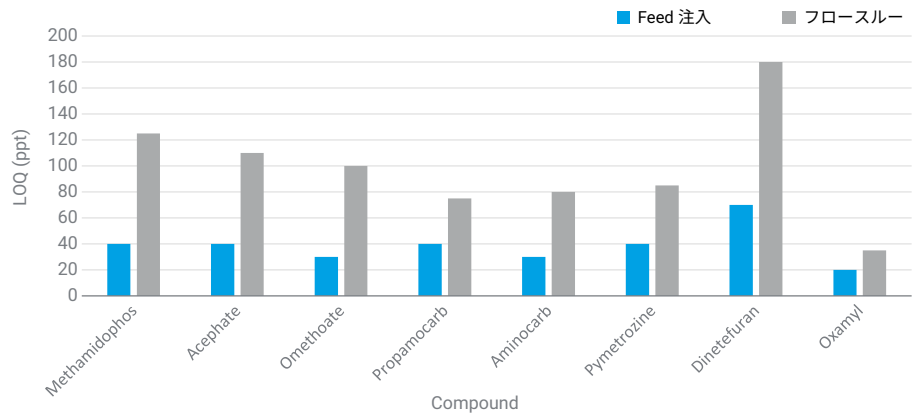


図 4. 1.5 μL の注入量でアジレントの Feed 注入モードにより作成された検量線から得られた LOQ

実際の QuEChERS アセトニトリル抽出条件を使用した試験では、8 種類の農薬を 10 ppb 添加したイチゴマトリックスから回収率を測定しました。すべての農薬で、Feed 注入モードで 85 ~ 105 % の回収率であり、80 ~ 120 % の必要な許容レベルに収まっています。² 溶出の早い農薬の回収率は、傾向として 85 ~ 95 % でした。最後に溶出した 2 種類の農薬は、100 ~ 105 % の回収率を示しました (図 5)。フロースルー注入モードで得られた回収率は同じ範囲に収まり、溶出時間が遅い農薬と同様の増加傾向を示しました。農薬のピメトロジンの測定は、得られたリテンションタイムにおいて、この農薬の高いマトリックス抑制により、どちらのケースでも非常に低い回収率でした。

結論

このアプリケーションノートでは、極性農薬の多成分残留分析メソッドにおける、アジレントの Feed 注入モードを使用した Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラの性能について説明しました。1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラはフロースルー注入モードも実行できるため、比較測定も示しています。Feed 注入は、アセトニトリル溶液からの早期に溶出する極性農薬に対し、概して優れたピーク形状を提供することが実証されました。この優れた性能は検量線の直線性にもプラス効果をもたらし、Feed 注入を適用した場合、

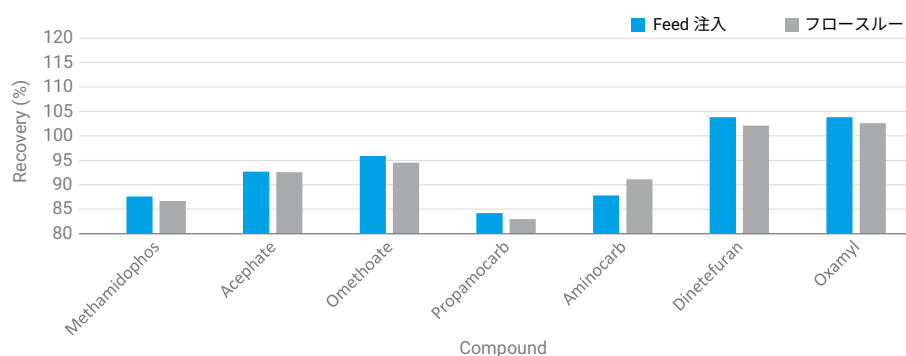


図 5. 8 種類の溶出の早い農薬を各 10 ppb 添加したイチゴマトリックスからの各農薬の回収率。1.5 μL の注入量でアジレントの Feed 注入モードとフロースルー注入モードを使用して測定。

通常はより優れた LOQ を得られます。アセトニトリル溶液中の QuEChERS 抽出物から得られた回収率は、80 ~ 120 % の要件を満たしています。

Feed 注入により、追加のミキシングボリュームの調整なく、分散に最適化された構成で UHPLC 機器を使用することができます。Feed 注入により得られる最適なピーク形状により、時間のかかるデータレビューも低減できる可能性があります。

参考文献

1. Herschbach, H.; Naegele, E. Performance Characteristics of the Agilent 1260 Infinity II Hybrid Multisampler. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-5952EN, **2023**.
2. European Commission: Health & Consumer Protection Directorate—Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANTE/12682/2019.

付録

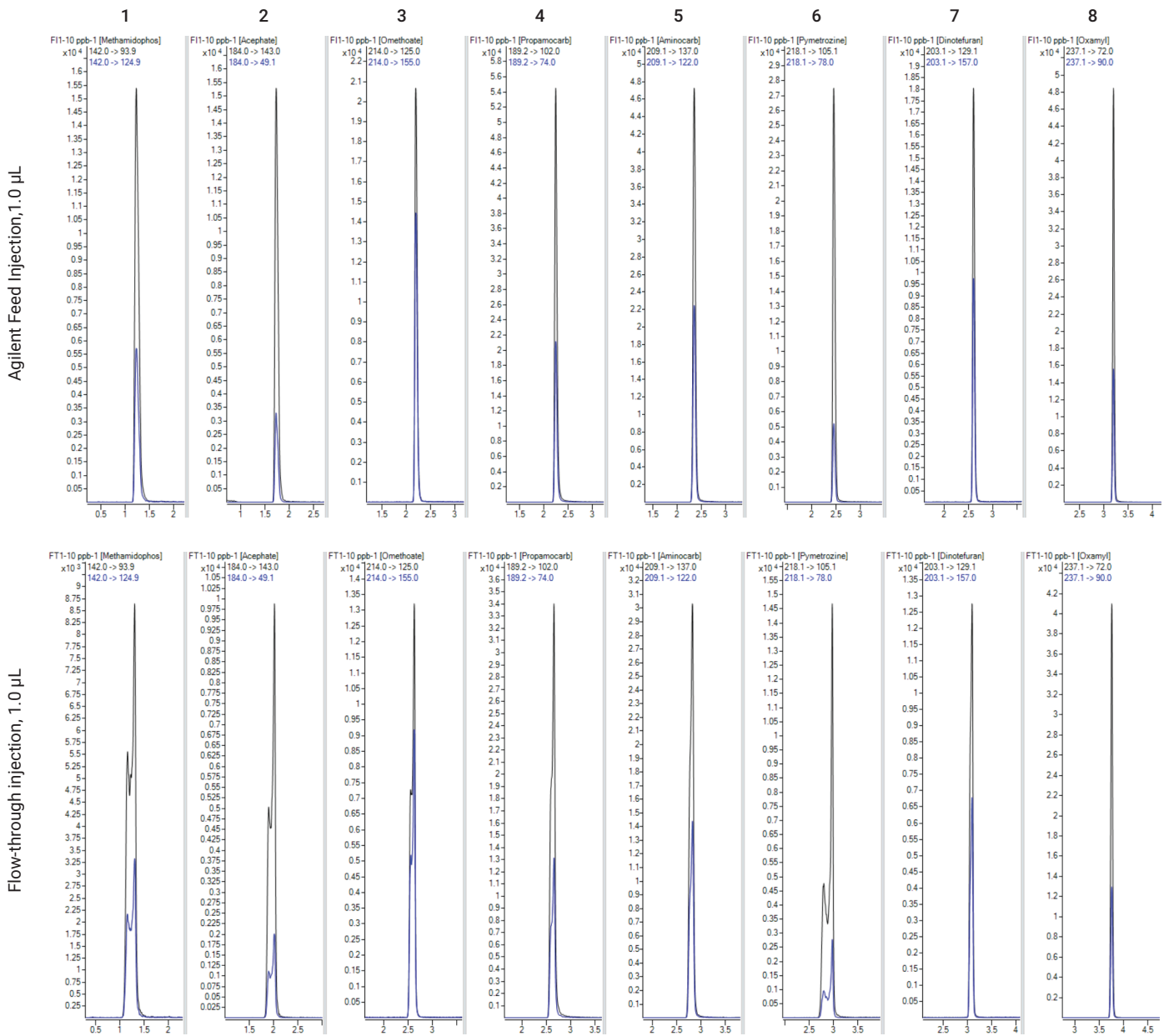


図 A. アジレントの Feed 注入およびフロースルー注入より、8 種類の極性農薬の混合物を 1.0 μL 注入 (定量イオン = 灰色、定性イオン = 青)。1) メタミドホス、2) アセフェート、3) オメトエート、4) プロパモカルブ、5) アミノカルブ、6) ピメトロジン、7) ジノテフラン、8) オキサミル

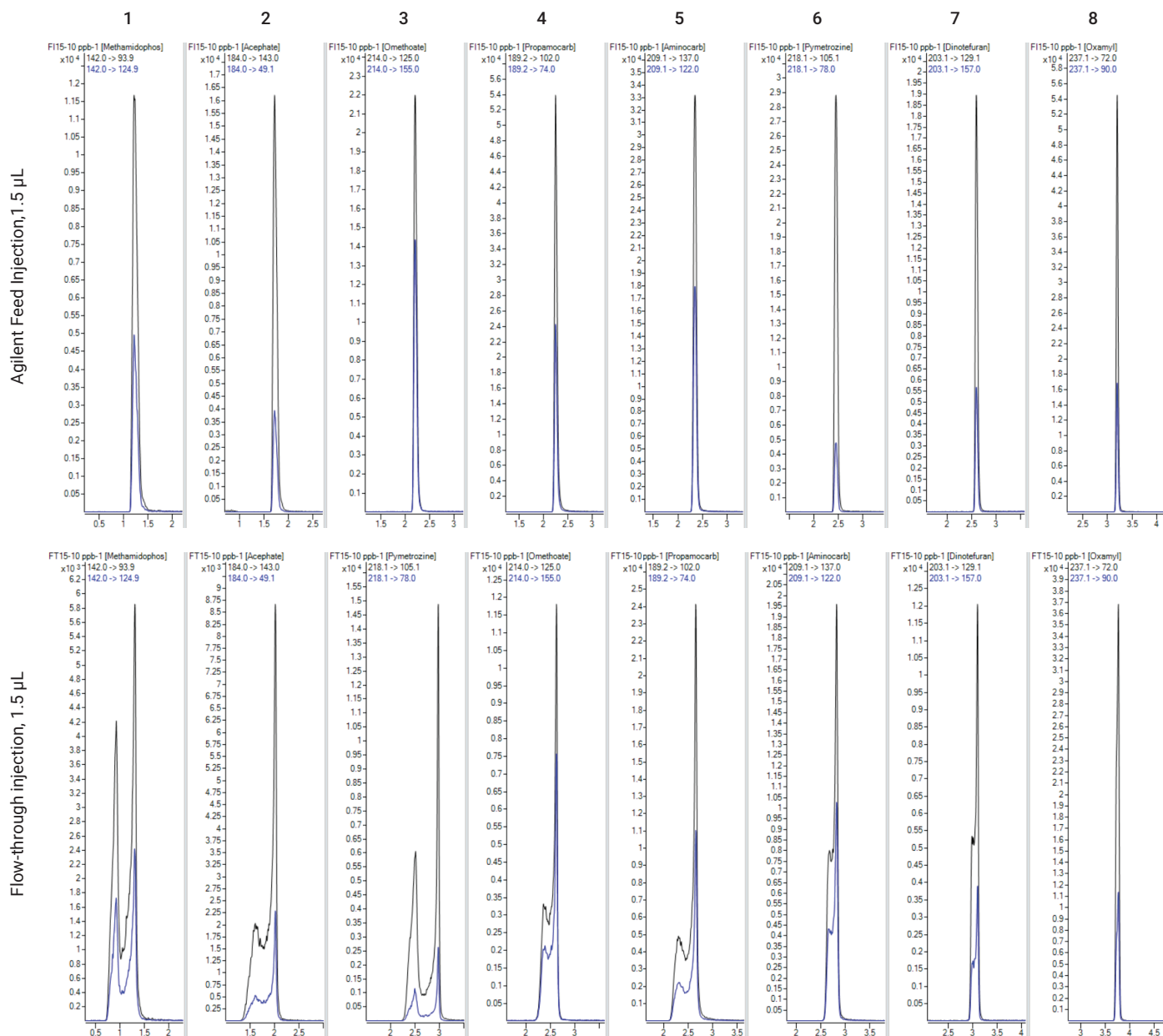


図 B. アジレントの Feed 注入およびフロースルー注入より、8 種類の極性農薬の混合物を 1.5 µL 注入 (定量イオン = 灰色、定性イオン = 青)。1) メタミドホス、2) アセフェート、3) オメトエート、4) プロパモカルブ、5) アミノカルブ、6) ピメトロジン、7) ジノテフラン、8) オキサミル

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE43170906

アジレント・テクノロジー株式会社
 © Agilent Technologies, Inc. 2023
 Printed in Japan, June 15, 2023
 5994-6125JAJP