

LC-(SPE)-GC システムを用いた残留農薬分析への応用

(財) 雑賀技術研究所 佐々野僚一 色摩信義 中西豊

【目的】ポジティブリスト制度の導入に向けて、これまで演者らは GC 大量注入法による試料の少量化と固相抽出(逆相モード)による再濃縮を組合せた作物中残留農薬の多成分一斉分析法の検討を行い良好な結果を得てきた^{1),2)}。しかしながら、生姜や油などの加工食品においては数成分の農薬が夾雑物と重なったりして、定性及び定量が困難になることがあった。そこで、多成分一斉分析法で検出された少数農薬の迅速確認分析を目的として、LC-(SPE)-GC システムを開発した。このシステムは HPLC で分離した目的物質を分取し自動的に GC へ導入し分析するため、汚い試料などでもその LC で効率よくクリーンアップが行え、前処理の自動化および簡易化を図ることができる。本研究ではこの LC-(SPE)-GC システムの基礎的な評価と実試料を用いた残留農薬分析への応用を試みたので報告する。

【実験方法】 1. 試料: 細ねぎ、他。

2. 装置および条件:

HPLC (MIDAS;Spark, Agilent 1100)

Injection: 100 μ L, Sample loop
Column: Inertsil ODS-3 3.0 mm i.d. \times 100 mm
Solvents: A: Acetonitrile/Water (50/50)
B: Acetonitrile
Flow rate 0.5 mL/min
Detector: UV 210 nm

Interface SPE (LGI-S100)

SPE: 2 mm i.d. \times 10 mm C18
Fraction Time: 11:40-12:60 (80 sec.)
Diluting: Water 0.5 mL/min
Purge: N₂ gas, 1 min
Elution Solvent: 20%Acetone/Hexane
Elution Volume: 40 μ L

Interface Injector (LVI-S200; EMINET)

Insert: Spiral Insert
Solvent Vent: 10 sec, Purge flow 150 mL/min
Splitless: 3 min
Inj. Temp.: 70°C(3min)-120°C/min-260°C(10min)

GC/MS (QP-5050A; Shimadzu)

Column: Inert Cap 5MS 0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μ m
Oven: 70°C(3min)-20°C/min-280°C(4min)
Carr. gas: He, 1 mL/min
MS: SCAN;50-550 m/z

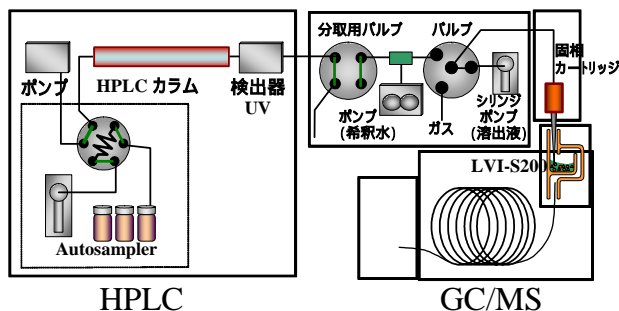


Fig. 1 HPLC-(SPE)-GC/MS System

【動作】目的の農薬が溶出される付近(予め標準溶液で目的物質のリテンションタイムを調べておく)を分取しながらその分取液に水を加えて希釈していく。そしてそのまま固相へ通水させ、農薬を固相へ濃縮させる。窒素ガスで水を除去した後、固相に溶出溶媒を流し、溶出液を直接 GC へ導入し分析する。

【結果と考察】

LC-(SPE)-GC システム: 従来の LC-GC システムの問題点は LC からの分取量が 0.3~1mL で、全量を GC へ注入することが難しいことと LC からの分取液に GC が苦手とする水や極性の溶媒が大量に含まれていることであった。この問題解決のため、LC と GC のインターフェースに固相抽出法をとり入れることで、LC からの分取液を GC へ注入可能な少量の溶媒へ転溶することが可能となった。さらに安定した GC 大量注入法を用いたことで、連続した LC-GC 分析が精度よく行えるようになった。

残留農薬分析: 試験液は HPLC カラムの劣化を防ぐために、試料の抽出液を予め C18 ミニカラムに通したものをを用いた。クロルピリホスを添加した細ねぎ抽出液の LC クロマトグラムとクロルピリホス標準溶液の LC クロマトグラムを Fig.2 に示す。このクロルピリホスのリテンションタイム付近のみを分取して GC へ導入するため、分取部分以外の夾雑物は除去され効率の良いクリーンアップが自動的に行われることがわかった。また、最終的に GC/MS で得られた SCAN クロマトグラムは夾雑物の影響もほとんどなくきれいなクロマトグラムを得た。

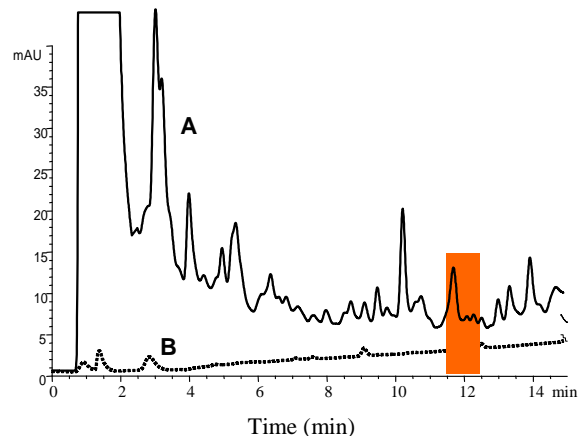


Fig. 2 HPLC chromatogram of a green onion spiked with 0.1 μ g/g of chlorpyrifos (A) and a standard solution of it (B).

Marked fraction transferred to the SPE cartridge.

参考文献 1),2)佐々野, 佐藤, 中西; 食衛学第 87, 88 回講演要旨集

LC-(SPE)-GCシステムを用いた 残留農薬分析への応用

(財) 雑賀技術研究所

佐々野僚一 色摩信義 中西豊

緒言

ポジティブリスト制度の導入に向けて、これまで演者らはGC大量注入法による試料の少量化と固相抽出(逆相モード)による再濃縮を組合せた作物中残留農薬の多成分一斉分析法の検討し報告した。今回、その**多成分一斉分析法で検出された少数農薬の迅速確認分析を目的として、LC-(SPE)-GCシステムの開発を試みた。**このシステムは逆相HPLCで分離精製した目的物質を分取し自動的にGCへ導入し分析するため、汚い試料でもそのLCで効率よくクリーンアップが行え、前処理の自動化および簡易化を図ることができる。本報ではこのLC-(SPE)-GCシステムの基礎的な評価と実試料を用いた残留農薬分析への応用を試みたので報告する。

SAIKA T.I.F.

ポジティブリスト制に向けて



LC-GC システム



逆相HPLCによる大きな試料許容量と幅広い範囲の分離機能により試料の選択性の高いクリーンアップを行い、そしてGCでさらに効率的に分離します。

SAIKA T.I.F.

問題点

- LCからの分取量は 0.3 ~ 1 mL であり、全量をGCへ注入することが困難
- LCからの分取液にGCが苦手とする水や極性の溶媒が大量に含まれている

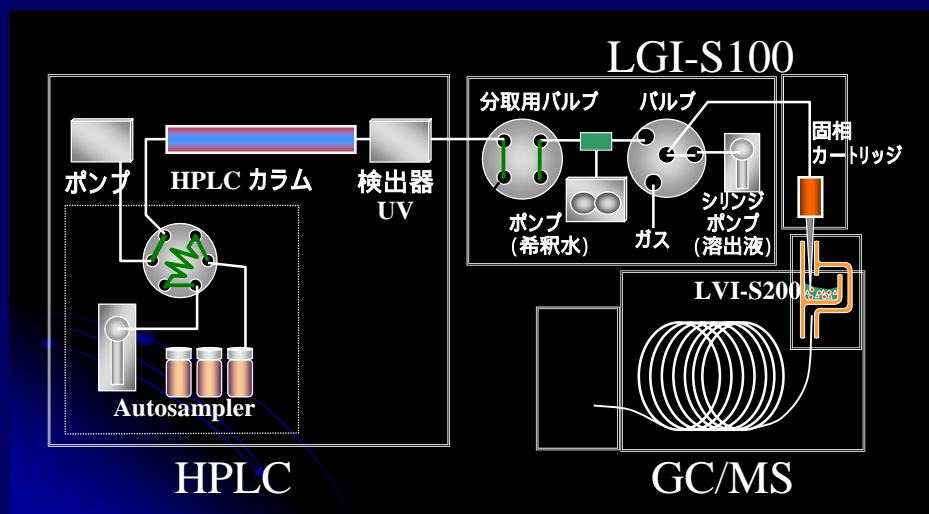


SAIKA解決策

- LCとGCのインターフェースに**固相抽出法 (SPE)**を取り入れることでLCからの分取液をGCへ注入可能な少量の溶媒へ転容する
- **安定したGC大量注入法**の開発

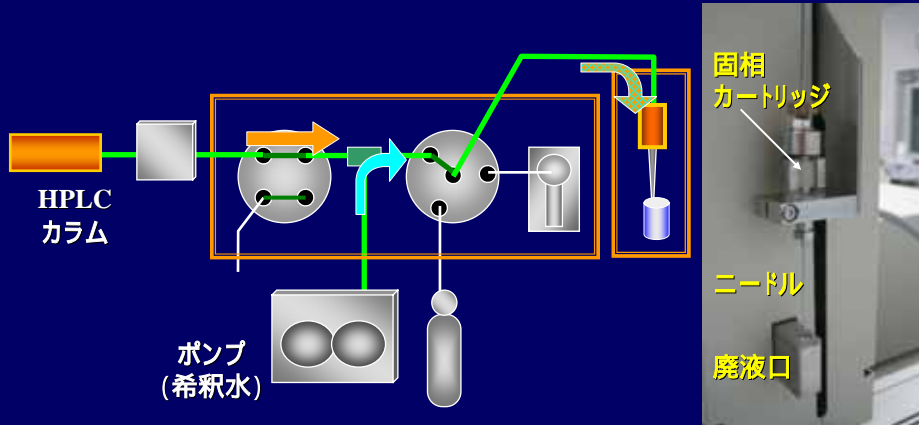
SAIKA T.I.F.

LC-(SPE)-GCシステム



SAIKA T.I.F.

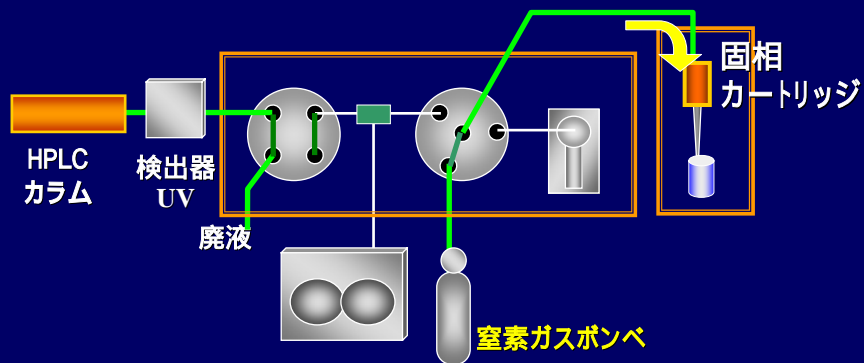
Step-1 分取 & 濃縮



LCから分取しながら水を加えて、希釈させながら固相カートリッジに通し、目的物質を固相に吸着させます。

SAIKA T.I.F.

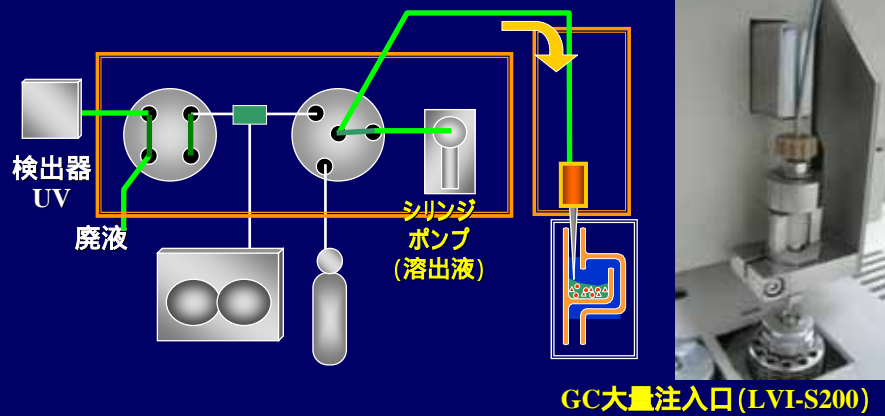
Step-2 乾燥



窒素ガスで配管および固相中に残存しているLCの溶離液および水を除去します。

SAIKA T.I.F.

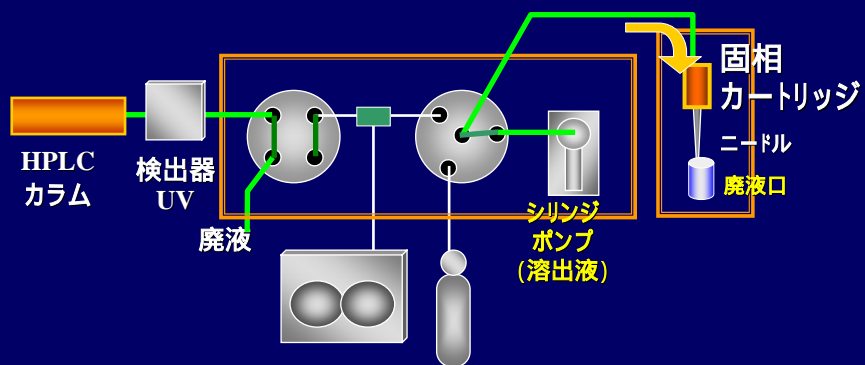
Step-3 溶出 & 注入



固相に溶出液を流し、そのままGCへ導入します。

SAIKA T.I.F.

Step-4 洗浄



溶出溶媒で配管および固相を洗浄します。

SAIKA T.I.F.

大量注入法

GC注入装置

固相カートリッジ

Stomach Insert

1st Stage 2nd Stage 3rd Stage 4th Stage

注入 濃縮 導入 除去

従来のインサート

胃袋型インサート

- ・ インサート内の試料を低い温度でカラムへ導入できるため、熱に弱い農薬などの物質でも分析可能
- ・ 一度に100 μ L以上注入可能

SAIKA T.I.F.

LC-GC/MS条件

<p>HPLC (MIDAS;Spark, Agilent 1100) Injection: 100 μL, Sample loop Column: 3.0 mm i.d. \times 100 mm Inertsil ODS-3 Solvents: A: Acetonitrile/Water (50/50) B: Acetonitrile Flow rate 0.5 mL/min Detector: UV 210 nm</p>	<p>Interface Injector (LVI-S200; EMINET) Insert: Stomach Type Insert Solvent Vent: 10 sec, Purge flow 150 mL/min Splitless: 3 min Inj. Temp.: 70°C(3min)-120°C/min-220°C/min (3min)-50°C/min-260°C(10min)</p>
<p>Interface SPE (LGI-S100) SPE: 2 mm i.d. \times 10 mm C18 Diluting: Water 0.5 mL/min Purge: N₂ gas, 1 min Elution: Hexane, 40 μL</p>	<p>GC/MS (QP-5050A; Shimadzu) Column: 0.25 mm i.d. \times 30 m, 0.25 μm Inert Cap 5MS/Sil Oven: 70°C(3min)-20°C/min-280°C(4min) Carr. gas: He, 1 mL/min MS: SCAN;50-550 m/z</p>

SAIKA T.I.F.

加水量の検討

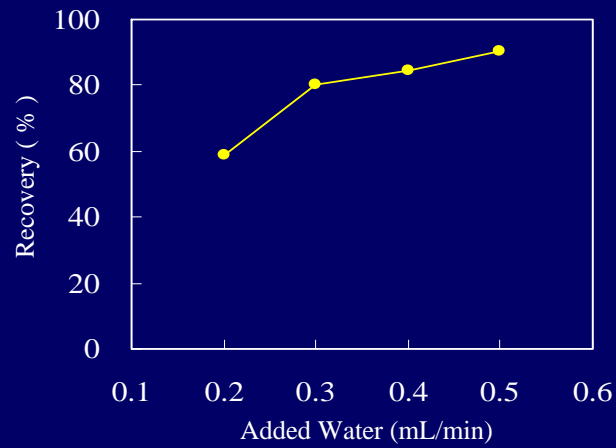


Fig. 1 加える水の流量と回収率の関係

SAIKA T.I.F.

溶出量の検討

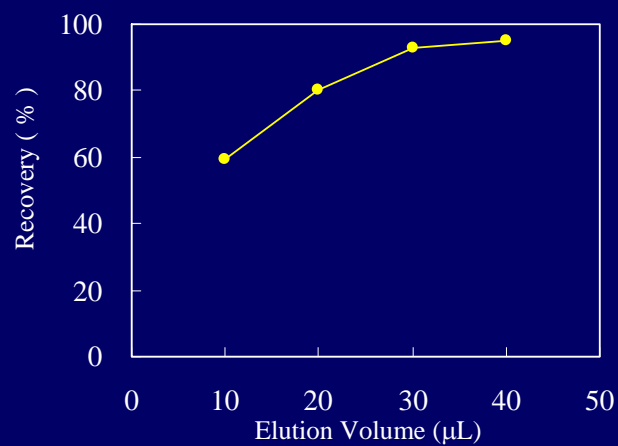


Fig. 2 溶出量と回収率の関係

SAIKA T.I.F.

前処理

試料 10g
|
CH₃CN 20 mL
ホモジナイズ
|
抽出
|
CH₃CN 20 mL
定容
(ろ過液に水を加え 50 mL に定容)
|
分取 2mL (試料 0.4 g 相当)
|
SPE C18 30mg (精製)
|
90% CH₃CN/water 1mL
流出液
|
Water 1mL
定容 (4mL)

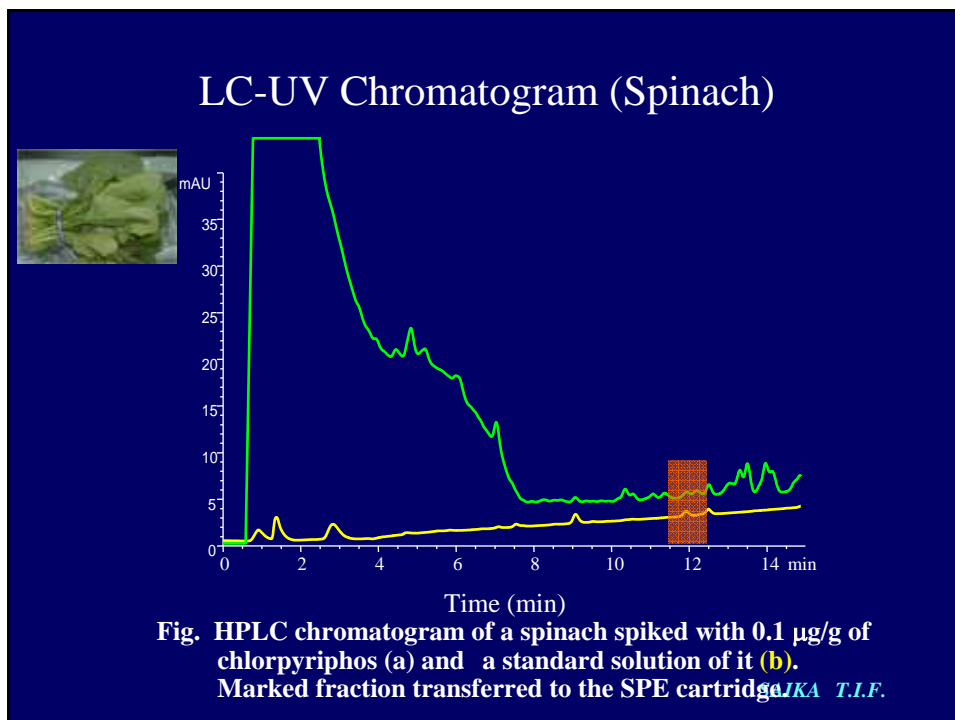


ほうれん草 ピーマン にんじん 細ねぎ



試験液はHPLCカラムの劣化を防ぐために、
試料の抽出液を予めC18ミニカラムに通した
ものを用いた。

SAIKA T.I.F.



LC-GC/MS Chromatogram (Spinach)

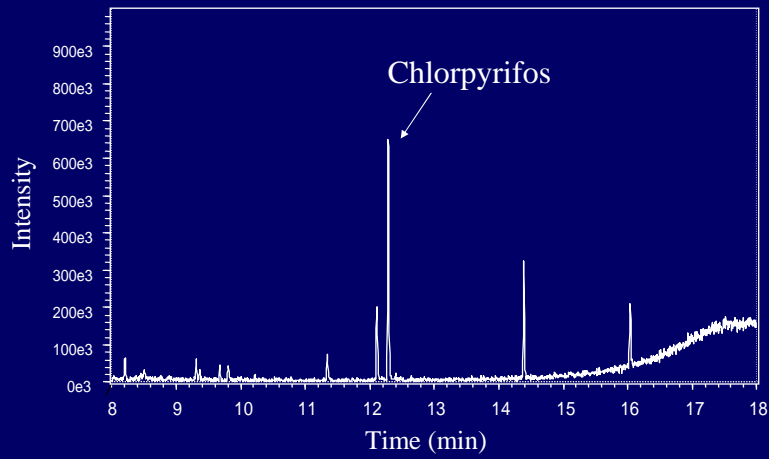


Fig. GC/MS-SCAN chromatogram of the LC-(SPE)-GC/MS analysis of a spinach spiked with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of chlorpyrifos

SAIKA T.I.F.

LC-UV Chromatogram (Green Pepper)

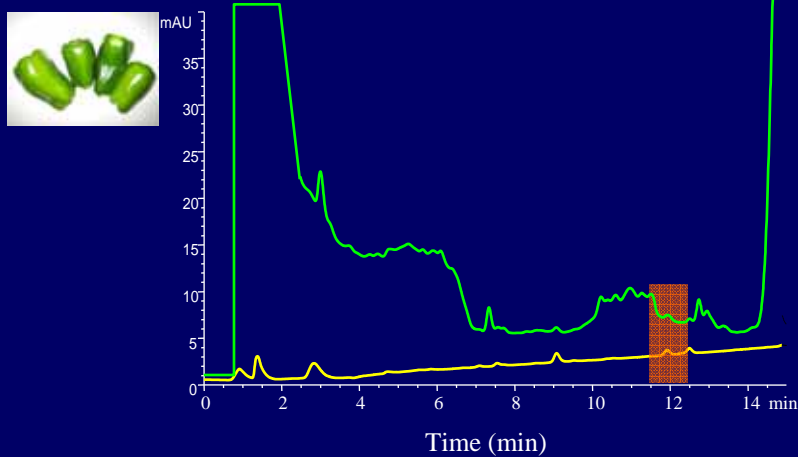


Fig. HPLC chromatogram of a green pepper spiked with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of chlorpyrifos (a) and a standard solution of it (b). Marked fraction transferred to the SPE cartridge. JKA T.I.F.

LC-GC/MS Chromatogram (Green Pepper)

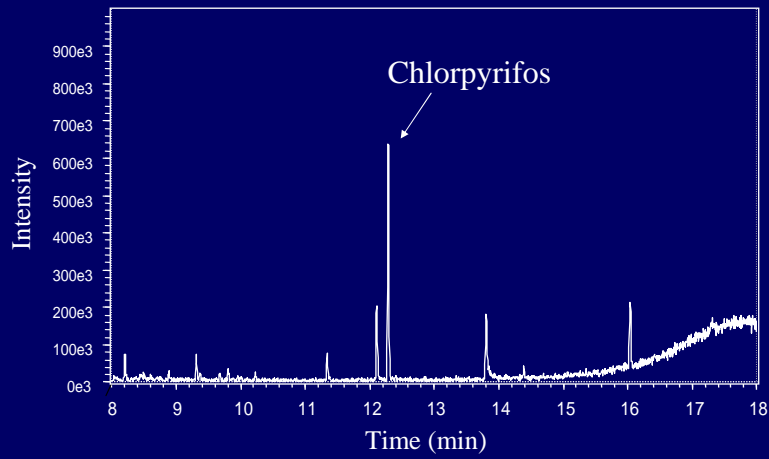


Fig. GC/MS-SCAN chromatogram of the LC-(SPE)-GC/MS analysis of a green pepper spiked with 0.1 µg/g of chlorpyrifos
SAIKA T.I.F.

LC-UV Chromatogram (Carrot)

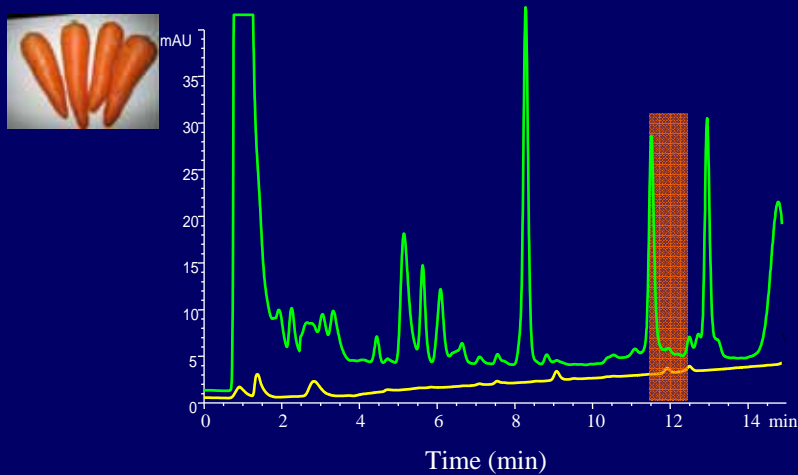
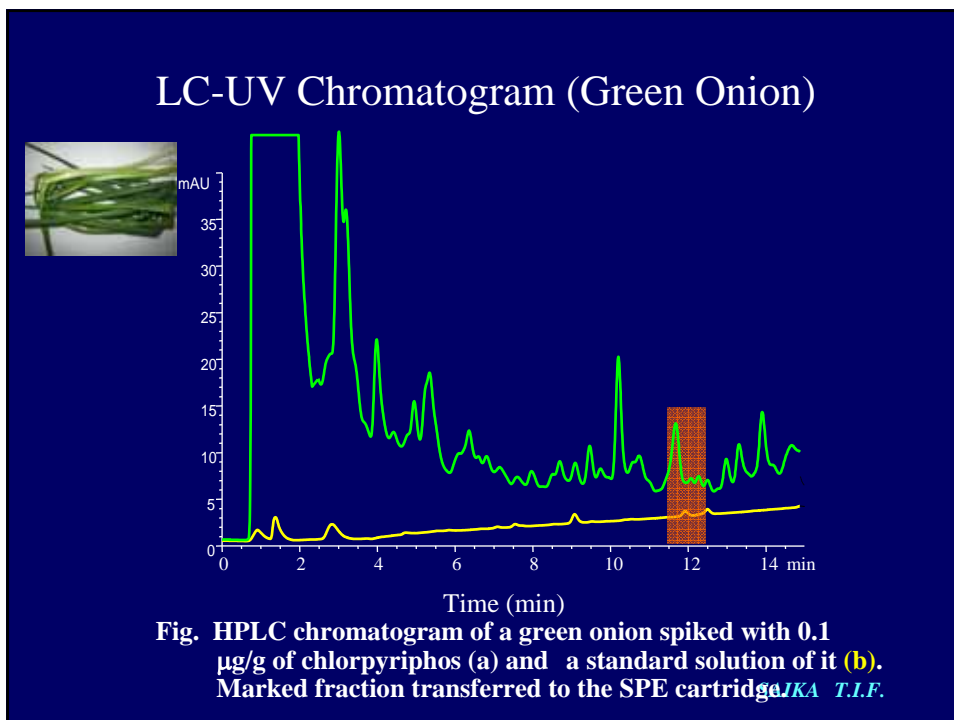
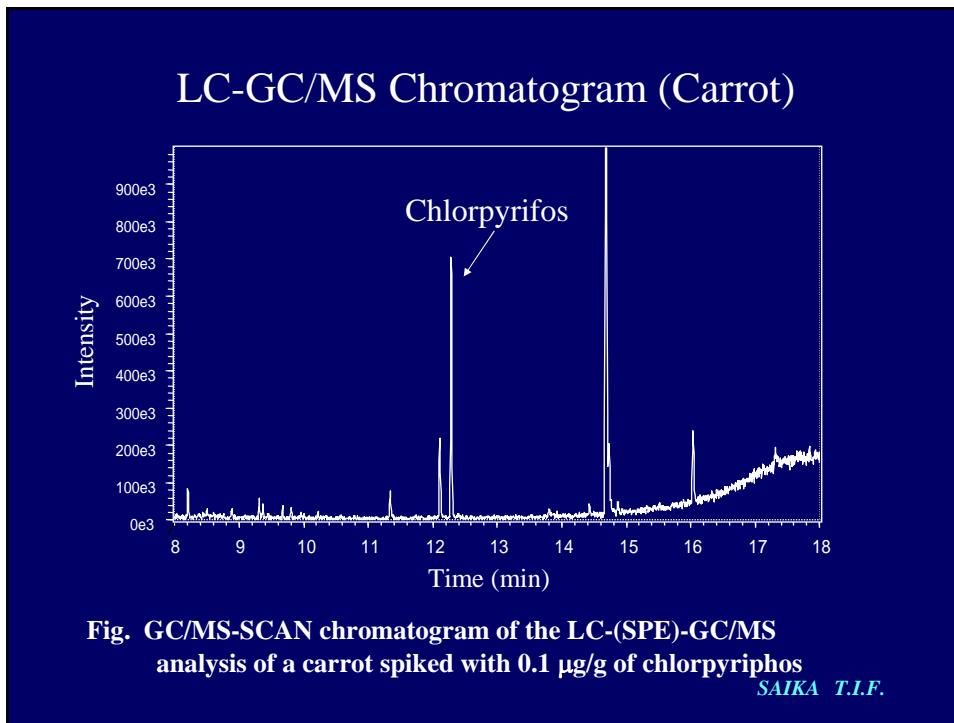


Fig. HPLC chromatogram of a carrot spiked with 0.1 µg/g of chlorpyrifos (a) and a standard solution of it (b).
Marked fraction transferred to the SPE cartridge
SAIKA T.I.F.



LC-GC/MS Chromatogram (Green Onion)

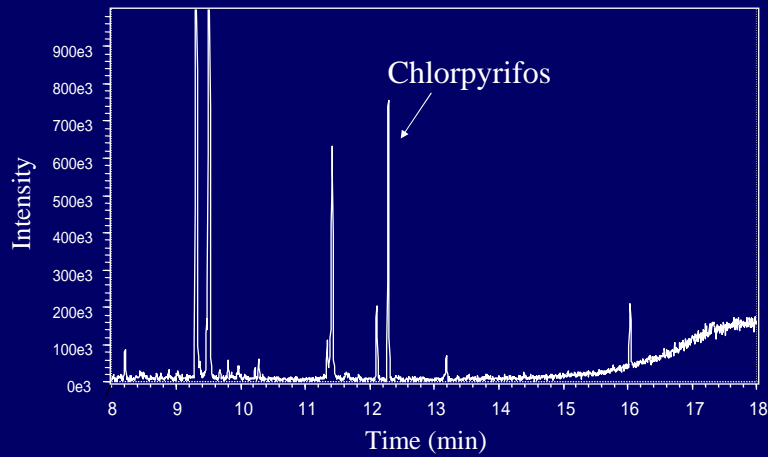


Fig. GC/MS-SCAN chromatogram of the LC-(SPE)-GC/MS analysis of a green onion spiked with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of chlorpyrifos

SAIKA T.I.F.

LC-GC/MSイオンクロマトグラム (Green Onion)

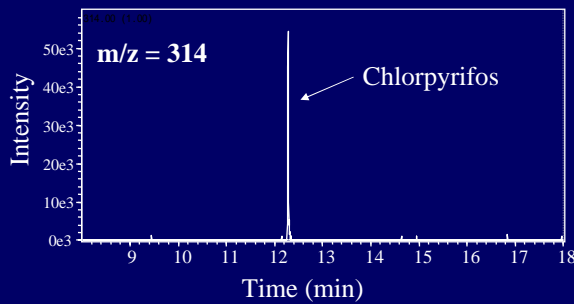
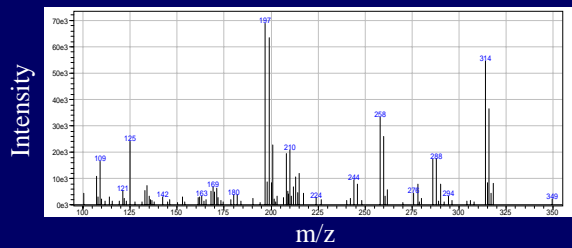


Fig. GC/MS-SCAN ion chromatogram and spectrum of the LC-(SPE)-GC/MS analysis of a green onion spiked with 0.1 $\mu\text{g/g}$ of chlorpyrifos



SAIKA T.I.F.

まとめ

- LCとGCのインターフェースに固相抽出法を取り入れることで、LCからの分取液をGCへ注入可能な少量の溶媒へ転溶することが可能となった。
- 安定したGC大量注入法を用いたことで、連続したLC-GC分析が精度よく行えるようになった。
- 逆相HPLCを前処理として使用することで効率のよいクリーンアップが自動的に行われることがわかった。
- GC/MSで得られたSCANクロマトグラムは夾雑物の影響もほとんど受けておらず、確認分析法として十分に活用できることが分かった。
- また、本装置は前処理の簡易化および省略化が図れ、機器による制度管理や保証などにおいても有効であると思われる。

SAIKA T.I.F.