

Agilent Intuvo 9000 GC および Agilent 7000 シリーズ質量分析計による 多成分残留農薬の分析

アプリケーションノート

著者

Rebecca Veeneman, PhD and
Joan Stevens, PhD
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、7種類のマトリックスに含まれる農薬を Agilent Intuvo 9000 GC および Agilent 7000 シリーズ質量分析計により評価した結果について取り上げます。21種類の農薬の検量線は、濃度範囲1～1,000 ng/mLにおいて良好な直線性を示しました。また、下流にあるコンポーネントを保護し、マトリックス評価後のカラムのトリミングを不要にする Agilent Intuvo Guard Chip を実装することで、一貫性に優れたレスポンスとピーク形状が得られました。50 ng/mL の食品抽出液サンプルを60回注入して得られた平均回収率は80%を超え、RSDは10%未満でした。ライナおよび Intuvo Guard Chip の交換など定期的なメンテナンスを行うことにより、注入を500回繰り返してもピーク形状と回収率が変化しないことがわかりました。



Agilent Technologies

はじめに

農薬の使用拡大に伴い、残留農薬に対する環境問題専門家、規制機関、および消費者の懸念が高まっています。北米 (米国およびカナダ)、欧州 (欧州連合)、アジア (日本)、およびオーストラリアでは、食品中またはその表面から検出される可能性のある農薬の最大残留基準値 (MRL) に関する規制が定められています。米国では、マトリックスおよび規制対象の農薬に応じて MRL を 0.02 ~ 100 ppm に規定しており¹、欧州委員会ではデフォルト値を 0.01 ppm としています²。

食品中の農薬残留物の分析には、一定のサンプル前処理が必要になります。少なくとも、サンプルをホモジナイズし、クロマトグラフィーに適した溶媒に抽出しなければなりません。農薬の抽出には、アセトニトリルへの抽出と硫酸マグネシウムによる塩析を同時に行える

QuEChERS 抽出法が広く使用されています。さらに、分散固相抽出 (dSPE) によるクリーンアップが行われる場合もあります³。ところが、このような抽出プロセスを行っても、サンプルには比較的多くの夾雑成分が残ります。その結果、バックグラウンド信号が高くなり、正確な同定および定量の妨げになることがあります。

複雑な農薬の分析には、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) が適しています。ただし、要求される定量下限と MRL 範囲を得るには、妥当な直線範囲と低い検出下限を実現可能な多成分残留農薬用のメソッドが必要です。この理由から、低濃度の農薬のスクリーニング、確認、および定量には、タンデム質量分析計 (MS/MS) が有効です。低い定量下限が得られるだけでなく、マトリックスによる干渉を最小限に抑えることができます⁴。

クロマトグラム上のマトリックス干渉は、MS/MS で可能なマルチリアクションモニタリング (MRM) を使用することで低減できます。ただし、サンプルからマトリックスが除去されるわけではないため、マトリックスの注入によって信号の損失やピークテーリングが生じる可能性があります。この影響は、バックフラッシュの使用によりある程度抑えることができますが、システムの性能を完全に維持するためには、ライナの交換やカラムのトリミングなどのメンテナンスを慎重かつ頻繁に行う必要があります。Agilent Intuvo 9000 GC には、Intuvo の不活性な流路の一部として Intuvo Guard Chip が採用されています。この Guard Chip により、カラムのトリミングが不要になるため、同じリテンションタイムを維持できるうえ、カラムの寿命を延ばすことができます。

このアプリケーションノートでは、Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS と、Agilent Intuvo HP-5ms UI カラムを装着した Intuvo 9000 GC を組み合わせて使用しました。このシステムで 7 種類の食品マトリックスをサンドイッチ注入により分析し、時間の経過による検量線の直線性と分析対象物の回収率を評価しました。

実験方法

100 µg/mL のカスタム農薬標準混合液 2 種類を Ultra Scientific 社 (米国ロードアイランド州ノースキングストン) から入手しました。この 2 種類の混合物をそれぞれの溶媒に加え、10 µg/mL の原液を調製しました。さらに、これらの原液を組み合わせてアセトンに加え、1 µg/mL の作業用標準溶液を調製しました。この作業用標準溶液をさらにアセトンで希釈し、1、5、10、50、100、200、および 500 ng/mL の標準溶液を調製しました。それぞれの重水素化多環芳香族炭化水素 (PAH) は AccuStandard 社 (米国コネチカット州ニューヘイブン) から入手しました。各 PAH をアセトンに溶解し、8 µg/mL の作業用原液を調製しました。この作業用原液を各農薬標準溶液に 40 ng/mL で加え、内部標準として使用しました。標準溶液は 3 °C で保管しました。表 1 に、農薬および内部標準のリストを示します。

表1. ターゲット農薬と内部標準の化合物名

番号	化合物
1	1,4-ジクロロベンゼン-d4
2	ナフタレン-d8
3	メタクリホス
4	アセナフテン-d10
5	エタルフルラリン
6	スルホテップ
7	デメトン-S
8	シマジン
9	リンデン
10	フェナントレン-d10
11	クロルピリフォスメチル
12	フェニトロチオン
13	アルドリン
14	ベンジメタリン
15	トリフルアニド
16	ディルドリン
17	ピリメート
18	トリアゾホス
19	クリセン-d12
20	イプロジオン
21	EPN
22	ホサロン
23	マイレックス
24	クマホス
25	ペリレン-d12
26	ピラクロストロビン
27	デルタメトリン

L-グルクロラクトンの原液を調整するために、10 mL 計量フラスコに L-グルクロラクトン 500 mg を計量し、水 (4 mL) を加えた後、10 mL のマークまでアセトニトリルで希釈しました。これとは別に、D-ソルビトール 500 mg を 10 mL 計量フラスコに入れ、水 5 mL を加えた後、マークまでアセトニトリルで希釈しました。この 2 つの原液を 10 mL 計量フラスコに入れて混ぜ合わせ、マークまでアセトニトリルで希釈して、分析対象物保護溶液 (20 mg/mL の L-グルクロラクトンおよび 10 mg/mL の D-ソルビトール) を調製しました。

今回の分析用に、7 種類のマトリックスを調製しました。これらのマトリックスは QuEChERS 法で抽出し、その際にさまざまな dSPE を用いてマトリックスクリーンアップを行いました。

オリーブ油 3 g と水 7 mL を 2 個のセラミックホモジナイザとともにチューブに入れ、2 分間ボルテックスしました。次に、アセトニトリル (ACN) 10 mL を加え、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。その後、QuEChERS EN 塩 (p/n 5982-5650) を加え、チューブを GenoGrinder 垂直振とう機にセットして 2 分間振とうし、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。1 g の EMR Lipid 充填剤が入った EMR Lipid チューブ (p/n 5982-1010) に水 5 mL を加え、30 秒間ボルテックスしました。活性化した EMR Lipid に ACN 抽出液 5 mL を加え、2 分間ボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液すべてを 50 mL 遠心分離チューブに静かに移し、脱水キットパック (p/n 5982-0102) 全量を加えました。チューブに蓋をして十分にボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 4 mL を脱水キットパックの 300 mg/mL 抽出液とともに 15 mL 遠心分離チューブに移し、チューブをボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

ホモジナイズしたキュウリ 10 g または蜂蜜 5 g と水 5 mL をセラミックホモジナイザとともにチューブに入れ、2 分間ボルテックスしました。次に、ACN 10 mL を加え、混合液を 2 分間ボルテックスしました。その後、QuEChERS EN 塩を加えてチューブに蓋をし、GenoGrinder 垂直振とう機にセットして 2 分間振とうし、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 6 mL を一般的な果物および野菜用の QuEChERS dSPE (p/n 5982-5056) に移し、2 分間ボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

ホモジナイズしたタマネギ 10 g、ホモジナイズしたオレンジ 10 g、またはホモジナイズした米 3 g と水 7 mL を 2 個のセラミックホモジナイザとともにチューブに入れ、ボルテックスしました。次に、ACN 10 mL を加え、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。その後、QuEChERS EN 塩を加えてチューブに蓋をし、GenoGrinder 垂直振とう機にセットして 2 分間振とうし、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 6 mL を高脂質マトリックス用の QuEChERS dSPE (p/n 5982-5256) に移し、2 分間ボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

ホモジナイズした茶 3 g と水 7 mL をセラミックホモジナイザとともにチューブに入れ、ボルテックスしました。次に、ACN 10 mL を加え、サンプルを 2 分間ボルテックスしました。その後、QuEChERS EN 塩を加え、チューブを GenoGrinder 垂直振とう機にセットして 2 分間振とうした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。抽出液 6 mL を色素の多いマトリックス用の QuEChERS dSPE (p/n 5982-5256) に移し、2 分間ボルテックスした後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

最終的な遠心分離後に抽出液を 4 mL バイアルに移し、分析まで -20 °C で保管しました。

機器

すべての試験には、Agilent Intuvo 9000 GC に Agilent 7693B オートサンプラおよび Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 MS を接続したシステムを使用しました。Intuvo 9000 の不活性な流路は、Agilent Intuvo 15-m HP-5ms UI カラムを用いたシンプルな MS システムとして構成しました。分析時には、農薬および環境汚染 (P&E) MRM データベース (p/n G9250AA rev A.1.01) のトランジションをもとに MRM を使用しました。マトリックスに合わせた調整を行うために、標準溶液、マトリックス、および分析対象物保護溶液を用いた 3 層のサンドイッチ注入を行いました。サンドイッチ注入を使用することで、1 セットの標準溶液のみで複数のマトリックスを評価することができました⁵。表 2 に、詳細な機器の使用条件を示します。

結果と考察

今回の調査から、Intuvo 9000 GC および 7000 シリーズトリプル四重極 MS システムにより、直線性に優れた検量線と一貫性の高いクロマトグラフィー結果が得られることがわかりました。各マトリックスについて、標準溶液ごとに 3 層のサンドイッチ注入で 3 回測定し、検量線を作成しました。キャリブレーション後、マトリックス抽出液を 60 回注入する前に、キャリブレーションチェックとして 50 ng/mL の標準溶液を 3 回評価しました。その後、マトリックス抽出液を、50 ng/mL の標準溶液を用いて 60 回サンドイッチ注入し、時間の経過によるピーク形状と回収率をモニタリングしました。キャリブレーション、キャリブレーションチェック、およびマトリックスの注入に続き、セプタム、ライナ、Guard Chip の交換などシステムのメンテナンスを実施しました。別のマトリックスに対してこのプロセスを繰り返す前に、それ以外のメンテナンスは実施しませんでした。

表2. Agilent 9000 Intuvo GC および Agilent 7000C MS/MS 機器の使用条件

パラメータ	値
Agilent 9000 Intuvo GC	
不活性流路の構成	シンプル MS
シリンジ	10 µL (p/n G4513-80204)
溶媒洗浄	注入前 3 x 溶媒 A、アセトン (3 µL) 3 x 溶媒 B、アセトン (3 µL) 注入後 3 x 溶媒 A、アセトン (3 µL) 3 x 溶媒 B、アセトン (3 µL)
サンプル洗浄	1 × 1 µL
サンプルポンプ	6
サンドイッチ注入	3 層のサンドイッチ L1 (マトリックス) 1 µL L2 (分析対象物保護溶液) 0.5 µL L3 (標準溶液またはサンプル) 1 µL
キャリアガス	ヘリウム
注入口	スプリット/スプリットレス、バルブスプリットレスモード、280 °C
注入パルス圧力	30 psi、0.5 分間
スプリットベントへのパージ流量	0.5 分で 15 mL/min
セプタムパージ流量	3 mL/min
ガスセーバ	3 分後に 20 mL/min
Intuvo Guard Chip	60 °C、その後 50 °C/min で 310 °C まで昇温
カラム	Agilent Intuvo HP-5ms UI (19091S-431UI-INT)
カラム流量	1.4 mL/min
カラム温度プログラム	60 °C (1.5 分間維持)、 その後 50 °C/min で 160 °C まで昇温、 その後 8 °C/min で 240 °C まで昇温、 その後 50 °C/min で 280 °C まで昇温 (2.5 分間維持)、 その後 100 °C/min で 290 °C まで昇温 (1.1 分間維持)
Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 MS/MS	
トランスファーライン	280 °C
イオン源温度	280 °C
四重極温度	150 °C
溶媒デイレイ	3.1 分
チューニングファイル	atunes.eiex.tune

表3に、7種類のマトリックスに含まれる農業分析対象物の一部について得られた検量線の相関係数 (R^2) を示します。表中の農業は、リテンションタイム、機能性、および分析の難易度が幅広くカバーされるように選択されています。農業 21 種の平均 R^2 値は、マトリックスに応じて 0.972 ~ 0.997 でした。蜂蜜および米では最高の R^2 値が得られ、平均値は 0.997 でした。一方、紅茶については、特に早く溶出する化合物で R^2 値がわずかに低くなりました。これは、軽度のマトリックス干渉が原因です。その他のマトリックスでは、検量線の相関係数は約 0.994 でした。

特定のマトリックスを用いたシステムのキャリブレーション後、抽出液を 50 ng/mL 標準溶液と分析対象物保護溶液とのサンドイッチ注入で 60 回分析しました。図 1 に、7種類のマトリックスについて、60 回に及ぶ抽出液の注入により得られた 50 ng/mL 標準溶液の平均回収率を示します。

表3. 評価した 7 種類のマトリックスについて、非常に良好な直線性が得られています。表中の 10 種類のターゲット農業は、リテンションタイムと分析の難易度にもとづいて選択されたものです。

	蜂蜜	米	オレンジ	紅茶	オリーブ油	タマネギ	キュウリ
メタクリホス	0.998	0.998	0.992	0.921	0.994	0.994	0.999
スルホテップ	0.998	0.996	0.991	0.917	0.994	0.993	0.996
シマジン	0.994	0.996	0.989	0.907	0.995	0.992	0.997
アルドリン	0.996	0.994	0.997	0.986	0.991	0.996	0.995
フェニトロチオン	0.996	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.998
ディルドリン	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998	0.997	0.998
EPN	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
マイレックス	0.999	0.998	0.999	0.998	0.997	0.997	0.997
ピラクロストロピン	0.998	0.998	0.998	0.999	0.983	0.993	0.991
デルタメトリン	0.995	0.996	0.996	0.995	0.998	0.982	0.968

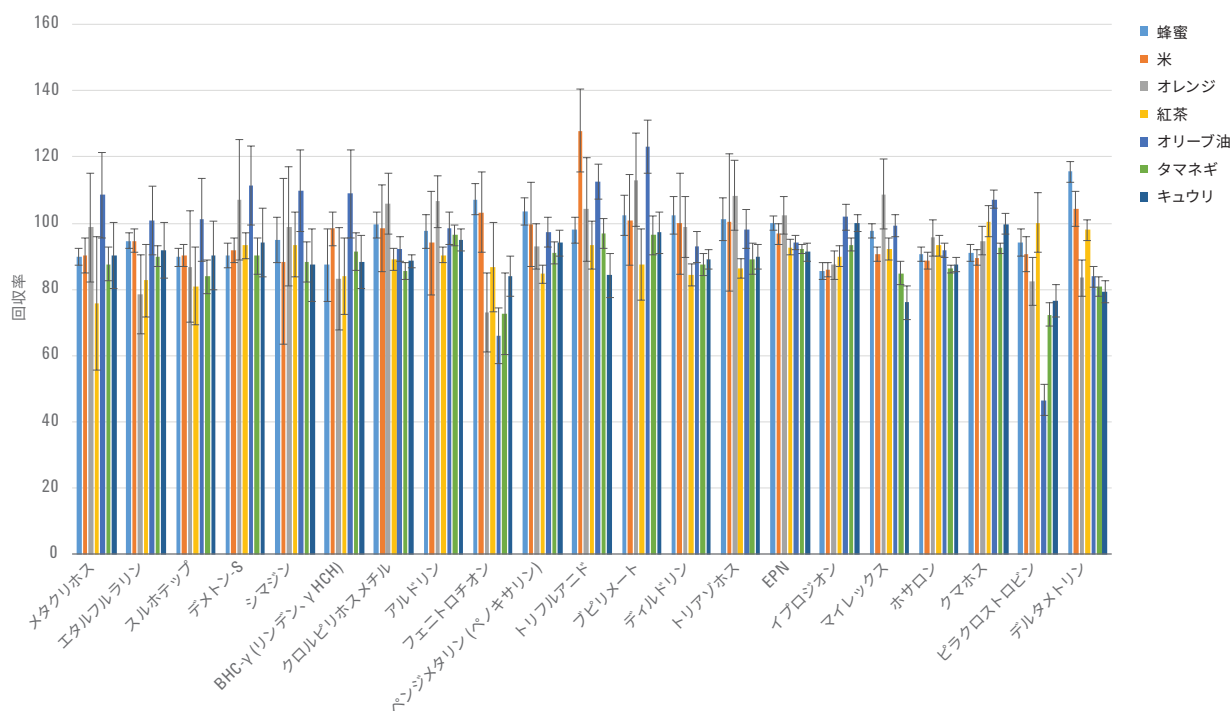


図 1. 7 種類のマトリックスについて、60 回に及ぶ注入により得られた平均回収率は、ほとんどのターゲット化合物でほぼ 100 % でした。エラーバーは測定値の標準偏差を表します。

ばらつきが大きい、または回収率の低い分析対象物もありますが、ほとんどのデータはほぼ 100 % の回収率を示しています。60 回に及ぶマトリックスの注入の標準偏差を考慮すると、7 種類すべてのマトリックスについてほとんどの農薬で 80 ~ 120 % の回収率が得られてい

ます。評価した 7 種類の抽出液全体では、ターゲット農薬の平均回収率は 82 % でした。また、60 回に及ぶ注入の RSD は非常に低い値となりました。これは一貫性の高さを示しています。7 種類のマトリックス全体では、60 回に及ぶ注入の平均 RSD は 6.3 % でした。蜂蜜 (偽和物混

入が多いマトリックス)、紅茶 (苦情が多く、難しいマトリックス)、オリーブ油 (分析対象となることが多いマトリックス)、およびキュウリ (広く分析が必要とされているマトリックス) のマトリックス別プロットを図 2 に示します。

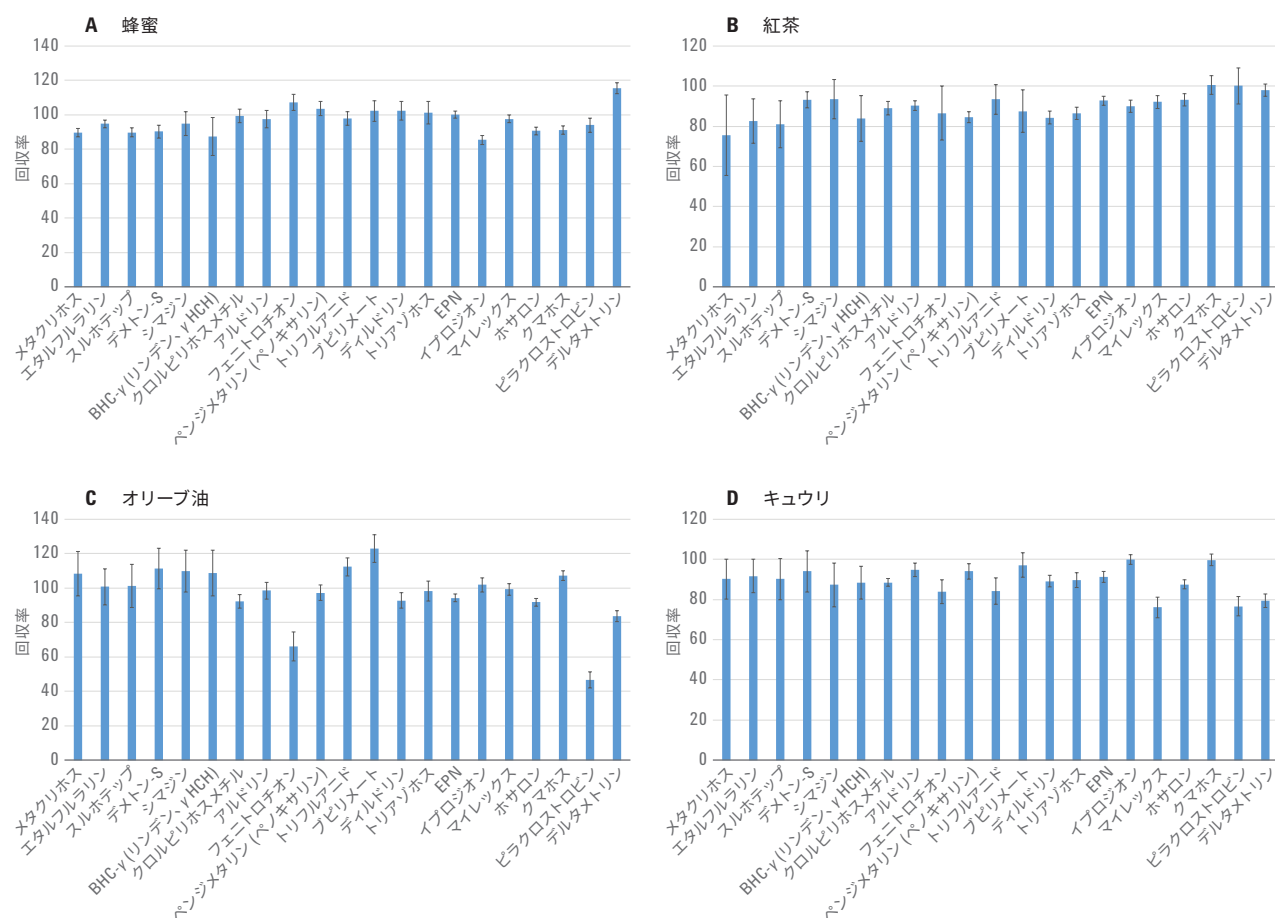


図 2. 性能の一貫性を示すために、蜂蜜、紅茶、オリーブ油、およびキュウリを個別にプロットしています。分析困難な一部の分析対象物を除き、60 回に及ぶ抽出液の注入においてほぼ 100 % の回収率が得られています。

蜂蜜、紅茶、およびキュウリでは、21種類の農業について70%以上という比較的狭い範囲の回収率が得られました。紅茶は分析困難な商品であり、キャリブレーション時の R^2 値はわずかに低い結果となりましたが、マトリックスの評価では、分析した農業すべてについて優れた回収率を示しました。オリーブ油は今回の評価で最も分析困難なマトリックスだったことが判明しました。一部の化合物(フェニトロチオンおよびピラクロストロピン)の回収率は70%を下回りましたが、それ以外は非常に良好な回収率を示しました。

ピーク面積にもとづく回収率(図1および図2)の一貫性は、クロマトグラフィーの一貫性を表します。図3~9は、50 ng/mL標準溶液によるキャリブレーションチェック時(最初のキャリブレーション後に実施)、60回のマトリックス注入後、メンテナンス(セブタム、注入口ライナ、およびIntuvo Guard Chipの交換)後のクロマトグラムを重ね合わせたものです。各ピークの化合物については、表1をご覧ください。図4では、エラーによりメンテナンス後のクロマトグラムは収集されていません。評価を通して、どのターゲット化合物についてもピーク形状に差は見られませんでした。また、

レスポンスの違いも、相対レスポンス比を用いることで補正できます。ピーク形状は全体的にシャープで左右対称であり、リテンションタイムも評価を通して一貫していました。メンテナンス後もピークが良好に一致していたため、MRMトランジション時間の調整は行いませんでした。クロマトグラムから、マトリックスが異なっても、一貫性の高いリテンションタイムとピーク形状が得られていることがわかります。Intuvo Guard Chipにより下流のコンポーネントがマトリックスから保護され、カラムのトリミングが不要になるため、リテンションタイムロッキングの再ロック作業は必要ありませんでした。また、Intuvo Guard Chipにより、バックフラッシュ法を用いなくても一貫した回収率とピーク形状が得られました。

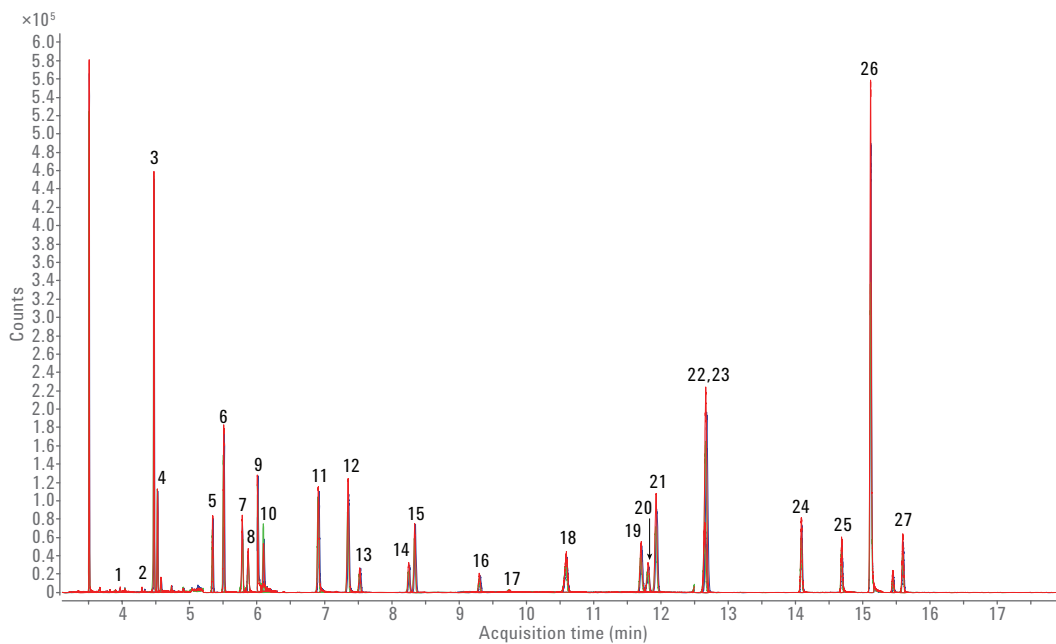


図3. 50 ng/mL標準溶液によるキャリブレーションチェック時(青)、60回の蜂蜜抽出液注入後(赤)、ライナおよびAgilent Intuvo Guard Chip交換後(緑)のクロマトグラムの重ね表示。非常に一貫性の高い結果が得られています。

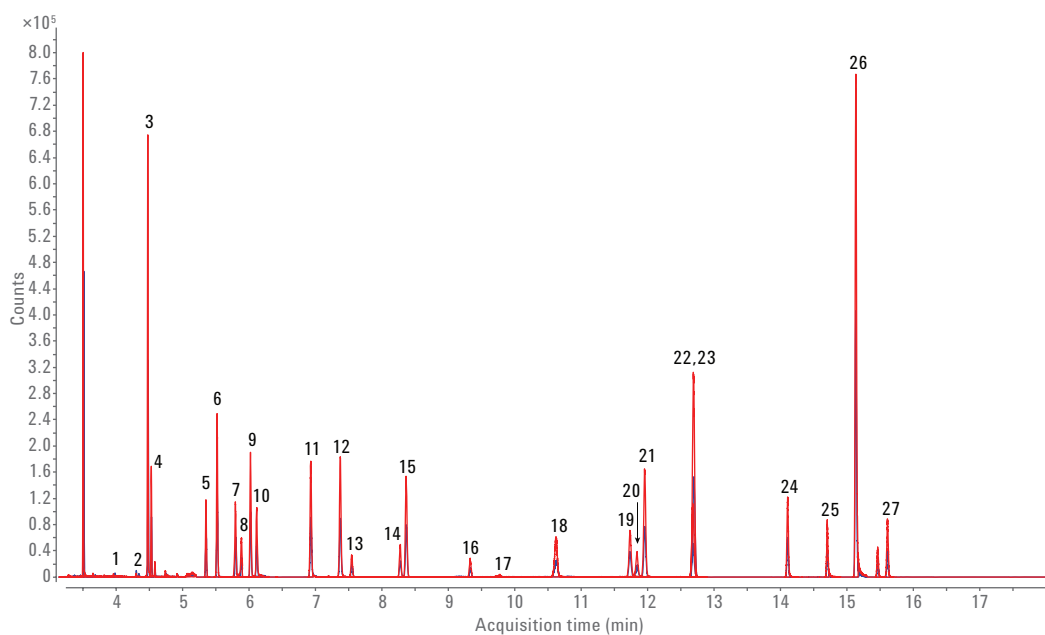


図 4. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青) および 60 回の米抽出液注入後 (赤) のクロマトグラムの重ね表示。非常に一貫性の高いピーク形状が得られています。マトリックス注入後のレスポンスがわずかに高くなっていますが、これはバイアルからの溶媒の蒸発が原因です。

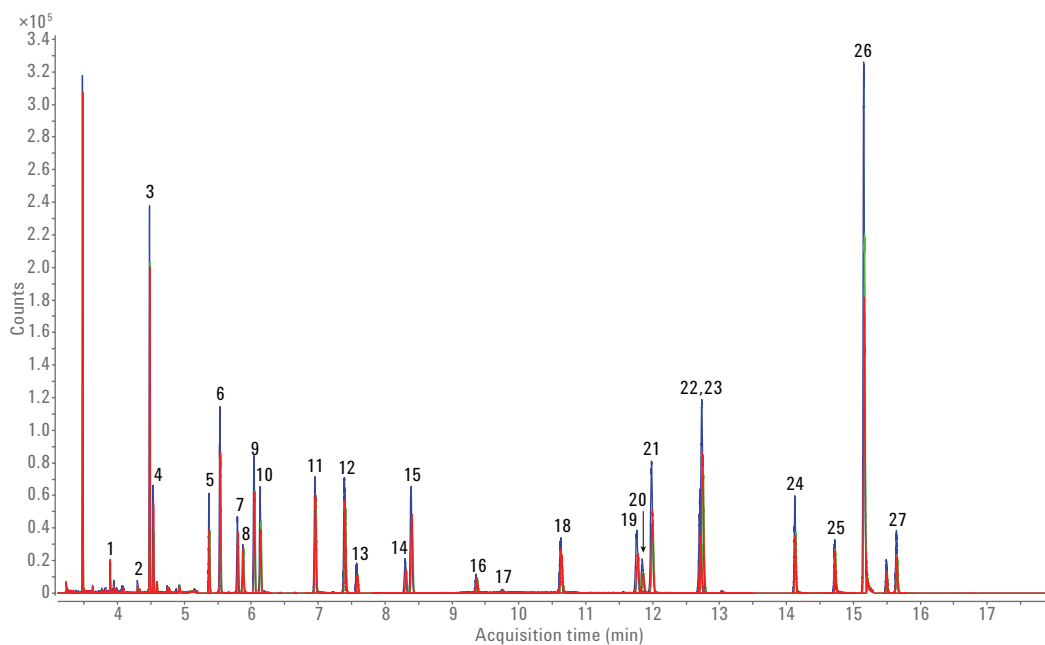


図 5. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青)、60 回のオレンジ抽出液注入後 (赤)、ライナおよび Intuvo Guard Chip 交換後 (緑) のクロマトグラムの重ね表示。非常に一貫性の高い結果が得られています。レスポンスのわずかな差は、レスポンス比により容易に補正できます。

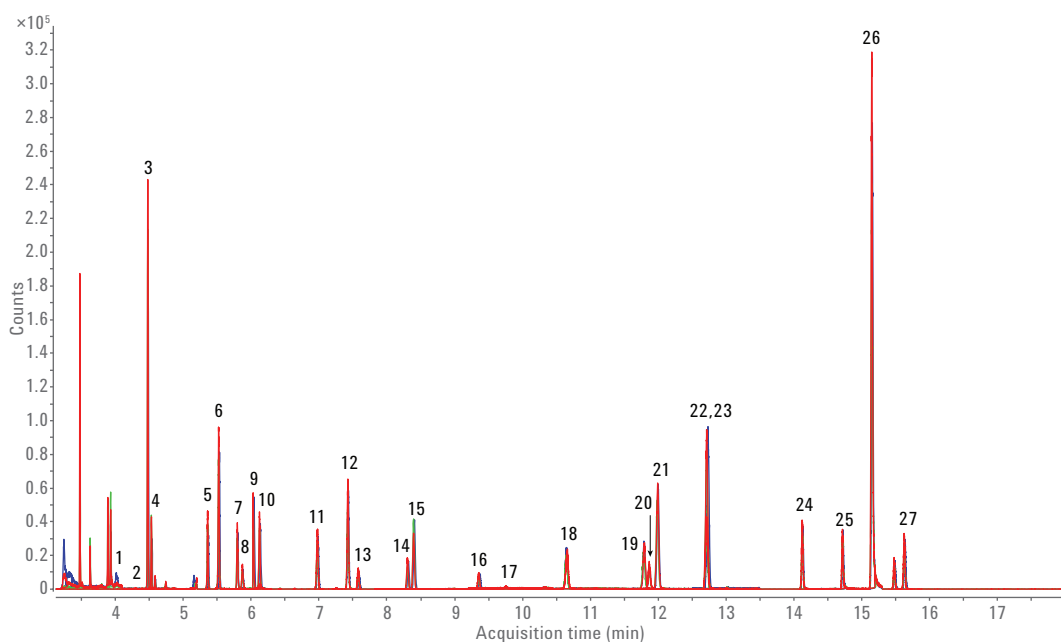


図 6. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青)、60 回の紅茶抽出液注入後 (赤)、ライナおよび Intuvo Guard Chip 交換後 (緑) のクロマトグラムの重ね表示。非常に一貫性の高いピーク形状とレスポンスが得られています。

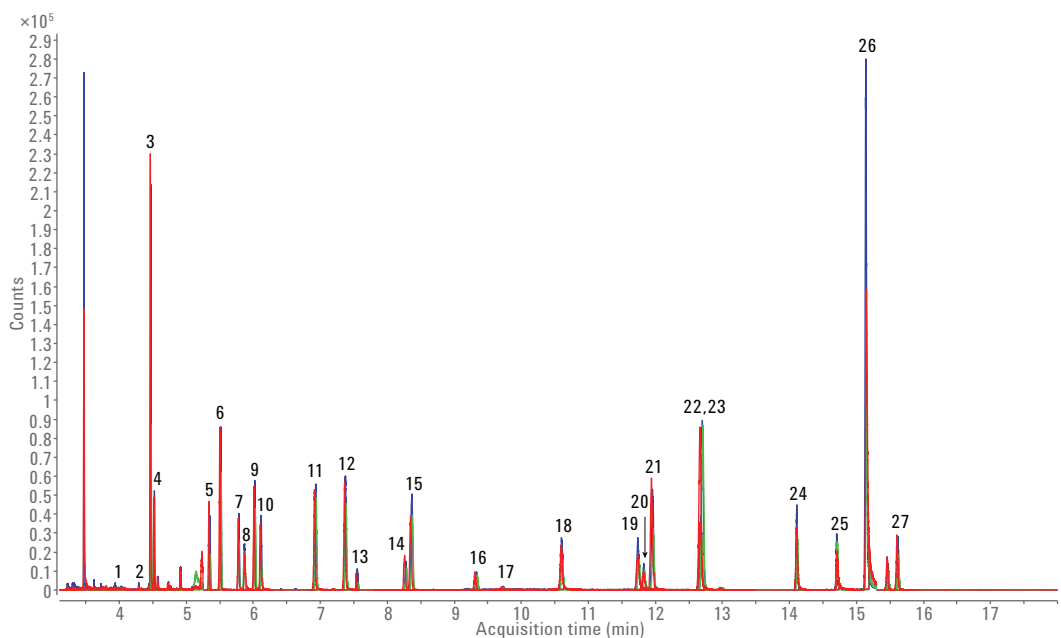


図 7. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青)、60 回のオリーブ油抽出液注入後 (赤)、ライナおよび Intuvo Guard Chip 交換後 (緑) のクロマトグラムの重ね表示。リテンションタイムまたはレスポンスの差がわずかであることがわかります。

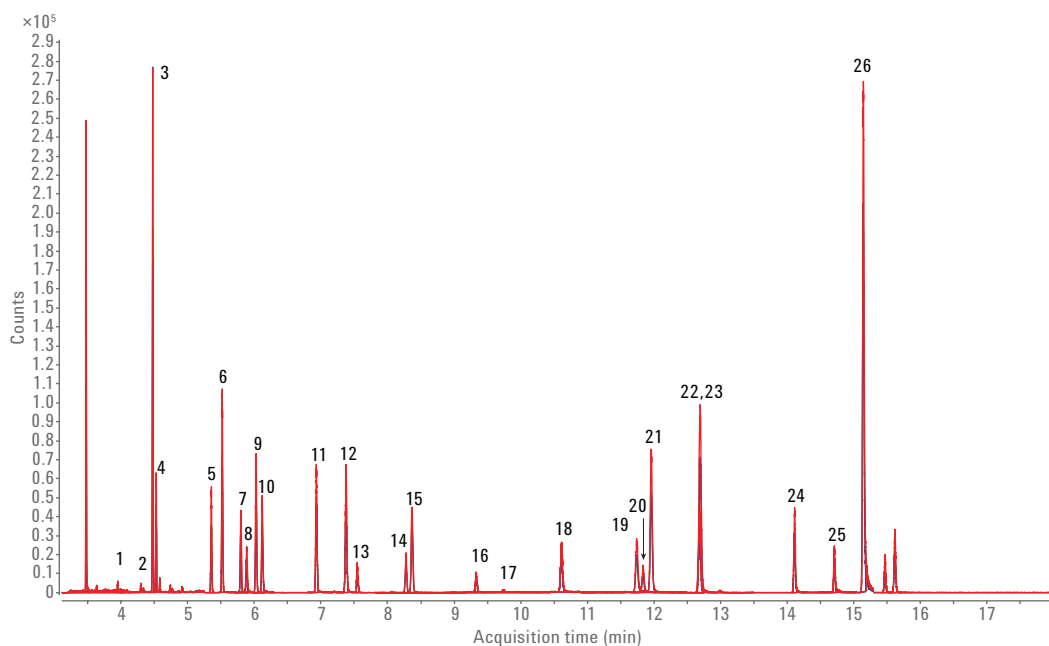


図 8. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青)、60 回のタマネギ抽出液注入後 (赤)、ライナおよび Intuvo Guard Chip 交換後 (緑) のクロマトグラムの重ね表示。一貫性に優れたピーク形状とレスポンスが得られています。

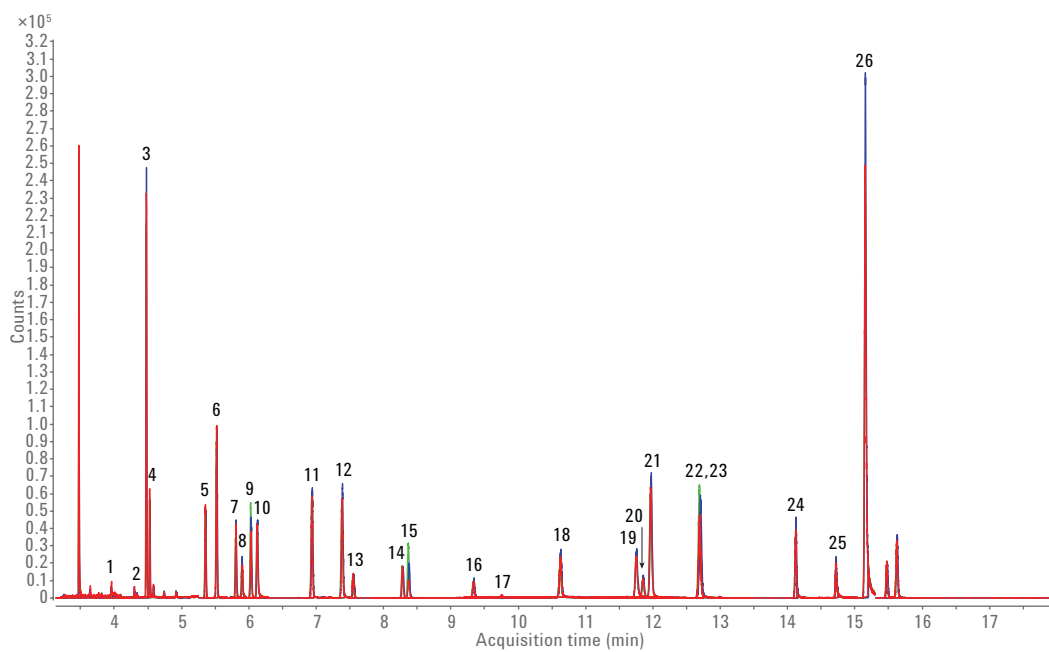


図 9. 50 ng/mL 標準溶液によるキャリブレーションチェック時 (青)、60 回のキュウリ抽出液注入後 (赤)、ライナおよび Intuvo Guard Chip 交換後 (緑) のクロマトグラムの重ね表示。非常に一貫性の高いピーク形状とレスポンスが得られています。

結論

Intuvo HP-5ms UI カラムを装着した Agilent Intuvo 9000 GC と Agilent 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS で構成されるシステムを用いてキャリブレーションおよびマトリックスの評価を行いました。分析の難易度の異なる多様な商品を代表する 7 種類のマトリックスを用いて 21 種類の農薬を評価しました。この機器では、どの分析対象物についても直線性に優れた検量線と高い回収率が得られました。また、Agilent Intuvo Guard Chip の実装により、次の利点が認められました。

- ピーク形状と回収率を維持するためのカラムのトリミングが不要になりました。
- リテンションタイムロッキングの再ロック作業は必要ありませんでした。
- 評価を通してイオン源のクリーニングは必要ありませんでした。
- バックフラッシュを行わなくても、優れたピーク形状と回収率が維持されました。
- Intuvo Guard Chip の交換によるリテンションタイムへの影響はありませんでした。

今回の評価では、検量線の相関係数は、マトリックスに関わらず全般的に 0.995 以上でした。50 ng/mL の食品抽出液サンプルを 60 回注入して得られた平均回収率は、7 種類すべてのマトリックスについてほぼ 100 % でした。これは、バッチ分析の過程におけるレスポンスの一貫性の高さを表しています。マトリックスの分析前、マトリックスへの曝露後、およびメンテナンス後のピーク形状とリテンションタイムについても、きわめて一貫性の高い結果が得られました。また、約 100 回の注入後に Intuvo Guard Chip を事前に交換することで、500 回の注入に渡って最小限の介入でシステムの性能を十分に維持することができました。

参考文献

1. Maximum Residue Limits Database.(2016, July 7).Retrieved from United States Department of Agriculture Foreign Agriculture Service: <http://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database>
2. EU legislation on MRLs.(2016, July 7).Retrieved from http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/docs/maximum_residue_levels_factsheet_en.pdf
3. M. Churley, J. Stevens, Reduce Cost of Pesticide Residue Analysis, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6069EN, **2015**.
4. M. Churley, Lowering Detection Limits for Routine Analysis of Pesticides Residues in Foods Using the Agilent 7000C Triple Quadrupole GC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-4131EN, **2015**.
5. L. Zhao, MS Analysis of Fruit and Vegetable Pesticides by GC/MS/MS Using Agilent Inert Flow Path, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-3234EN, **2013**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, September 1, 2016

5991-7216JAJP



Agilent Technologies