

Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラを用いた 残留農薬の一斉分析

著者

安田 恭子

林 慶子

澤田 浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

逆相モードのカラム分離では、アセトニトリルは強溶媒です。食品の残留農薬分析においては、最終検液がアセトニトリルの場合があり、そのままの検体を LC/MS で分析するとピーク形状が崩れてしまうことがあります。特に ODS カラムに保持しにくい高極性農薬においては、その傾向が顕著です。Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンプラは、この問題を解決できる画期的な注入方式を搭載しているオートサンプラです。このアプリケーションノートでは、アボカドにおける残留農薬の一斉分析例を紹介しています。注入にかかわるパラメータを最適化することで、良好な結果が得られることが示されました。

目的

最近の HPLC は、ピーク形状を向上させる目的で、システム容積を最小化するように高度に設計されています。例えばアジレントのフロースルー注入では、サンプルのバンド幅を広げることなくサンプルをカラムへと輸送することが可能です。しかしながら、この注入方式ではサンプル溶媒と初期移動相が十分に混合されない場合があります。その場合、ピーク割れやブレイクスルーが観測されてしまいます。そのため、サンドイッチ注入やミキサーをカラムの前に導入するといった手法が取り入れられてきました。しかしながらサンドイッチ注入では脂溶性成分の回収率低下が生じる場合があります。さらにはサンドイッチ注入に対応していないオートサンブラも存在します。またミキサーの導入では、ほとんどの装置の場合、流路を手動で切り換える必要があります。Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラは、Feed 注入方式¹⁾を搭載した最新のオートサンブラです。Feed 注入はサンプルと任意の溶媒 (Feed 溶媒) を移動相と混和しながら加圧注入する、アジレント独自の注入方式です。Feed 注入方式により、クロマトグラフィー分離におけるサンプル溶媒の影響を軽減できることが期待できます。さらには、これまで同様のフロースルー方式での注入も可能で、目的に合わせた注入法を選択できる特徴ももっています。

LC/MS による残留農薬の一斉分析では、一度に数百の農薬を測定する場合があります。農薬は高極性のものから低極性のものまで、様々な物性もっています。食品の残留農薬分析でよく用いられている QuEChERS 法は、最終検液がアセトニトリルです。アセトニトリルに溶解している高極性農薬と低極性農薬を一斉分析する必要があり、測定に困難をきたすこともあります。そこでこのアプリケーションノートでは Feed 注入と従来のフロースルー注入を比較し、Feed 注入のパラメータを最適化して残留農薬分析における Feed 注入の有用性を検証しました。

分析条件

使用した機器一覧を表 1 に、また分析条件を表 2 に示しました。MS はイオン源に AJS (ESI) を用い、正イオンモードで測定しました。HPLC カラムは内径 2.1 mm、長さ 100 mm の Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 カラムを用いました。洗浄溶媒の S2 は Feed 溶媒です。Feed 溶媒とは、サンプルとともにカラムに共注入する溶媒です。Feed 溶媒には 0, 5, 10 および 50 % メタノール水溶液を用い、最適化を検証しました。Feed 速度はサンプルをカラムにインジェクションする時の速度で、使用している流速に対し任意の割合で変化させることができます。

表 1. 機器一覧

型番	装置名
Ultivo	トリプル四重極 MS (LC/TQ)
G7104C	1260 Infinity II フレキシブルポンプ
G7167C	1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラ
G7122A	1260 Infinity II デガッサ
G7116A	1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット

表 2. 分析条件

パラメータ	値
乾燥ガス	N ₂ , 300 °C, 13 L/min
シースガス	N ₂ , 350 °C, 11 L/min
極性	正/負イオンモード
イオンソース	AJS (Agilent Jet Stream, ESI)
ネブライザ	N ₂ , 50 psi
ノズル電圧	0 V
キャピラリー電圧	3000 V
カラム	Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, 2.1*100 mm, 1.8 μm, p/n 959764-902)
移動相	A : 2 mM 酢酸アンモニウム水溶液 B : メタノール 条件 : 10 %B → (25分) → 100 %B
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL
サンプル希釈溶媒	アセトニトリル
洗浄溶媒	S1 IPA/H ₂ O/ACN=1 : 1 : 1 (+0.1 % 酢酸) 混合用液 S2 0, 5, 10, および 50 % メタノール水溶液 S3 10 % メタノール水溶液
Feed 速度	自動 (5 %, 対ポンプ流量比)
フラッシュアウト	自動 (3.50 μL)

測定対象は 35 種類の農薬としました。農薬の希釈溶媒にはアセトニトリルを用いました。MRM 条件は表 3 にまとめました。この中で最も Log P が小さいのはジノテフランで -0.664 です。最も極性が低いのはトリデモルフで Log P は 6.99 です。Feed 注入の最適化にはこの 2 つの農薬の挙動に着目して検討しました。

表 3. MRM 条件

化合物名	トランジション	フラグメンタ	コリジョンエネルギー	極性
Dinotefuran	203.1 -> 129.1	80	10	ポジティブ
Aldicarb-sulfoxide	207.1 -> 132.0	100	4	ポジティブ
Fonicamid	230.1 -> 203.0	128	18	ポジティブ
Trichlorfon	256.9 -> 109.0	128	12	ポジティブ
Clofencet	279.1 -> 261.1	85	15	ポジティブ
Propham	180.1 -> 138.1	80	6	ポジティブ
Phenmedipham	318.1 -> 168.0	80	8	ポジティブ
Chlorantranilprole	484.0 -> 453.0	140	10	ポジティブ
Tralkoxydim	330.2 -> 284.1	120	8	ポジティブ
Ethiprole	397.0 -> 350.9	128	20	ポジティブ
Isoprothiolane	291.1 -> 188.9	80	16	ポジティブ
Mefenacet	299.1 -> 148.0	100	8	ポジティブ
Flutolanil	324.1 -> 262.0	120	16	ポジティブ
Cafenstrole	351.2 -> 100.0	80	4	ポジティブ
Triazophos	314.1 -> 162.0	120	16	ポジティブ
Propetamphos	282.1 -> 138.0	80	16	ポジティブ
Oryzalin	345.1 -> 281.1	180	18	ネガティブ
Triflumizole metabolite	295.0 -> 73.0	100	15	ポジティブ
Quinalphos	299.0 -> 163.0	120	26	ポジティブ
Etobenzanid	340.1 -> 149.0	100	20	ポジティブ
Fipronil	454.0 -> 368.0	100	20	ポジティブ
Pyrazoxyfen	403.1 -> 91.0	160	40	ポジティブ
Propiconazole	342.0 -> 159.0	120	28	ポジティブ
Prochloraz	376.0 -> 307.9	104	10	ポジティブ
Thiobencarb	258.1 -> 125.0	100	16	ポジティブ
Cycloate	216.1 -> 83.0	80	18	ポジティブ
Hexaflumuron	461.0 -> 158.0	140	20	ポジティブ
Di-allate	270.1 -> 86.0	100	12	ポジティブ
Trifloxystrobin	409.1 -> 186.0	120	12	ポジティブ
Triflumizole	346.1 -> 278.0	104	8	ポジティブ
Fluazinam	462.9 -> 415.9	128	16	ネガティブ
Lufenuron	511.0 -> 158.0	120	18	ポジティブ
Chlorfluazuron	540.0 -> 382.9	152	20	ポジティブ
Spirodiclofen	411.1 -> 71.1	100	12	ポジティブ
Tridemorph	298.3 -> 130.1	180	30	ポジティブ

食品の前処理には、QuEChERS 法 (EN) を用いました。食品は市販のアボカドを用いました。最終検液は分散固相等の精製は行わず、アセトニトリルで 10 倍希釈したものをサンプルの希釈溶媒として用いました。

結果および考察

初めに、水を Feed 溶媒として用い、従来のフロースルー方式と Feed 注入方式の 2 つのモードを比較しました。測定した農薬の中、保持の弱いジノテフランとアルジカルブスルホキシドのクロマトグラムのピーク形状は、フロースルー注入では崩れていることがわかりました (図 1)。一方、保持時間 6 分以降のピークはすべて良好でした。

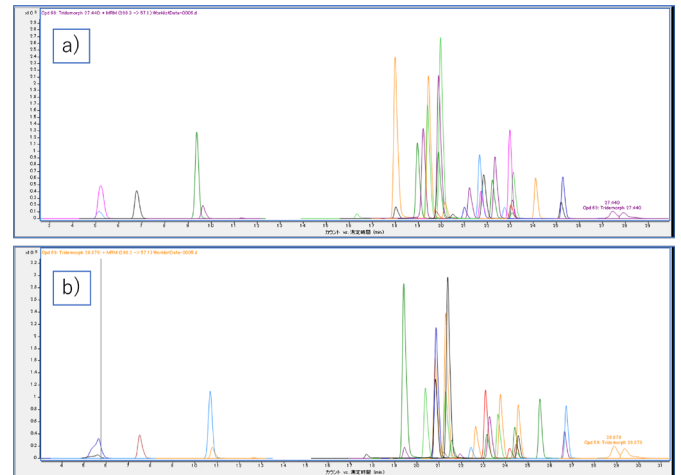


図 1. a) Feed 注入と b) フロースルー注入によるピーク形状の違い

次に、ジノテフラン、アルジカルブスルホキシドおよび保持が最も強いトリデモルフのピーク形状を比較しました (図 2)。ジノテフランにおいては、Feed 注入はフロースルー注入で得られるピーク高さの約 1.49 倍、またアルジカルブスルホキシドにおいては、ピーク高さは 1.79 倍となりました。このように Feed 注入を用いると、高極性農薬を転溶媒することなく高感度で測定できました。

一方、低極性のトリデモルフにおいては、Feed 注入ではピーク面積が減少していることがわかりました。今回の測定では水を Feed 溶媒として用いたため、トリデモルフが Feed 溶媒に溶け込むことができなかったためと考えられます。そこで、次に Feed 溶媒組成の最適化を行いました。

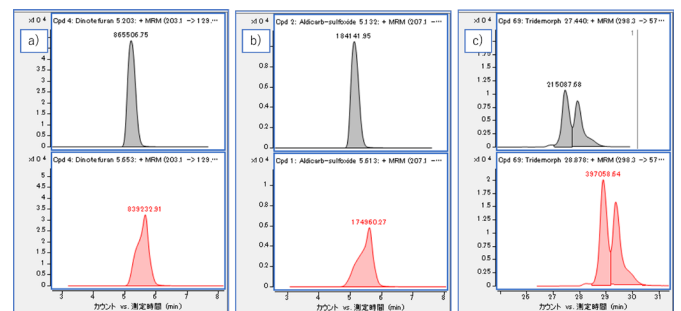


図 2. a) ジノテフラン、b) アルジカルブスルホキシド、および c) トリデモルフのピーク形状の比較。上段 (黒) は Feed 注入、下段 (赤) はフロースルー注入のデータ。

Feed 溶媒に含まれるメタノールの量を変化させ測定しました。その結果を図 3 に示しました。Feed 溶媒の有機溶媒比率を 50 % まで高めると、Feed 注入のメリットが得られなくなり、ジノテフランのピーク形状が崩れることがわかりました。また、図 2 でも観測されたように水を Feed 溶媒として用いるとトリデモルフのピーク面積は小さくなることわかりました。これは、トリデモルフが水に溶けにくい、フラッシュヘッドやループに残留してしまったことが原因と考えられます。しかしながら、Feed 溶媒に 5 % 以上のメタノールを入れることで、低極性と高極性のこれらの化合物のピーク形状と強度を両立することが可能でした。Feed 溶媒はグラジェントの初期移動相条件を目安にするとよいと考えられます。

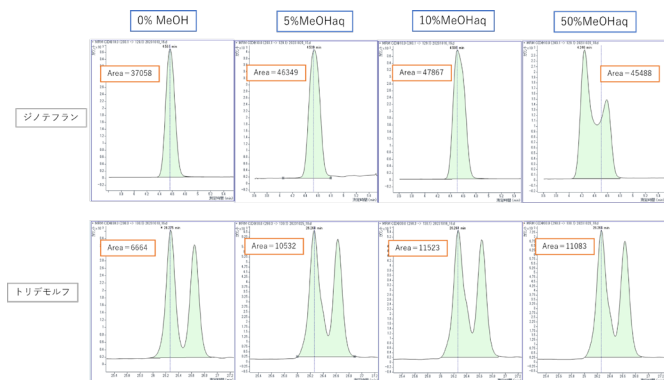


図 3. Feed 溶媒の最適化

最後に、脂溶性の高い食品であるアボカドを用い、残留農薬測定を行いました。Feed 溶媒としては 10 % メタノール水溶液を用いました。図 4 にはアボカドマトリクスに添加した農薬の MRM クロマトグラムを示しました。実サンプルにおいても高極性から低極性のすべての農薬において、ピーク形状の崩れなどは観測されませんでした。アボカドサンプルから得られたマトリクス検量線を図 5 に示しました。すべての農薬で決定係数 0.995 以上の良好な検量線を取得することができました。この時の濃度範囲は 0.1 ~ 10 ng/mL です。以上より、Feed 注入は実際の残留農薬分析においても有効な注入方式であることが確認できました。

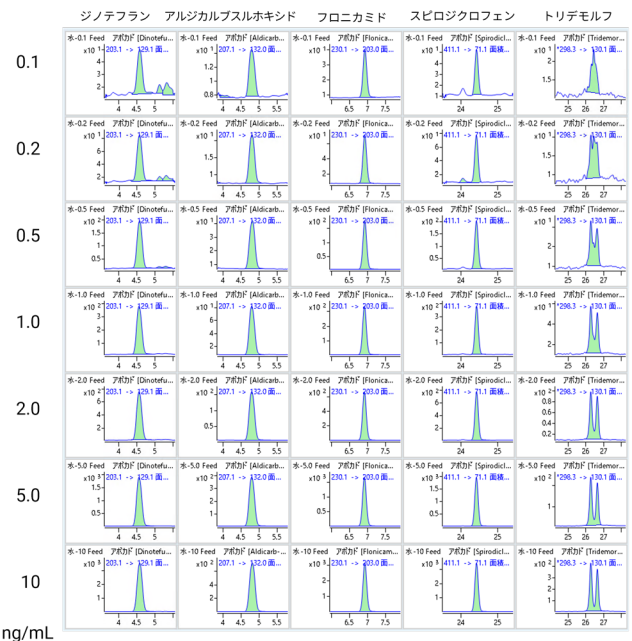


図 4. アボカドマトリクス中の農薬

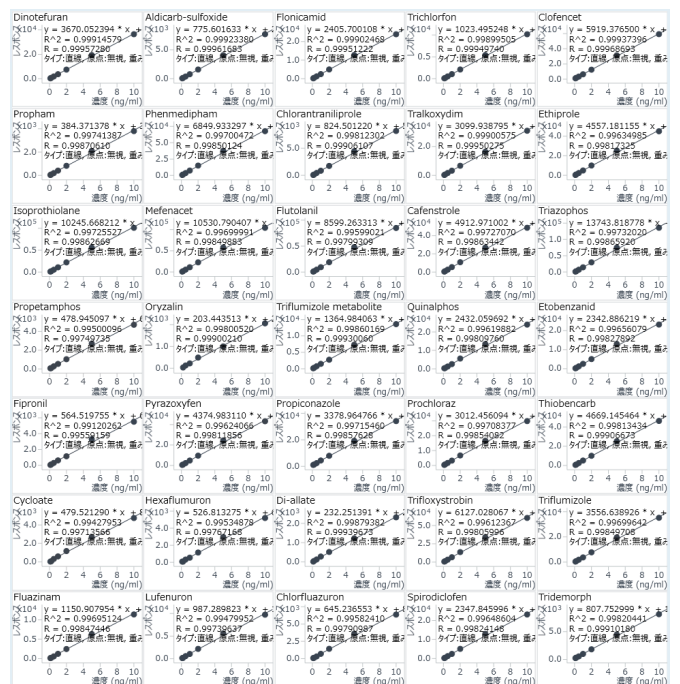


図 5. アボカドサンプルのマトリクス検量線 (全農薬 35 種)

まとめ

Agilent 1260 Infinity II ハイブリッドマルチサンブラはサンプル溶媒の及ぼす影響を最小限にできる Feed 注入法が可能です。このアプリケーションノートでは、残留農薬分析における Feed 注入の有用性を検証しました。その結果、フロースルー注入では、農薬の希釈溶媒としてアセトニトリルを用いると、高極性の農薬のピーク形状が崩れることがわかりました。一方 Feed 注入では、Feed 溶媒には 5～10% メタノール水溶液を用いることで、高極性から低極性の農薬すべてで良好なピーク形状を得ることができました。この画期的な注入法は、残留農薬分析において強力なツールとなると同時に、転溶媒などの作業を削減でき、分析の効率化が図れる可能性が示唆されました。

参考文献

- 1) 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ブラを用いた極性農薬の LC/MS 分析, 5994-6125JAJP (2023)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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。

DE60140142

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, January 17, 2024

5994-7081JAJP