

Carbon S と従来型グラファイトカーボン 前処理製品の色素除去性能比較

著者

山下 和之
栗原 絵里奈

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

農産物の農薬一斉分析法の前処理においてクロロフィルをはじめとする植物由来の色素の除去は分析を安定に行なうために不可欠です。厚生労働省の通知法¹⁾にも Carbon/NH₂ カラムの使用が推奨されており、QuEChERS 法²⁾の分散固相抽出 (dSPE) においてもアメリカの公定法 AOAC.2007.01 法 (以下 AOAC 法)、EU の公定法 EN 15662 法 (以下 EN 法) の両方で、色素のあるサンプルについてはグラファイトカーボン (以下 GCB) のバルクを添加することが推奨されています。一方で GCB は平面構造をした農薬を吸着し、回収率を低下させることが課題となっています³⁾。Carbon S は平面構造農薬の回収率を改善した色素除去用の新しい充填剤です。今回はハウレンソウの抽出液を使用して従来型 GCB 充填剤と Carbon S の色素除去能力を比較し、Carbon S の色素除去能力が従来型 GCB 充填剤と遜色がないことを確認しました。

はじめに

厚生労働省の通知法¹⁾の中の「GC/MS による農薬等の一斉分析法」と「LC/MS による農薬等の一斉分析法 I」では、抽出液からクロロフィルをはじめとする色素を除去するためにグラファイトカーボン/アミノプロピルシリル化シリカゲル積層ミニカラム (500 mg/500 mg) の使用が推奨されています。また、QuEChERS 法²⁾の中の dSPE の工程で、AOAC 法では色素のある野菜、果実には 400 mg の GCB のバルクを使用することが、EN 法では色の濃い野菜、果実には 45 mg、色のある野菜、果実には 15 mg の GCB のバルクを使用することが推奨されています。

一方で、GCB は平面構造のある農薬の回収率を低下させることが問題となっています³⁾。新規の充填剤 Carbon S は平面構造の農薬の回収率を改善し、一方で色素の除去能力は従来型の GCB に劣らない製品として発売されました。

本研究では Carbon S の色素除去能力を検証するためにホウレンソウの抽出液を用いて従来型の GCB 充填剤とその性能を比較しました。

システム

表 1. 装置構成

型番	装置名
G7111B	1260 Infinity II クォータナリポンプ
G7167A	1260 Infinity II マルチサンブラ
G7116A	1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット
G7117C	1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器

実験方法

材料

試薬は以下のものを使用しました。

アセトニトリル	関東化学 LC/MS 用 01033-23
メタノール	関東化学 LC/MS 用 25185-79
アセトン	関東化学 HPLC 用 01026-1B
超純水	ミリ Q 水
酢酸	関東化学 HPLC 用 01021-97

固相抽出カラムは以下のものを使用しました。

固相抽出カラム種類	部品番号
Bond Elut Carnon/NH2 500 mg/500 mg/6 mL	12252202
Bond Elut Carnon/PSA 500 mg/500 mg/6 mL	12102042C500
Bond Elut Carbon S/NH2 500 mg/500 mg/6 mL	5610-2084
Bond Elut Carbo S/PSA 500 mg/500 mg/6 mL	5610-2087

QuEChRS キットは以下のものを使用しました。

抽出キット

種類	部品番号
AOAC 法抽出キット	5982-5755
EN 法抽出キット	5982-5650
セラミックホモジナイザ 50 mL 遠沈管用	5982-9313

分散固相 (dSPE) キット

種類	部品番号
EN 法 色のある野菜・果実用150 mg PSA、 15 mg GCB	5982-5256
EN 法 色の濃い野菜・果実用150 mg PSA、 45 mg GCB	5982-5356
AOAC 法 色のある野菜・果実用400 mg PSA、 400 mg GCB	5982-5258
AOAC 法 色と脂質のある野菜・果実用400 mg PSA、400 mg GCB、400 mg C18	5982-5456
EN 法 色のある野菜・果実用150 mg PSA、 15 mg Carbon S	5610-2072
EN 法 色の濃い野菜・果実用150 mg PSA、 45 mg Carbon S	5610-2076
AOAC 法 色のある野菜・果実用400 mg PSA、 400 mg Carbon S	5610-2064
AOAC 法 色と脂質のある野菜・果実用400 mg PSA、400 mg Carbon S、400 mg C18	5610-2068
セラミックホモジナイザ 15 mL 遠沈管用	5982-9312

パススルークリーンアップ用 Captiva

種類	部品番号
Captiva EMR HFC1 Carbon S/NH2	5610-2088
Captiva EMR HFC2 Carbon S/PSA	5610-2089

ハウレンソウはスーパーマーケットで購入しました。

試料調製

〈抽出〉

QuEChERS 法²⁾に従い、ハウレンソウをホモジナイズし、ホモジネートを EN 法は 10 g、AOAC 法は 15 g 計量して 50 mL 遠沈管に入れ、セラミックホモジナイザ 50 mL 遠沈管用を 2 個入れました。抽出溶媒として EN 法はアセトニトリル 10 mL、AOAC 法は 1% 酢酸含有アセトニトリル 15 mL を加え、1 分間振とうしました。EN 法、AOAC 法それぞれの抽出キットに含まれている塩類を添加してさらに 1 分間振とうし、3000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

〈分散固相抽出 (dSPE)〉

EN 法用の dSPE キットには EN 法で抽出した抽出液 6 mL を、AOAC 法用の dSPE キットには AOAC 法で抽出した抽出液 8 mL を入れ、セラミックホモジナイザ 15 mL 遠沈管用を 2 個入れて、2 分間振とうして、3000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を試料液としました。

〈固相抽出〉

アセトニトリル 5 mL でコンディショニングを行ない、EN 法で抽出した抽出液 4 mL を通過させ、アセトニトリル 2 mL で 2 回洗浄し、通過液と洗浄液を合わせてアセトニトリルで 8 mL にメスアップしたものを試料液としました。

〈Captiva パススルークリーンアップ〉

EN 法で抽出した抽出液 3 mL を通過させ、マニホールドで減圧してカラムが乾燥するまで全量回収したものを試料液としました。

分析条件

表 2 の条件で HPLC 分析しました。

表 2. 分析条件

カラム	Pursuit XRs 3 C18 3.0 × 150 m (A6001150X030)
カラムオープン	35 °C
移動相	メタノール/アセトン=8/2
流速	0.5 mL/min
注入量	5 µL
検出	UV440 nm

結果および考察

外観上の色調

〈分散固相抽出 (dSPE)〉

EN 法の dSPE で処理した試料液の写真を図 1 に示します。

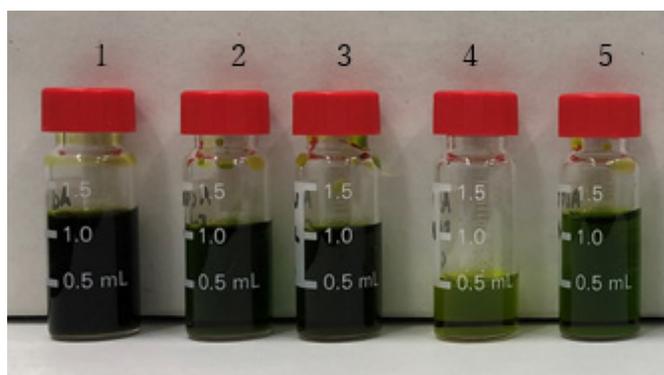


図 1. EN 法 dSPE 処理後の試料液

1 未処理 2 GCB 15 mg 3 Carbon S 15 mg 4 GCB 45 mg 5 Carbon S 45 mg

45 mg のキットでは色素が減少しているのが目視上でも確認できますが、15 mg のキットでは目視上では未処理の場合と識別ができないレベルでした。

AOAC 法の dSPE で処理した試料液の写真を図 2 に示します。

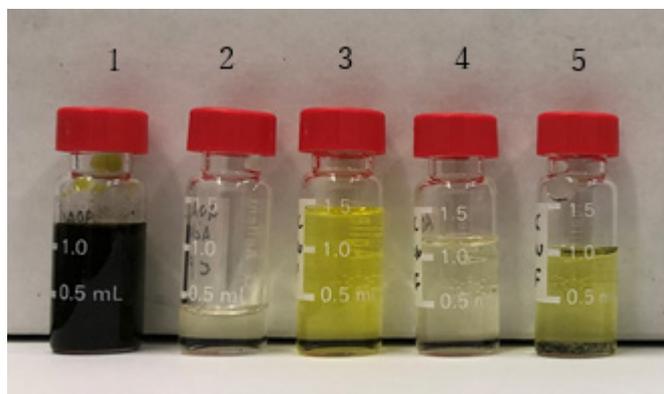


図 2. AOAC 法 dSPE 処理後の試料液

1 未処理 2 GCB 400 mg 3 Carbon S 400 mg 4 GCB 400 mg, C18 400 mg 5 Carbon S 400 mg, C18 400 mg

AOAC 法のキットではカーボン系の充填剤が 400 mg と多く含まれているので EN 法のキットと比べて目視上でも明らかに色素除去効果が認められました。C18 充填剤の有無による差は認められませんでした。

〈固相抽出〉

固相抽出カラムを通過させた試料液の写真を図 3 に示します。

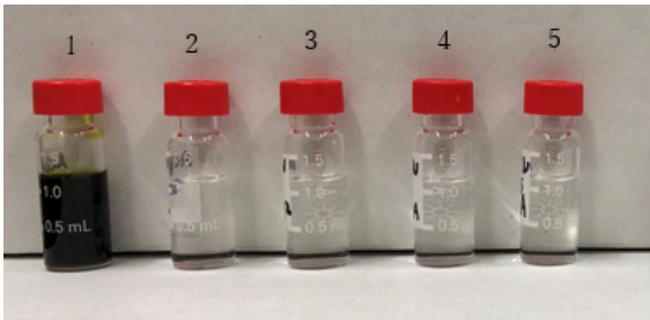


図 3. 固相抽出カラム通過後の試料液
 1 未処理 2 Bond Elut Carbon/NH2 3 Bond Elut Carbon S/NH2
 4 Bond Elut Carbon/PSA 5 Bond Elut Carbon S/PSA

固相抽出カラムを通過させた場合は目視上はほぼ完全に透明になっており、色素除去の効果が高いことが分かりました。

〈Captiva パススルークリーンアップ〉

Captiva パススルークリーンアップカラムを通過させた試料液の写真を図 5 に示します。

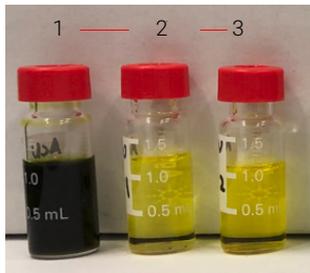


図 4. Captiva パススルークリーンアップカラム通過後の試料液
 1 未処理 2 HCF1 3 HCF2

パススルークリーンアップの場合、固相抽出の場合と比べて若干の色素の残存が見られました。

HPLC による面積値の確認

EN 法で抽出した未処理の試料液を HPLC で分析したクロマトグラムを図 5 に示します。

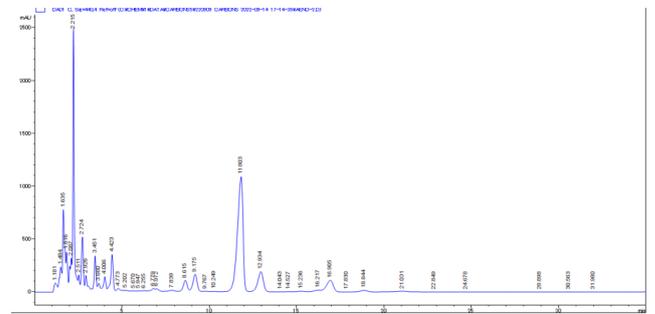


図 5. EN 法で抽出した未処理の試料液のクロマトグラム

緑色を検出する 440 nm ではピークが多数検出されました。未処理の試料液のピーク的面積値の合計を 100 % として各種処理後の試料の HPLC 分析時の面積値の比率から色素の除去率を求めました。

表 3. ピーク面積値から求めた色素残存率

処理法	ピーク面積値	残存率 %
AOAC 法未処理	471599000	100
AOAC 法 GCB	243	0
AOAC 法 Carbon S	936	0
AOAC 法 GCB+C18	159	0
AOAC 法 Carbon S+C18	687	0
EN 法未処理	726419000	100
EN 法 GCB 15 mg	656319000	90.3
EN 法 Carbon S 15 mg	652769000	90.0
EN 法 GCB 45 mg	455510000	62.7
EN 法 Carbon S 45 mg	558324000	77.0
固相抽出 GCB/NH2	243	0
固相抽出 Carbon S/NH2	936	0
固相抽出 GCB/PSA	159	0
固相抽出 Cabn S/PSA	687	0
Captiva HF1	7151	0
Captiva HF2	7542	0

EN 法の dSPE の場合、カーボン系充填剤 15 mg のキットはハウレンソウのような高色素の試料向けではないため残存率 90 % であるのも止むを得ないと言えますが、高色素向けの 45 mg のキットであっても色素は 60 ~ 70 % 程度残存することが判明しました。AOAC 法の dSPE キット、固相抽出、パススルークリーンアップは目視上では若干の色が見える場合はありましたが、HPLC 分析での面積値から判断すると、いずれも元の色素の量に対してほぼ 0 と言えるレベルまで除去できていると言えます。また新規充填剤 Carbon S も従来の GCB に対して遜色ない色素除去能力を持っていることがわかりました。

まとめ

平面構造農薬の回収率を従来型の GCB に対して改善した新規充填剤 Carbon S には、QuEChERS dSPE、固相抽出カラム、パススルークリーンアップカラムの製品があります。ハウレンソウの抽出液を使用してそれらと従来型 GCB 製品とで色素除去能力を比較しました。その結果 Carbon S は従来型 GCB と比べて遜色ない色素除去能力を有していることを確認しました。

参考文献

- 1) 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 | 厚生労働省 (mhlw.go.jp)
- 2) QuEChERS.com
- 3) 小澤祐子・細川明香・山森泰大, 竹田正美, 石川保環研報 第 56 号 (2019) 26-32

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。

DE45897269

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, May 15, 2024
5994-7457JAJP