

Agilent 5975T LTM GC/MSD と TSP による 野菜中残留農薬のオンサイト迅速分析

アプリケーションノート

食品検査

著者

Suli Zhao、Andy Zhai
Agilent Technologies (Shanghai) Co., Ltd.
412 Yinglun Road
Shanghai 200131
China

概要

サーマルセパレーションプローブ (TSP) は、農薬などの半揮発性化合物のガスクロマトグラフ (GC) またはガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) に対応する、高速で堅牢、かつ費用の安いアプローチです。TSP を用いれば、サンプル精製が不要になるため、オンサイトでの残留農薬検出において、迅速に定量および確認結果が得られます。可搬型 5975T LTM GC/MSD を用いて、高速メソッドを開発しました。DRS ソフトウェアにより、オンサイトでの残留農薬高速分析が可能になります。



Agilent Technologies

はじめに

野菜中残留農薬の分析に現在用いられているメソッドは、時間と労力、コストのかかるもので、幅広い化合物を検出できないこともあります。アセトンやアセトニトリル、酢酸エチルによる果実や野菜の抽出では、多くの場合、精製ステップにより、夾雑物を除去してから、ガスクロマトグラフでの分析をおこないます。従来のメソッドでは、注入ロライナーやキャピラリカラムでの不揮発性マトリックス成分の蓄積を防ぎ、GC システムのクロマトグラフ性能の劣化速度を低減するために、精製ステップが必要となります。たとえば、米国食品医薬品局 (FDA) は、広範囲の農薬を測定しなければならない場合でも、選択的 GC 検出器を用いた分析を行い、それに先立ち、精製および濃縮が必要とされています。QuEChERS 法を用いれば、野菜から残留農薬を迅速に抽出し、前処理プロセスの時間を短縮できることが実証されていますが、この手法は、より速いサイクルと溶媒コストの削減が求められるオンサイト分析にはあまり適していません。多くの場合、固相抽出 (SPE) や液液分配、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) などの精製テクニックが採用されますが、サンプル前処理の総時間が長くなり、メソッドのコストも増加し、農薬回収率の低下につながることもあります。

GC 注入用の TSP は、サンプル前処理時間を短縮しながら、複雑なマトリックスにおける堅牢な分析アプローチを実現する手法です。TSP では、少量のサンプルまたは液体抽出物を 40 µL 使い捨てマイクロバイアルに入れます。サンプルとマイクロバイアルをマニュアルで GC/GCMS 注入口に入れ、急速に加熱して、サンプル中の農薬などの半揮発性化合物を加熱抽出します。TSP アプローチのおもな利点は、従来の注入アプローチでは GC ライナとカラムを汚染することがある不揮発性マトリックス成分が、マイクロバイアルの内部に留まり、注入のたびに廃棄できることです。TSP と加熱抽出を用いれば、バイアルから揮発する化合物のみがカラムに導入されます。これまでに、PTV インジェクタと同様のプローブを用いたアプリケーションが多く発表されています [1]。

このアプリケーションノートでは、TSP ツールとホットスプリットレス注入を用いて、精製ステップなしで前処理した野菜中農薬の検出について、Agilent 5975T LTM GC/MSD の性能を評価しま

した。TSP により精製ステップなしで複雑な抽出をおこなう場合、多くの半揮発性マトリックス成分の存在下で分析対象化合物を測定するために、選択的検出テクニックが必要となります。アジレントの DRS ソフトウェアと RTL 機能は、短時間で半揮発性マトリックスからターゲット化合物を抽出できる優れたツールです。このアプリケーションでは、高速昇温オープンと高速冷却サイクルを備えた 5975T LTM GC/MSD により、超高速サンプル分析を実現しています。

ポイント

- TSP (サーマルセパレーションプローブ)
- アジレントの RTL 農薬ライブラリおよび DRS ソフトウェア
- サンプル分析後、ブラインド添加複数農薬を 2~3 分で確認
- 可搬型 5975T LTM GC/MSD

実験手法

必要なソフトウェア

- G1701EA GC/MS ChemStation (最新バージョン)
- G1716 MSD デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (バージョン A.04.00 以上)
- G1033A NIST08 質量分析ライブラリ + AMDIS + NIST ライブラリ検索
- G1675AA 日本ポジティブリスト

試薬と化合物

すべての試薬は、分析グレードまたは HPLC グレードのものを使用しました。農薬は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から購入しました。

水は MilliQ システム (ミルフォード、マサチューセッツ州、米国) から入手しました。

装置と材料

実験には、Agilent 5975T LTM GC/MSD を使用しました。抽出には、Agilent サンプリーク QuEChERS AOAC 抽出キット (部品番号 5982-5755) を使用しました。

機器条件

表 1. 機器と分析条件

機器

GCMS システム	Agilent 5975T LTM GC/MSD
注入口	スプリット/スプリットレス (ライナー: 5062-3587)
カラム	HP-5 ms LTM 10 m x 0.18 mm x 0.18 μ m
ガードカラム	分析カラムと同じ液相の 1 m カラム、 インジェクタ側に接続

実験条件

注入口温度	260 °C
注入量	1 μ L
注入モード	スプリットレス; 1 分後にパージ: 100 mL/min
キャリアガス	ヘリウム
ヘッド圧力	1.6 mL/min、コンスタントフローモード
LTM オープン温度	50 °C (0.2 分)、125 °C /min、125 °C (0 分)、 50 °C/min、300 °C (2 分)
メソッド	クロロピリホスメチルを 2.70 分で RT ロック
トランスファーライン温度	260 °C

MSD インターフェース	270 °C
イオン源	230 °C
四重極温度	150 °C
イオン化モード	EI
スキャンモード	フルスキャン、50~550 m/z
EMV モード	ゲイン係数
ゲインファクター	5.00
EM 電圧	1129 V
溶媒ディレイ	0.5 分

サンプル前処理

サンプル

農薬が含まれない有機栽培のキュウリ、トマト、ピーマンを地元の食品店で購入しました。一定数の農薬を異なる濃度でサンプルに添加しました。

サンプル前処理

抽出/分画

キュウリおよびトマト約 1 ポンドを小さく刻み、豆粒大にしました。2 つのセラミックホモジナイザー (部品番号 5982-9313) を 50 mL 遠心分離チューブ (サンプリーク QuEChERS 抽出キットに付属) を入れ、あらかじめホモジナイズしたサンプル 15 g (\pm 0.1g) を同じチューブに入れました。QC サンプルには、適切な QC 添加溶液 100 μ L を加えました。内部標準溶液 100 μ L を、対照ブランクを除くすべてのサンプルに加えました。チューブに蓋をして、

1 分間ボルテックスした後、ディスペンサーを用いて、1% 酢酸含有アセトニトリル 15 mL を各チューブに加えました。次に、無水硫酸マグネシウム 6 g と無水酢酸ナトリウム 1.5 g を含む Agilent サンプリーク QuEChERS 抽出塩キット (部品番号 5982-5755) をチューブに直接加えました。加える前には、塩バッグを注意ぶかく揉み、塊をほぐしました。チューブを調べ、チューブのスレッドや縁に粉末が残っていないことを確認しました。サンプルチューブをしっかりと密閉し、溶媒がサンプル全体と反応し、結晶性の塊がなくなるように、1 分間手でよく振りましました。サンプルチューブを 4,000 rpm で 5 分間、遠心分離し、液層を採取、GCMS に注入しました。

結果と考察

残留農薬検査においては、分析品質を損なわずにコストを削減し、生産性を向上させることが、ますます強く求められるようになっていきます。TSP は、サンプル前処理時間を短縮するための手法となることが実証されています。この研究では、トマト、キュウリ、ピーマン抽出物を用いて、ピークディスクリミネーションや再現性といった TSP の農薬検出性能を評価しました。LTM カラムでは、カラム温度を高速で加熱冷却できるため、分析時間とサイクルタイムがさらに短縮されます。

TSP を用いたオンサイト農薬検出のための高速メソッドの確立

Agilent GC MXLATOR ソフトウェアツールを用いて、メソッドをより高速化するための分析条件を決定しました。アジレントのメソッドトランスレーション (MTL) と RTL ソフトウェアを組み合わせて、高速メソッドを確立しました。メソッド変換が正確だったため、これらの高速メソッドを、農薬ライブラリとあわせて使用することで、スクリーニングプロセスがよりパワフルでより適応性のあるものとなりました [2]。このソフトウェアを用いて、30 m、0.25 mm、0.25 μ m カラムのメソッドから、10 m、0.18 mm、0.18 μ m カラムの高速メソッドを作成し、分析時間を 5 分の 1 に短縮しました。オリジナルメソッドは、日本ポジティブリストメソッドに基づくものです [3]。また、ライブラリの関連化合物のリテンションインデックスも 5 分の 1 に短縮しました。このアプリケーションノートのすべての結果は、リテンションタイムロッキング (RTL) を使用したものです。

この高速メソッドを用いて、有機リン系農薬、有機塩素系農薬、ピレスロイド系農薬を含む残留農薬分析における TSP の有効性を確かめました。添加濃度は 5.0 μ g/ μ L で、注入量は 1 μ L です。図 1 は、TSP を用いた注入により、すべての種類の農薬で良好なピーク形状が得られることを示しています。ピークディスクリミネーションは生じていません。

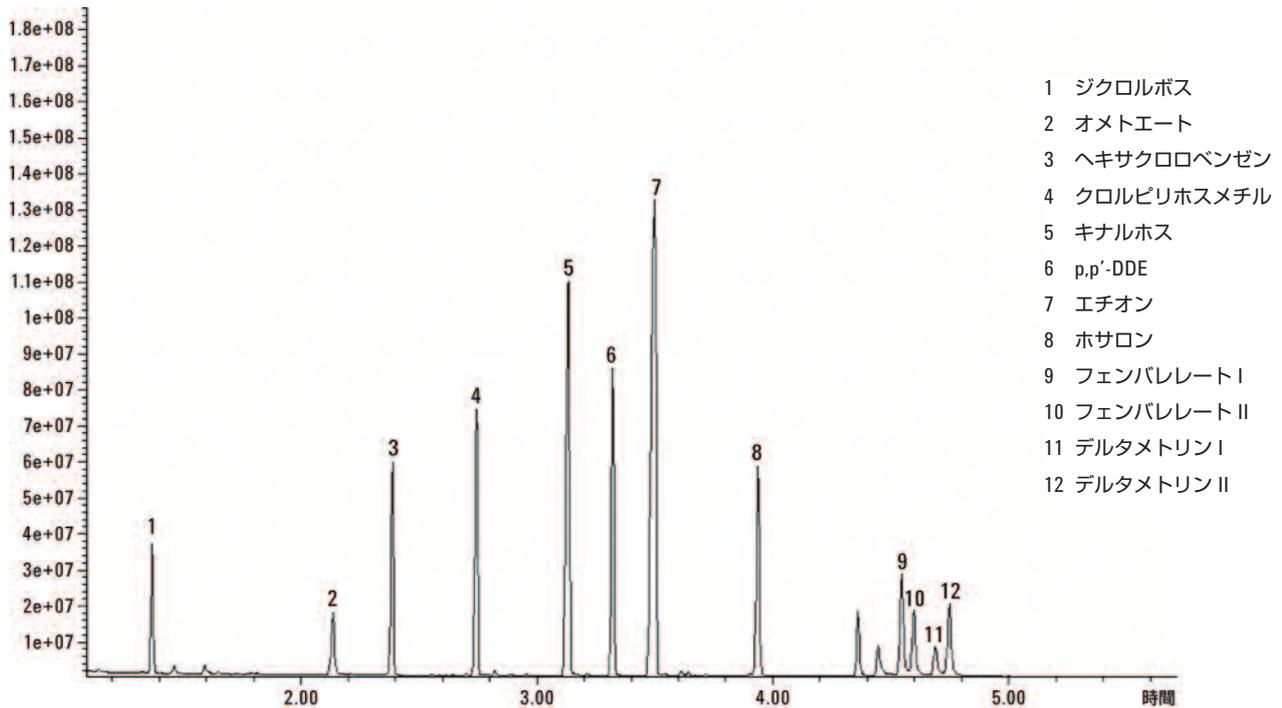


図 1. キュウリ抽出物に含まれる 12 種類の農薬の TIC

TSP の再現性テスト

システムの安定性を評価するために、17 種類の有機塩素系農薬 1.0 µg/mL (アセトン) の標準溶液を分析しました。8 回連続で 1 µL を注入したところ、すべての化合物で 2.3~7.8 % という RSD% が得られました。この RSD は、マニュアル注入の影響を受けている可能性があります。これらの結果はオンサイト分析の要件を満たしています。

TSP のクリーン機能テスト

精製ステップなしでトマト抽出物を 50 回連続で注入し、ベースラインの変動を調べました。抽出物の主成分は、糖、ビタミン、色素です。ほとんどの成分はバイアルに留まり、バイアルから

蒸発する揮発性化合物だけがシステムに導入されました。20 回注入時点で、バイアルが黒っぽい色になりましたが、ライナーはクリーンなままでした。このことは、本来は精製ステップで除去される高沸点のマトリックスが、TSP では除去できていることを示しています。このテストでは、沸点の高い化合物を分析するために、分析時間を長くしました。10 回の注入ごとに、ベースラインを評価しました。図 2 では、5 つのベースラインを比較しています。マトリックスの多いサンプルを注入したあとも、システムがクリーンに保たれていることがわかります。このサンプルは、精製ステップをおこなわずに抽出されたものです。このことは、TSP を用いれば、精製なしでサンプルを分析し、サンプル前処理時間を短縮できることを示しています。

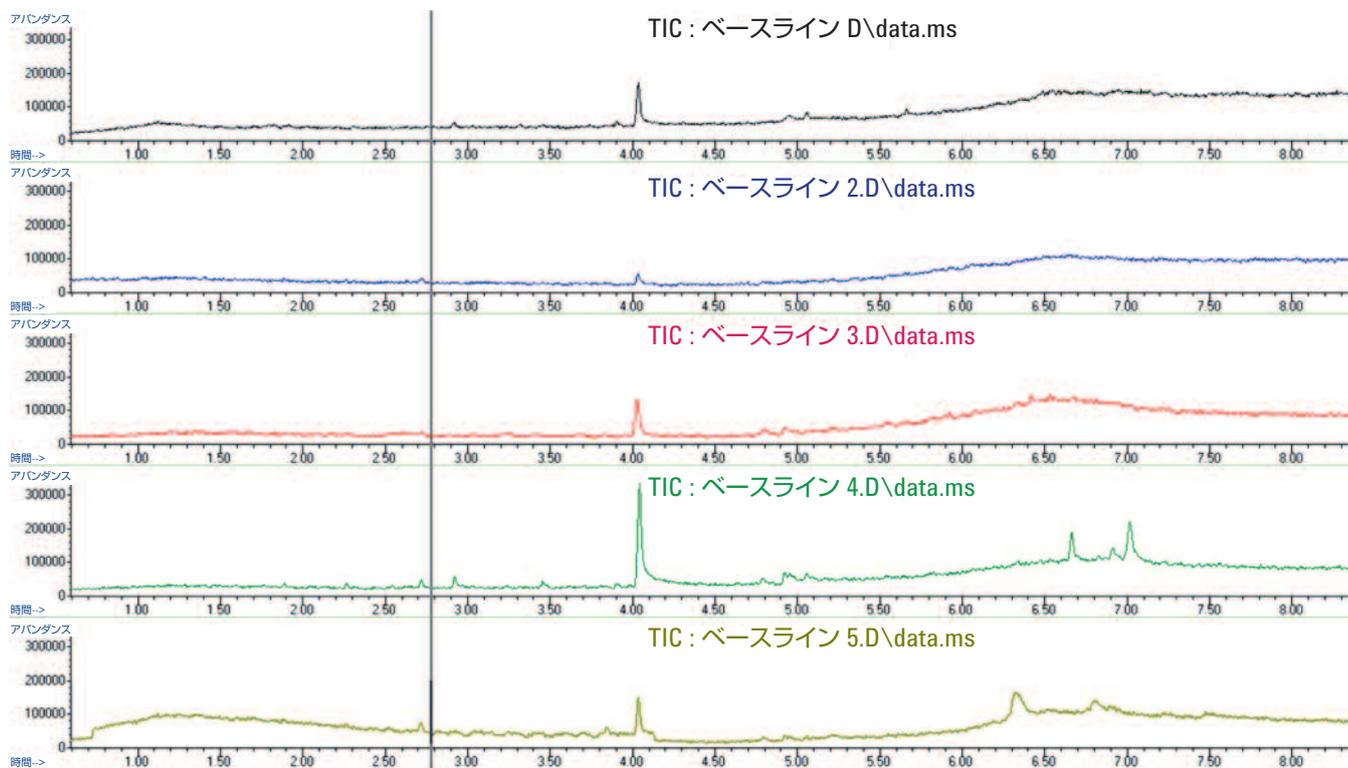


図 2.50 回注入テストのベースライン

TSP を用いたブラインド農薬添加サンプルと 実サンプルの分析

3つの野菜抽出物サンプルに、異なる濃度で異なる農薬を添加しました。3つのサンプルで、80農薬を分析しました。濃度が100 ppb 以上の場合には、TSP 注入とアジレントの DRS ソフトウェアにより、アセフェートとメタミドホスを除くほとんどの分析農薬を確認できました。濃度を500 ppb にした場合には、すべての農薬を DRS で確認できました。図3は、9種類の有機リン系農薬 (各 100 ng/mL) を添加した3サンプル混合物のクロマトグラムを示しています。表2には、結果の DRS レポートを示しています。

トマト抽出物では、添加していない3種類の農薬が DRS により同定および確認されました。同定された農薬は、ピリメタニル、プロシミドン、ジメトモルフです。図4は、AMDIS ソフトウェアにより得られたプロシミドンのマススペクトルを示しています。この図を見ると、デコンボリューションを用いないライブラリ検索だけでは、すべての化合物を同定できない可能性があることがわかります。これらすべての結果は、高速メソッドと TSP に DRS ライブラリを組み合わせれば、未知化合物を同定できることを示しています。

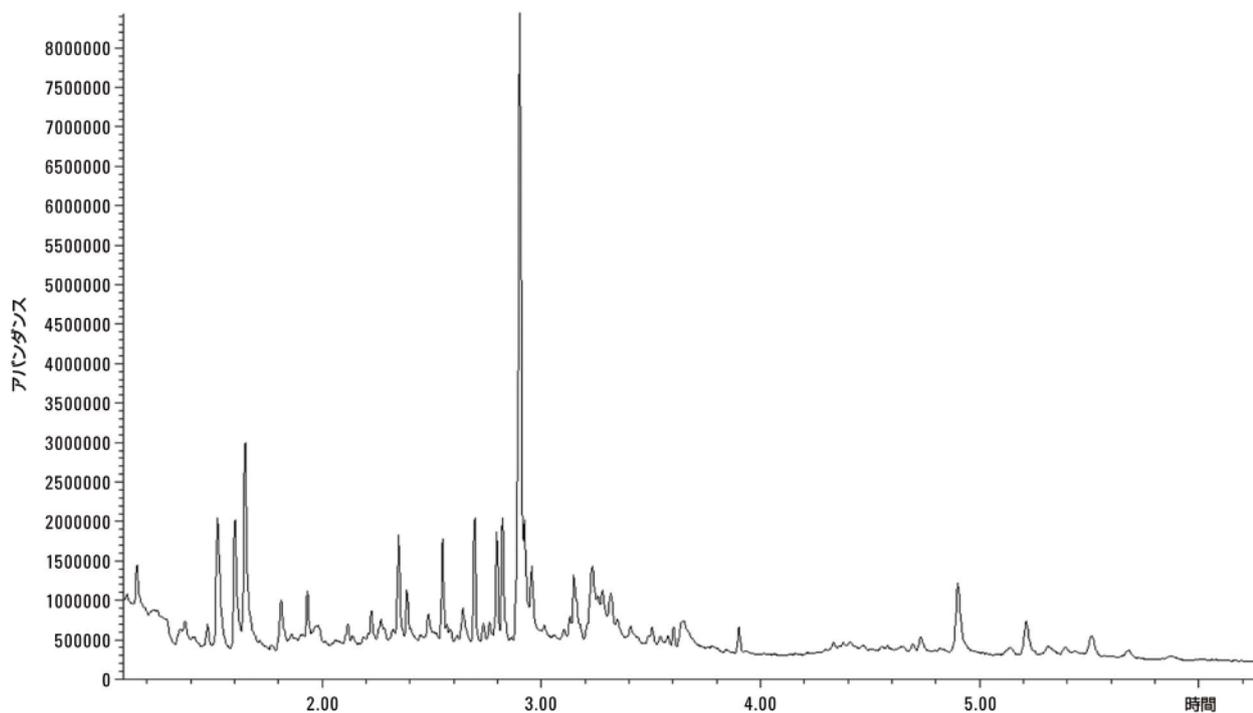


図 3. 100 ppb 農薬を添加した 3 サンプル混合物の TIC

表 2. 図 3 でクロマトグラムを示した 3 サンプル混合物の DRS

R.T.	CAS 番号	化合物名	量 (PPB)		AMDIS		NIST	
			Chemstation	AMDIS	マッチング	R.T. 差 (秒)	リバース マッチング	ヒット数
1.3748	62737	ジクロルボス	98		79	-0.1	74	1
2.2261	13194484	エトプロホス	98		96	-0.2	89	1
2.3503	298022	ホレート	100		97	-0.6	92	1
2.5501	333415	ダイアジノン	100		78	-0.2	74	1
2.7639	298000	メチルパラチオン	100		92	-0.4	81	1
2.8992	121755	馬拉チオン	100		77	-0.1	81	1
2.9245	2921882	クロルピリホス	98		93	-0.3	87	1
2.9565	56382	パラチオン	100		79	-0.3	77	1
3.1993	961115	テトラクロルピホス	98		83	-0.1	82	1

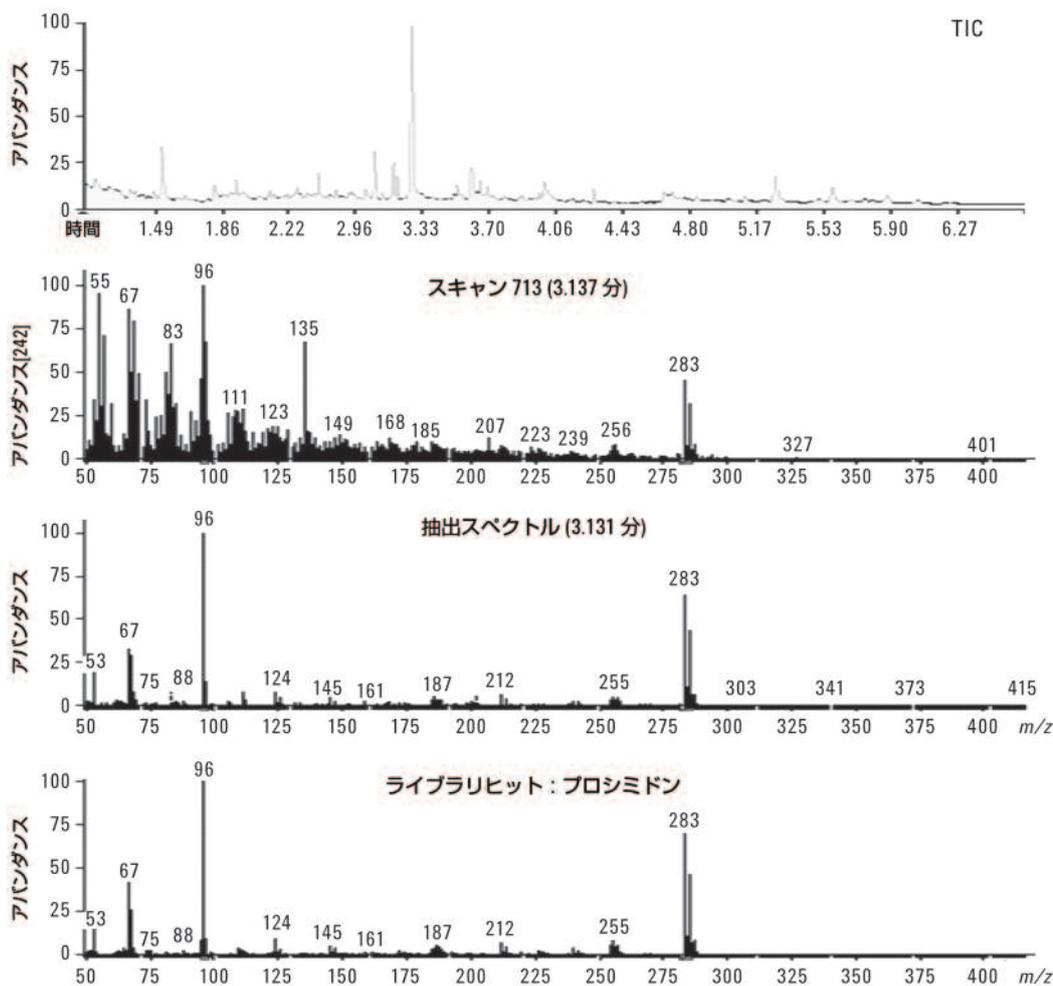


図 4. トマト抽出物に添加していないプロシミドンのデコンボリューションスペクトル

結論

TSP と Agilent 5975T LTM GC/MSD を用いれば、迅速な対応や高速同定といったオンサイトアプリケーションの要件を満たしながら、優れた検出結果が得られます。TSP を用いることで、サンプル前処理時間を短縮し、システムをクリーンに保つことができます。また Agilent DRS ソフトウェアを使うことで、マトリクスからターゲット化合物のスペクトルを抽出し、高速分析メソッドを作成できます。この 3 つの組み合わせにより、農薬分析、特にオンサイトでの検出を迅速化する優れたソリューションが実現します。

参考文献

1. Hongwu Jing and Aviv Amirav*; "Pesticide Analysis with the Pulsed-Flame Photometer Detector and a Direct Sample," *Introduction Device; Anal. Chem. 1997, 69, 1426-1435

2. C. Kai Meng; "Fast Screening of Pesticides and Endocrine Disruptors Using the Agilent 6890/5973N GC/MSD System, Part II, Agilent Technologies publication 5980-1057EN
3. Philip L. Wylie ; 「ポジティブリスト農薬メソッドを用いた食品中農薬のスクリーニング: デコンボリューションソフトウェアとリテンションタイムロックマススペクトルデータベースを搭載した GC/MS 分析の利点」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-7436JAJP

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2011

Printed in Japan

June 8, 2011

5990-8067JAJP



Agilent Technologies