

ガラスフリット付きウルトライナーْتُスプリットレスライナを用いた GC/MS/MS による食品マトリックス中の多成分残留農薬の分析

著者

Angela Smith Henry, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.

概要

食品マトリックス中の農薬は、ライナの種類がガラスウールか、デンプルか、焼結ガラスフリットかなど、注入口の条件に大きく左右される可能性があります。このアプリケーションノートでは、ガスクロマトグラフィー / タンデム四重極質量分析計 (GC/MS/MS) を使用した多成分残留農薬分析メソッドにより、焼結ガラスフリット付き Agilent ウルトライナーْتُスプリットレスライナの有効性を評価した結果を紹介します。ガラスフリット付きライナを使用することで、濃度 1 ~ 500 ng/mL の農薬 22 種について直線性に優れた検量線が得られました。また、最初に実施した一連のマトリックス注入では、ガラスフリット付きライナによるレスポンスとピーク形状は一般的に使用されているガラスウール入りライナと同等でしたが、70 回にわたるマトリックス注入において、より一貫したピークレスポンスが維持されました。

はじめに

農業は、ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析 (GC/MS/MS) システム内の活性点に敏感に反応するため、流路が不活性であることがきわめて重要になります。ただし、食品マトリックスによっては、流路の不活性度を損なわせることもあります。マトリックス適合検量線とガラスウール付きライナを使用することで、カラムの寿命が延び、分析の長期安定性が確保されることが、以前の研究により示されています^{1, 2}。ガラスウールが充填された注入口ライナは、気化をしやすくするために広く使用されており、非揮発性マトリックス成分を捕捉する目的としても機能します。ただし、ガラスウールは、不規則な表面の不完全な不活性化によって活性点が生じる可能性があり、ガラスウールの破断点に新たな活性点が現れることもあります。

ガラスウールの代わりとなるのが、焼結ガラスフリット付きライナです。このライナ非揮発性マトリックス成分の補足および気化ポイントとして働き、ライナ内でガラスウールが破断したり移動したりする心配もありません。このスプリットレスライナには、ガラスウール入りスプリットレスライナのウール位置にあたる、シングルテーパライナの底部にガラスフリットが装着されています。この焼結ガラスフリット付きライナの性能を、濃度範囲 1 ~ 500 ng/mL の農業 22 種のマトリックス適合検量線をもとにテストしました。また、ガラスフリット付きスプリットレスライナと 2 種類のガラスウール入りスプリットレスライナを使用して、食品マトリックス中の低濃度 (10 ng/mL) の農業を GC/MS/MS で分析し、各ライナの再現性と一連のライナ間の再現性をテストしました。さらに、焼結ガラスフリット付きライナと、農業分析に広く使用されているガラスウール入りライナの結果を比較し、農業分析における有効性とライナ性能の類似点または相違点を明らかにしました。

実験方法

分析サンプルとして、イチゴ、プラム、タマネギ、ピーマン、オレンジ、アボカド、およびホウレンソウの 7 種類の食品マトリックスを選択しました。各マトリックスを QuEChERS メソッドに従って抽出し、マトリックスに適した分散 SPE 法でクリーンアップしました。7 種類すべてのマトリックスの抽出時には、以下の QuEChERS 抽出プロトコルに従いました。

1. ホモジナイズした食品 15 g を 50 mL 遠心分離チューブに入れました。
2. セラミックホモジナイザ 2 個と水 15 mL を加え、サンプルをボルテックスミキサーで攪拌しました。
3. 次に、サンプルを 15 mL の酸性アセトニトリル (酢酸 1 % を含む ACN) で抽出し、ボルテックスミキサーで 2 ~ 5 分間攪拌しました。
4. 各サンプルに QuEChERS 抽出塩 (部品番号 5982-7555) を加え、サンプルを振とう機で 5 分間振とうしてから、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。
5. 各サンプルの ACN 抽出液 (上澄み) を適切な dSPE クリーンアップカートリッジに移しました。

アボカド

遠心分離チューブからピペットで約 10 mL のアボカド抽出液を新しいチューブに移し、2 mL の水を加えて振とうし、十分に混合させました。抽出液/水の混合液をピペットで 2 個の各 Captiva EMR-Lipid 6 mL カートリッジ (部品番号 5190-1004) に移し、約 20 分間かけてコレクションチューブに自然落下させました。抽出液のほとんどがカートリッジを通液した後、真空マニホールドを使用して残った少量の液体をカートリッジからコレクションチューブに吸引しました。液体をコレ

クションチューブから 15 mL 遠心分離バイアルに移し、Bond Elut EMR-Lipid 脱水キット (部品番号 5982-0102) を加え、内容物を 5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。その後、最終的なアボカド抽出液をバイアルに移しました。

その他すべてのマトリックス

8 mL のアセトニトリル/食品抽出液を一般果物・野菜用 QuEChERS dSPE (部品番号 5982-5058) チューブに入れ、ボルテックスミキサーで 2 分間攪拌した後、5,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。その後、最終的な食品抽出液をそれぞれ別々のバイアルに移しました。

農業標準溶液

濃度 10 ppm の農業 22 種のカスタム混合液を使用しました。10 ppm の標準試薬をアセトニトリルで希釈し、1、2、5、10、20、50、100、200、および 500 ng/mL の 9 種類の濃度の標準溶液を調製しました。内部標準 (ISTD) として、重水素化 PAH 6 種の混合物を各標準混合液に濃度 40 ng/mL で加えました。また、サロゲートとして、リン酸トリフェニル (TPP) を各混合液に濃度 200 ng/mL で加えました。表 1 に、農業化合物を溶出順に、また末尾に内部標準とサロゲートを示します。

表 1. 農薬化合物名 (リテンションタイム順)。内部標準およびサロゲート化合物は、リテンションタイムに関係なくリストの末尾に記載しています。

	化合物名
1	メタクリホス
2	オメトエート
3	エタルフルラリン
4	スルホテップ
5	デメトン-S
6	シマジン
7	γ-リンデン (γ-BHC)
8	クロルピリホスメチル
9	フェニトロチオン
10	アルドリノ
11	ベンジメタリン
12	フォルベット
13	ブピリメート
14	ディルドリン
15	トリアゾホス
16	イプロジオン
17	EPN
18	ホサロン
19	マイレックス
20	クマホス
21	ピラクロストロピン
22	デルタメトリン
ISTD	1,4-ジクロロベンゼン-d ₄
ISTD	ナフタレン-d ₈
ISTD	アセナフテン-d ₁₀
ISTD	フェナントレン-d ₁₀
ISTD	クリセン-d ₁₂
ISTD	ベリレン-d ₁₂
サロゲート	リン酸トリフェニル

メソッドパラメータ

Agilent 7890B GC にミッドカラムバックフラッシュ構成を設定し、2本の15 m DB-5ms UIカラムをパージ付き Ultimate ユニオン (PUU) で接続しました。電子圧力制御 (EPC) モジュールへの逆流を防ぐため、EPC モジュールと PUU 間のブリードラインとの連動により、カラム 2 の流量がカラム 1 より 0.2 mL/min 大きい値になるように設定しました。表 2 に、今回の分析で使用した GC/MS/MS 機器および消耗品をまとめます。GC/MS/MS メソッドパラ

メータ (表 3) は、分析メソッドが 25 分間で完了するように最適化しました。Agilent 7000D MS/MS は、ダイナミック MRM (dMRM) モードで使用しました。取り込みメソッドは、各農薬のマトリックス適合トランジションをもとに、各マトリックスに合わせて調整しました。また、サンプル前処理時間を短縮するために、Agilent 7693B オートサンプラを使用してサンドイッチ注入を行いました。

装置構成

表 2. GC および MSD 機器および消耗品

パラメータ	設定値
GC	Agilent 7890 GC
MS/MS	InertPlus EI イオン源搭載 Agilent 7000D MS/MS
オートサンプラ	トレイ付き Agilent 7693B オートサンプラ
シリンジ	Agilent ブルーライン 10 µL PTFE-チッププランジャテーパードシリンジ (G4513-80203)
カラム	2 x Agilent DB-5ms ウルトライナート、15 m × 0.25 mm、0.25 µm (部品番号 122-5512UI)
注入口セプタム	Agilent 高性能グリーン、ノンスティックセプタム、11 mm (部品番号 5183-4759、50 パック用)
バイアル	Agilent A-Line スクリューバイアル、認定、茶色、100 個 (部品番号 5190-9590)
バイアルインサート	Agilent 不活性化バイアルインサート、100 個 (部品番号 5181-8872)
バイアル用スクリューキャップ	Agilent スクリューキャップ、PTFE/シリコン/PTFE セプタム、キャップサイズ: 12 mm、500 個 (部品番号 5185-5862)

分析条件

表 3. GC および MSD 機器の条件

パラメータ	設定値
注入の種類	二層サンドイッチ
注入量	1 µL 標準溶液および 1 µL マトリックス
注入口	スプリット/スプリットレス 280 °C、 0.5 分に 30 mL/min でパージ、 スイッチドセプタム/パージ 3 mL/min
キャリアガスと流量	ヘリウム 1.20 mL/min (カラム 1)、 1.4 mL/min (カラム 2)、定流量
トランスファーライン温度	280 °C
カラム温度プログラム	60 °C (1 分間) 40 °C/min で 170 °C まで昇温 10 °C/min で 310 °C まで昇温 (3 分間)
バックフラッシュ / ポストラン設定	310 °C、48 psi (中間点圧力) で 5 分間
イオン源温度	250 °C
四重極温度	150 °C
データ取り込み	dMRM
ゲイン係数	10
MS 分解能設定	ワイド
溶媒ディレイ	2 minutes

サンドイッチ注入

農業標準溶液、内部標準、サロゲート (リン酸トリフェニル)、およびマトリックスを組み合わせるサンプル前処理作業を軽減するために、サンドイッチ注入を使用しました³。Agilent MassHunter Data Acquisition ソフトウェア (「ALS」タブ) では、二層注入を選択しました。内部標準とサロゲートは、各濃度の標準溶液のバイアルに前述の濃度で加えました。二層サンドイッチ注入を行う場合、L1 は、シリンジに 2 番目に吸引され、最初にライナに注入される液体です。70 回のマトリックス分析調査では、この液体をマトリックスとし、例えば最初の分析ではピーマンマトリックスを L1 として使用しました。L2 は、シリンジに吸引される最初の液体であり、この液体として 10 ng/mL の農業標準溶液 (ISTD およびサロゲートを含む) を使用しました。注入前に液体がシリンジから漏れないようにするために、L1 をシリンジに吸引した後、2 つの液層間に 0.2 µL のエアギャップを維持しました。二層サンドイッチ注入では、最初にマトリックスを、2 番目に標準溶液を注入することにより、ライナ内の活性点をマトリックスで被覆することができます。

ライナ

3 種類のライナを調査しました。ガラスフリット付きライナとガラスウール入りライナの有効性を比較するために、ガラスフリット付き Agilent ウルトライナートスプリットレスシングルテーパライナ、ライナ底部にガラスウールが約 5 mm 充填されたスプリットレスシングルテーパライナ (ウール A)、およびライナ底部に

ガラスウールが約 8 mm 充填されたスプリットレスシングルテーパライナ (ウール B) をテストしました。

ガラスフリット付きライナとガラスウール入りライナのテストには、農業標準溶液とマトリックスの組み合わせ、および農業標準溶液のみを使用しました。マトリックスによる化合物レスポンスの増減効果の調査では、マトリックスと 10 ng/mL の農業標準溶液をサンドイッチ注入しました。その際、各マトリックスと標準溶液のサンドイッチ注入をランダムな順序で 10 回ずつ、シーケンスあたり合計 70 回行いました。

結果と考察

今回の研究では、農業分析におけるガラスフリット付きスプリットレスライナの有効性を検量線の直線性とピークの一貫性の観点から評価しました。まず、それぞれのマトリックスについて、各濃度の標準溶液との二層サンドイッチ注入を行い、検量線を作成しました。キャリブレーションの確認とピーク形状のモニタリングには、100 ng/mL の標準溶液を使用しました。また、ピーク形状と回収率を経時的にモニタリングするために、10 ng/mL の標準溶液と各マトリックスをサンドイッチ注入し、合計 70 回のマトリックス注入を行いました (マトリックスあたり 10 回、ランダムな順序で注入)。70 回のマトリックス注入後にシステムメンテナンスを実施し、注入口ライナとセプタムを交換しました。カラムをトリミングするタイミングは、100 ng/mL の標準溶液のピーク形状を追跡することにより判断しました。全体的

には、ライナ 3 本ごとにカラムを 0.5 m トリミングしました。

検量線

農業分析におけるガラスフリット付きライナの性能を確認するために、各マトリックスと濃度 1 ~ 500 ng/mL の農業標準溶液をサンドイッチ注入し、マトリックス適合検量線を作成しました。検量線の作成はマトリックスごとに別々に行いましたが、ガラスフリット付きライナへの各濃度の標準溶液の注入はランダムな順序で行いました。欧州委員会の SANTE/11813/2017 ガイダンスにもとづくと、検量線は、平均レスポンス係数、直線近似または二次曲線近似により求めた濃度が真の濃度の ±20 % 内であれば適正と見なすことができます⁴。どのマトリックスでも大半の化合物について、平均レスポンス係数が ±20 % の相対標準偏差 (RSD) 限度内の検量線を達成することができました。表 4 に、平均レスポンス係数により適正な検量線が得られた化合物の数、直線近似または二次曲線近似が必要だった化合物をマトリックスごとにまとめます。平均レスポンス係数により適正な検量線が得られた化合物についても、Quantitative Analysis ソフトウェアで生成される直線近似および決定係数 (R^2) を使用することで、結果を横断的に考察することができます。

表 4. 各マトリックスの検量線結果のまとめ。平均レスポンス係数、直線近似、二次曲線近似により許容基準を満たした化合物を示しています。

	アボカド	ピーマン	タマネギ	オレンジ	ブラム	ホウレン草	イチゴ
平均レスポンス係数 (RF)	化合物 20 種	化合物 18 種	化合物 20 種	化合物 20 種	化合物 17 種	化合物 18 種	化合物 21 種
直線近似	デメトン-S、 デルタメトリン	オメトエート、 デメトン-S、 フォルベット、 デルタメトリン	デルタメトリン	デルタメトリン、 フォルベット	デメトン-S、 γ-リンデン、 イプロジオン	メタクリホス、 デメトン-S、 フォルベット、 デルタメトリン	
二次曲線近似			フォルベット		フォルベット、 デルタメトリン		フォルベット

表 5 に、7 種類のマトリックスにわたる特定の農薬 12 種の決定係数 (R^2 の値) をまとめます。表中、アスタリスク付きの決定係数は直線近似によって、また十字付きの係数は二次曲線近似によって検量線を作成した化合物を示します。

7 種類のマトリックスにわたる化合物 22 種の R^2 係数の範囲は 0.9819 ~ 1.0 でした。アボカドマトリックス中のメタクリホスおよびプラム中のピラクロストロピンは R^2 値が 0.990 を下回りましたが、どちらも平均レスポンス係数により検量線の許容基準が満たされました。ピーマンマトリックス中のデルタメトリンには直線近似が必要であり、 R^2 値は 0.9819 でした。この値が示す直線性は高くありませんが、検量線の濃度範囲 1 ~ 500 ng/mL では、濃度点がより少ない場合の他の線形方程式や二次曲線近似と比較しても、この線形方程式が最も適合しました。表 4 に示したように、デルタメトリンには、イチゴを除くすべてのマトリックスで直線近似または二次曲線近似が必要でした。フォルペットについても、検量線の許容基準を満たすために、アボカドを除くすべてのマトリックスで二次曲線近似または

直線近似が必要でした。デメトン-S は、4 種類のマトリックスで直線近似により検量線の許容基準を満たすことができませんでした。これらすべての化合物は、マトリックス効果や流路の活性点の影響を受けやすく、分析が困難になる可能性があります。表 4 の「二次曲線近似」行に示したタマネギ、プラム、およびイチゴマトリックス中の化合物は、この近似法を適用することで R^2 値が 0.992 を超えました。高い直線性 ($R^2 = 0.9999 \sim 1.0$) を示した化合物もいくつかあり、これらの化合物は概して平均レスポンス係数により検量線の許容基準を満たすことができました。ピーマンマトリックスでは、高い直線性を示した化合物が最多となりました (メタクリホス、シマジン、 γ -リンデン、およびクマホス)。その他、アボカド中のクロルピリフォスメチル ($R^2 = 1.0000$) およびホサロン ($R^2 = 0.9999$)、オレンジ中のデイルドリン ($R^2 = 0.9999$)、タマネギ中のマイレックス ($R^2 = 1.0000$) などの化合物 (およびマトリックス) も高い直線性を示しました。また、 R^2 値が 0.9990 を超えたマトリックス中の化合物もいくつかありました。

マトリックスごとに R^2 係数を平均することで、農薬化合物が各マトリックスおよび流路の不活性度と総合的にどの程度相互作用するのかがわかります。ピーマンとアボカドは R^2 の平均値が最も高く、それぞれ 0.9980 および 0.9975 でした。この結果は、高い R^2 係数を示した化合物の数と一致しています。一方、タマネギは R^2 の平均値が最も低く、0.9962 でした。このことは、QuEChERS による抽出と dSPE での処理後も、タマネギが、農薬分析が比較的困難なマトリックスであることを意味します。オレンジ (0.9974)、プラム (0.9964)、イチゴ (0.9969)、およびハウレンソウ (0.9972) の R^2 の平均値はこの間にあり、タマネギに近い平均係数を示したプラムが、農薬分析が若干困難であると考えられます。以上より、ガラスフリット付きライナを使用することで、直線性に優れた検量線が得られ、直線近似または二次曲線近似が必要な化合物数を抑えられることがわかりました。

回収率

各ライナについて、多数回のランダムなマトリックス注入にわたる回収率、ライナ内再現性、およびライナ間再現性をテストするために、70 回の分析シーケンスを実施しました。この方法で、ガラスフリット付きライナ 6 本とウール A ライナおよびウール B ライナ各 3 本をテストしました。70 回の分析シーケンスでは農薬とマトリックスをサンドイッチ注入し、これにより得られたデータをもとに、農薬の回収率を計算し、各種類のライナを評価しました。70 回の分析データセットのサンプルには 10 ng/mL の農薬標準溶液を使用し、化合物およびマトリックスごとに検量線の平均レスポンス係数、直線近似、または二次曲線近似を使用して回収率を計算しました。図 1 に、アボカド (高油マトリックス)、ピーマン、ハウレンソウ (高色素マトリックス)、およびイチゴマトリックスについて 70 回の注入により得られた 10 ng/mL の標準溶液の平均回収率を、ガラスフリット付きライナ 6 本の平均値として示します。

表 5. マトリックス全 7 種の特定農薬 12 種の R^2 値

化合物	決定係数 R^2						
	アボカド	ピーマン	タマネギ	オレンジ	プラム	ハウレン草	イチゴ
メタクリホス	0.9849	0.9999	0.9996	0.9993	0.9992	0.9957*	0.9995
オメトエート	0.9985	0.9949*	0.9982	0.9996	0.9928	0.9911	0.9944
スルホテップ	0.9990	0.9997	0.9994	0.9991	0.9967	0.9967	0.9995
シマジン	0.9984	0.9999	0.9992	0.9989	0.9972	0.9951	0.9973
フェニトロチオン	0.9994	0.9980	0.9962	0.9954	0.9987	0.9989	0.9994
アルドリン	0.9958	0.9987	0.9992	0.9994	0.9987	0.9993	0.9998
デイルドリン	0.9991	0.9998	0.9996	0.9999	0.9975	0.9975	0.9995
イプロジオン	0.9997	0.9996	0.9959	0.9985	0.9925*	0.9990	0.9994
EPN	0.9998	0.9960	0.9931	0.9934	0.9921	0.9975	0.9949
マイレックス	0.9967	0.9998	1.0	0.9994	0.9988	0.9996	0.9938
ピラクロストロピン	0.9984	0.9996	0.9958	0.9981	0.9896	0.9992	0.9991
デルタメトリン	0.9965*	0.9819*	0.9930*	0.9981*	0.9975†	0.9942*	0.9907

* 直線近似が必要だった化合物の決定係数

† 二次曲線近似が必要だった化合物の決定係数

一部の成分は、フォルペットのようにマトリクス間で回収率が大幅に変動するか、デルタメトリンのように低い回収率を示しましたが、多くの農薬の回収率は、7種類のマトリクスのおほとんどで70～130%でした。7種類のマトリクス全体でのターゲット農薬の平均回収率は106%、平均RSDは10.9%でした。ガラスフリット付きライナでは、ピーマン、ハウレンソウ、およびイチゴマトリクス(それぞれ図1B、図1C、図1D)において優れた回収率が得られ、ハウレンソウマトリクスについては、すべての化合物の回収率が70～130%

の範囲内でした。また、ピーマンおよびイチゴでこの回収率の範囲外だった化合物は1つのみでした(それぞれピリメートおよびピラクロストロビン)。アボカドについては、農薬の回収率に関して良好なマトリクスであることがわかりました(図1A)。70～130%の範囲外だった化合物は、132%で範囲を上回ったシマジンと、範囲を下回った分析困難なフォルペットおよびデルタメトリンの3種類の化合物のみでした。プラムでは、アボカドと同様に、オメトエートおよびフォルペットの2種類が回収率70～130%の範囲を下回り、クマホス

はこの範囲を上回りました。オレンジマトリクスでは、4種類の化合物の回収率が130%を超えましたが、18種類の化合物とサロゲートの回収率は70～130%の範囲内でした。タマネギマトリクスでは、全体的に高い回収率が報告されました。多くの化合物の回収率は70～130%の範囲内でしたが、130%を超えた化合物もいくつかありました。

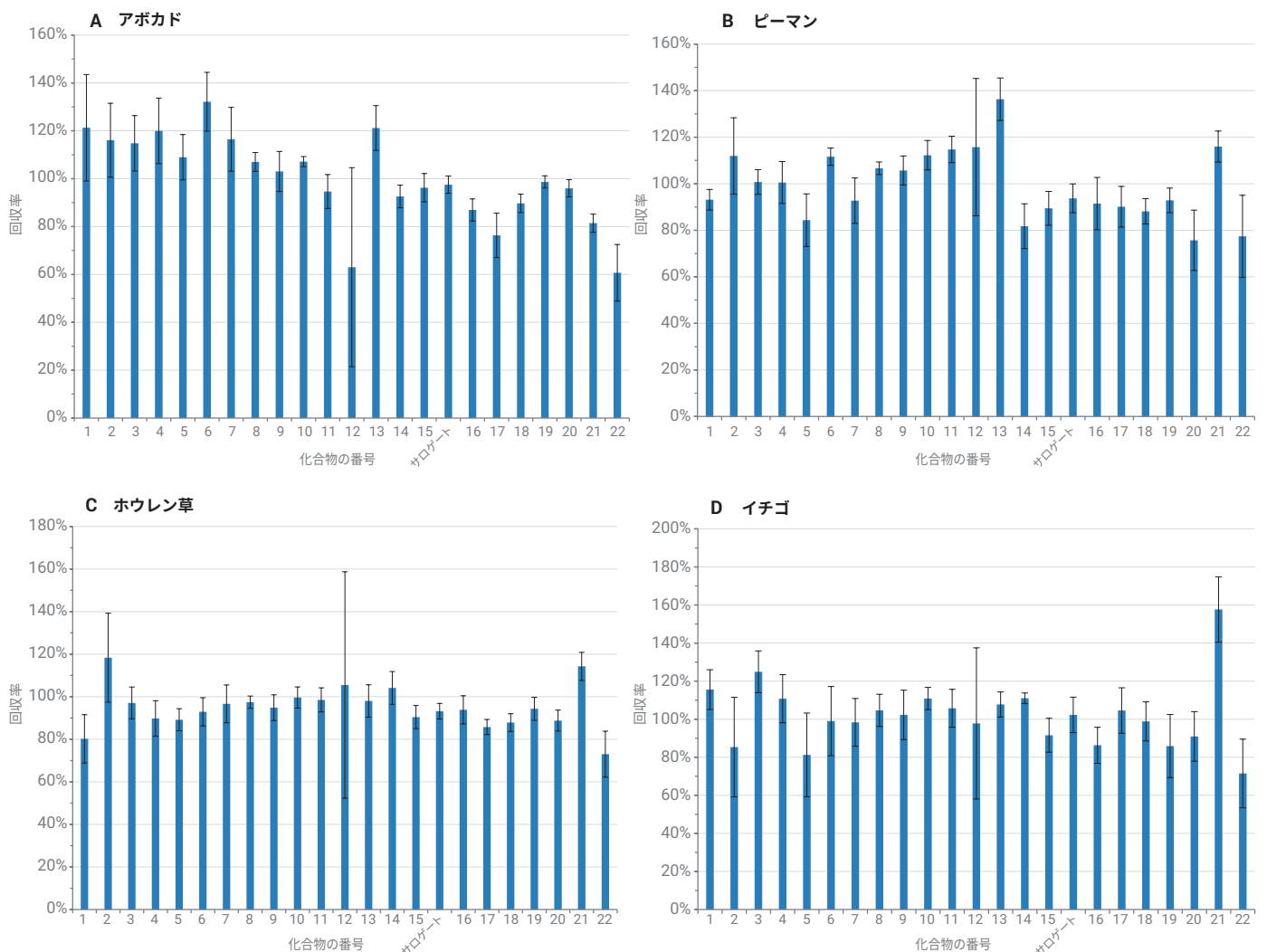


図1. ガラスフリット付きライナ6本でそれぞれ70回の分析シーケンスにより得られた農薬22種およびサロゲート化合物の平均回収率: A) アボカドマトリクス、B) ピーマンマトリクス、C) ハウレンソウマトリクス、D) イチゴマトリクス。誤差バーは、それぞれのマトリクスにおける各農薬の回収率の標準偏差を表します。各番号が表す化合物については、表1をご覧ください。

この高い回収率は、マトリックスによるレスポンスの増加が原因と考えられ、より正確な定量を行うためには、標準添加が必要になる可能性があります。

レスポンスの変化

ガラスフリット付きスプリットレスライナと2種類のウール入りスプリットレスライナ（ウール A およびウール B）を、農業標準溶液とマトリックスの組み合わせおよび標準溶液のみでテストしました。マトリックスによる化合物レスポンスの増減効果、特にライナへのマトリックスの堆積による影響を明らかにするために、マ

トリックスと 10 ng/mL の農業標準溶液をサンドイッチ注入しました。70 回の注入シーケンスの間に、オメトエート、フォルバット、ピラクロストロピンなど特に影響を受けやすい化合物について、信号の変化がピーク面積の減少や理想的なピーク形状の損失として観察されるものと予測しました。また、サンプル全体でさまざまな農業にわたって同様の影響が見られるかどうかを確認するために、サロゲート化合物と ISTD のピーク面積も追跡しました。特定のピークの例と、ピーク面積およびピーク形状が各マトリックスの最初の分析から最後の分析までの間にどのように変化したかを、

アボカドおよびタマネギマトリックスについてそれぞれ図 2 および図 3 にまとめます。また、その他 2 種類のマトリックスで得られた特定のピークを付録 (図 A2 および図 A3) に掲載します。各図には、テストしたライナの種類ごとにピークが重ね表示されており、それぞれ A) ガラスフリット付きライナ、B) ウール A ライナ、C) ウール B ライナ、D) ガラスフリット付きライナ、E) ウール A ライナ、F) ウール B ライナの結果を示します。

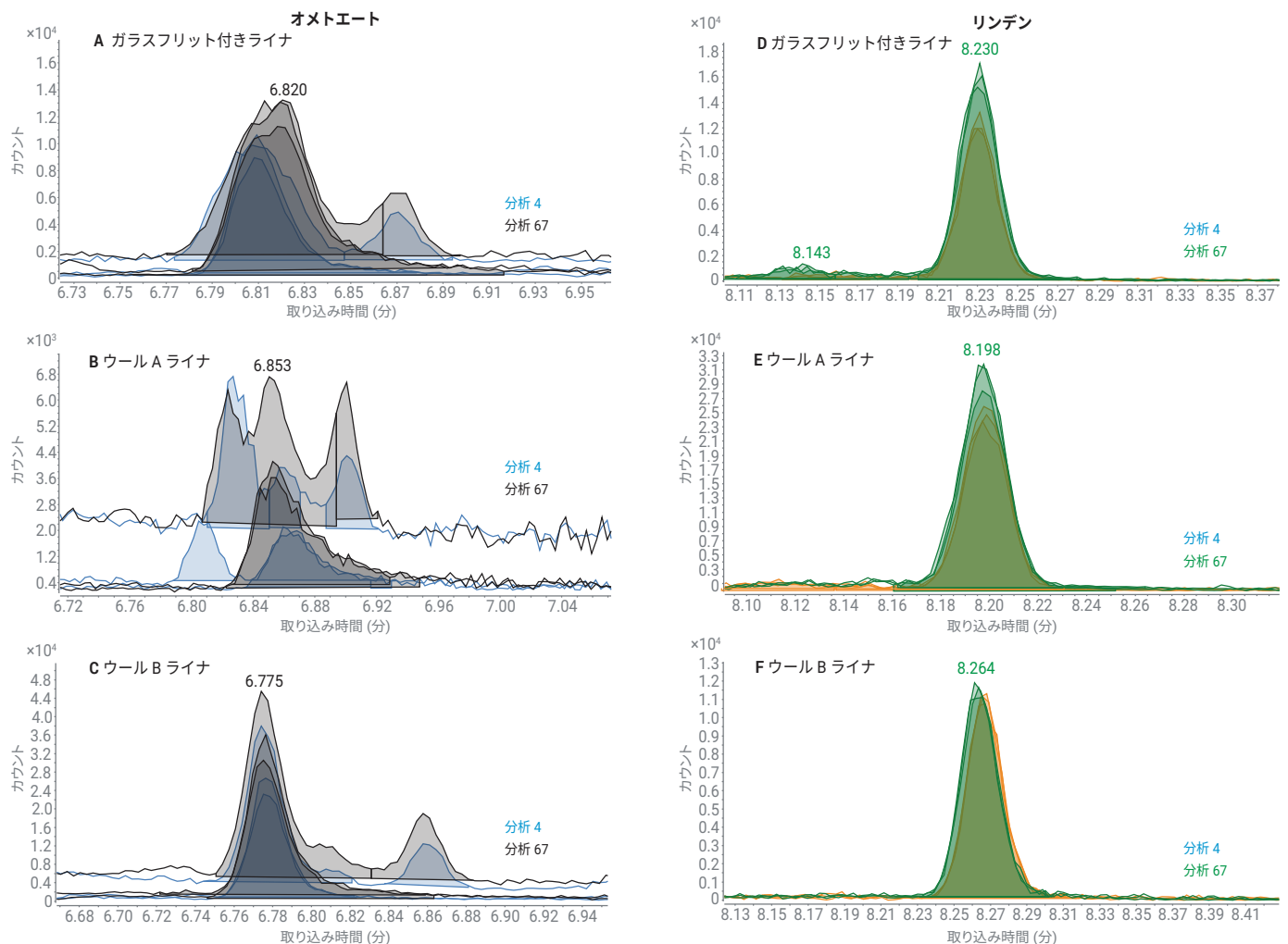


図 2. ガラスフリット付きライナ (A、D)、ウール A ライナ (B、E)、およびウール B ライナ (C、F) を用いたアボカドマトリックスの最初の分析 (分析 4) と最後の分析 (分析 67) で特定化合物について得られた MRM トランジションの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示。10 ng/mL の農業とアボカドマトリックスをサンドイッチ注入しました。

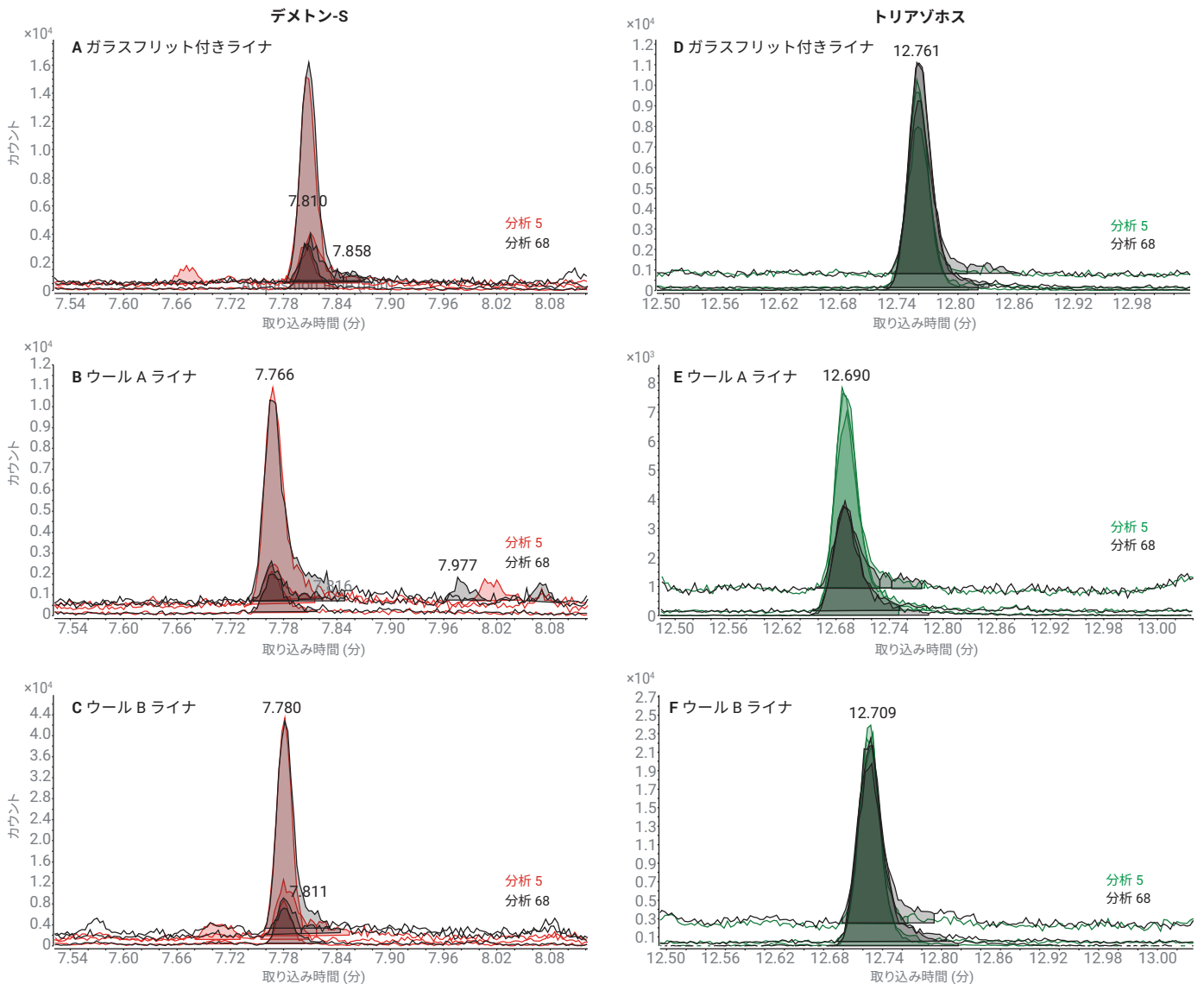


図 3. ガラスフリット付きライナ (A, D)、ウール A ライナ (B, E)、およびウール B ライナ (C, F) を用いたタマネギマトリックスの最初の分析 (分析 5) と最後の分析 (分析 68) で特定化合物について得られた MRM トランジションの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示。10 ng/mL の農薬とタマネギマトリックスをサンドイッチ注入しました。

予測どおり、オメトエートやピラクロストロピンなど影響を受けやすい化合物は、マトリックスの注入回数に伴って理想的なピーク形状が損なわれる傾向にありました。例えば、オメトエートは、少なくともガラスフリット付きライナとウール A ライナでマトリックスの注入回数に伴ってテーリングが増加する傾向にありましたが (図 2A および図 2B)、ウール B ライナでは、正規分布により近い形状に維持されました (図 2C)。ピラクロストロピンは、3 種類のどのライナでも、マトリックスの注入回数に伴ってピークテーリングが顕著になりました (図 A2

D~F)。これに対し、アボカド中のリンデン (図 2D~2F)、タマネギ中のデメトン-S (図 3A~3C)、イチゴ中のマイレックス (図 A3) など、その他多くの化合物については、一連の注入にわたって正規分布形状のピークが維持されました。

3 種類すべてのライナのデータを確認すると、さまざまなマトリックスにわたる多くの化合物で、各マトリックスの最初の分析から最後の分析までの間にピーク面積が増加していました。これは、マトリックスの注入回数に伴ってピーク面積が減少するという予測に反する結果で

した。ピーク面積が増加した具体的な化合物はマトリックスやライナの種類によって異なりますが、ライナの種類という観点から傾向を明確にすることができます。5 種類のマトリックスでは、3 種類すべてのライナにおいて、各マトリックスの最初の分析から最後の分析までの間に、内部標準を含む半数以上の化合物のピーク面積が増加するか維持されました。オレンジおよびイチゴマトリックスでは、ガラスフリット付きライナとウール B ライナにおいて、マトリックスの注入回数に伴って半数以上の化合物のピーク面積が増加しました。一方、

ウール A ライナについては、半数以上の化合物のピーク面積が減少しました。ライナの種類による農業レスポンスの違いの例を図 3D～3F、図 A2、および図 A3 に示します。タマネギ中のトリアゾホスは、ガラスフリット付きライナ (図 3D) およびウール B ライナ (図 3F) で、70 回の注入シーケンスにわたって同様のピーク面積、ピーク高さ、およびピーク形状を示しました。一方、ウール A では、タマネギの最初の分析から最後の分析までの間にピーク面積が大幅に減少しました (図 3E)。活性点の影響を受けやすいクマホスについても、ピークレスポンスの違いがイチゴマトリックスで顕著に現れました。図 A3-D に示すように、クマホスは、ガラスフリット付きライナにおいては、3 回目の分析から 66 回目の分析までの間にピークがわずかに広がり、頂点が丸くなりましたが、ピーク面積はほぼ一定に保たれました。これに対し、ウール A ライナとウール B ライナでは、クマホスのピーク面積が大幅に減少し (図 A3-E および図 A3-F)、ピークが広がりました。ピーマンマトリックスについては、ウール A ライナおよびウール B ライナで同様のピークの変化を示し、ピリメートのピーク面積とピーク形状が 70 回の分析にわたって維持されましたが (図 A2-B および図 A2-C)、ガラスフリット付きライナではピーク面積が増加しました (図 A2-A)。この結果は、内部標準のピーク面積の変化に一致し、シーケンスを通して同様のレスポンス係数が維持されました。

すべてのマトリックスにわたり、70 回の注入シーケンスの間にピーク面積が減少した化合物が最も多かったのは、ウール A ライナでした。一方、減少した化合物が最も少なかったのは、ガラスフリット付きライナでした。ガラスフリット付きライナで減少した化合物は、どのマトリックスについても 1～3 種類のみで、それ以外の 19～21 種類の化合物は、70 回の注入シーケンスの間、ピーク面積が一定に保たれたか増加しました。ウール B ライナは、ガラスフリット付きライナまたはウール A ライナと同等の結果になった数種類のマトリックスを除き、これら 2 種類のライナの中間的な傾向を示しました。アボカドマトリックスについては、ウール B ライナおよびガラスフリット付きライナでピーク面積が減少した化合物はそれぞれ 1 種類にとどまりました。また、ピーマンのデータでは、ウール A ライナおよびウー

ル B ライナでピーク面積が減少した化合物はどちらも 3 種類でした。ピーク面積が減少するという全体的な傾向は、ライナのタイプ、サイズ、およびライナ表面の不活性化の相互作用の結果と考えられます。ウール A ライナは、充填されているウールがより少なく (長さ約 5 mm)、ウール B ライナは多い (約 8 mm) ことから、このサイズの違いが、マトリックスを拡散させる表面積の増加につながった可能性があります。一方、ガラスフリット付きライナは、ピーク面積が減少した化合物数が最小でした。このことは、ガラスフリットの不活性化が、不規則なガラスウールより完全であることを示唆しています。表面の不活性化が完全であるほど、活性点が少なくなり、回収率とピークレスポンスが向上します。

ライナ内再現性

70 回の注入データをもとに、ガラスフリット付きライナ 6 本とウール A ライナおよびウール B ライナ各 3 本のライナ内再現性を確認しました。再現性は、一連の注入における各ライナの内部一貫性を示します。高濃度の溶液では問題が明確に現れない可能性があるため、より分析が困難な、ライナ内の活性点を敏感に示すプローブとして、濃度 10 ng/mL を選択しました。農業分析にはガラスウール入りライナが広く使用されていることから、焼結ガラスフリット付きライナをウール入りライナと比較し、農業分析における有効性と、ライナ性能の類似点または相違点を判断しました。各マトリックスの 10 回の注入にわたるライナ内再現性を、レスポンス係数および RSD 値について計算しました。特定のガラスフリット付きライナとガラスウール入りライナで得られた

データを表 6 に示します。全データは、表 A2 (ガラスフリット付きライナ) および表 A3 (ウール A ライナおよびウール B ライナ) に掲載します。

ライナ内再現性は、ガラスフリット付きライナ 6 本とウール B ライナ 3 本ではすべてのマトリックスについて、またウール A ライナではほとんどのマトリックスについて、RSD が 20 % 未満でした。ウール A ライナでは、タマネギマトリックス、プラムのデータセット、およびイチゴの 2 つのデータセットで 25 % 未満の RSD が示されました。RSD が 30 % を超えたのは、1 本のウール A ライナでのイチゴマトリックスのデータセットのみでした。このライナでテストしたその他すべてのマトリックスについては RSD 値が 25 % を下回ったことから、注入に問題があったものと考えられます。ガラスフリット付きライナでは、6 本すべてにおいて、どのマトリックスについても RSD 16 % 以下の再現性が得られました。また、さまざまなマトリックスおよびライナにわたる RSD 範囲は 8～16 % でした。この結果は、不活性化、ポアサイズ、および農業とガラスフリット付きライナとの相互作用の一貫性の高さを示しています。全体的に、ガラスフリット付きライナと多くのウール入りライナは再現性に優れ、RSD 値のほとんどが 15 % 未満でした。これは、ライナ内にマトリックスが堆積しても、内部一貫性が良好に保たれることを示しています。

表 6. 70 回のマトリックス適合分析シーケンスにランダムに組み込まれた 10 ng/mL の農業とマトリックスの 10 回の注入にわたる、特定のガラスフリット付きライナ、ウール A ライナ、およびウール B ライナのライナ内再現性 (平均レスポンス係数の RSD)

マトリックス/ライナ	平均レスポンス係数の RSD (10 ng/mL の 10 回の繰り返し分析)				
	フリット 2	フリット 4	フリット 6	ウール A2	ウール B2
アボカド	7.23 %	15.93 %	8.57 %	10.84 %	5.95 %
ピーマン	9.47 %	13.73 %	11.70 %	11.34 %	10.36 %
タマネギ	9.11 %	11.09 %	10.02 %	17.38 %	11.22 %
オレンジ	8.94 %	12.88 %	11.35 %	13.77 %	8.24 %
プラム	9.50 %	12.10 %	12.08 %	23.69 %	10.03 %
ホウレン草	8.47 %	10.65 %	9.68 %	12.34 %	6.12 %
イチゴ	9.12 %	11.80 %	11.15 %	21.70 %	9.99 %

ライナ間再現性

各マトリックスと各ライナについて得られたすべてのレスポンス係数の RSD をもとにライナ間再現性を評価し、これによって同じ種類の複数のライナにわたる一貫性をテストしました。ライナの種類ごとに結果の類似性を判断するために、ガラスフリット付きライナで得られた 60 個のデータポイント (および各種類のガラスウール入りライナで得られたそれぞれ 30 個のデータポイント) を平均して、平均レスポンス係数と RSD を求めました。低い RSD 値は、不活性化および農薬とライナとの相互作用が一貫していることを示します。一方、高い RSD 値は、不活性化が一貫していないか、農薬との相互作用が多数回のマトリックス注入にわたって変化していることを示します。全体的に、すべての RSD 値が 20 % を下回り、ライナ間再現性に優れていることが示されました。ガラスフリット付きライナおよびウール B ライナではすべてのマトリックスについて、またウール A ライナではほとんどのマトリックスについて、RSD は 15 % 未満でした。タマネギ、プラム、およびイチゴマトリックスについては、ウール A ライナの RSD が 15 % を超えましたが、20 % を下回りました。ライナ間再現性という観点で特定の種類のライナを最善のライナとして判断するのは困難です。ただし、ウール A ライナとタマネギ、プラム、およびイチゴマトリックスの組み合わせについては例外で、ガラスフリット付きライナやウール B ライナより RSD 値が高くなりました。多くの RSD 値が、さまざまなマトリックスおよび 3 種類のライナにわたり、不活性化および農薬との相互作用が一貫していることを示しました。

表 7. レスポンス係数 (RF) の RSD で表した、ガラスフリット付きライナ 6 本、ウール A ライナ 3 本、ウール B ライナ 3 本のライナ間再現性の結果

マトリックス	ガラスフリット付きライナ: レスポンス係数 (RF) の RSD	ウール A ライナ: RF の RSD	ウール B ライナ: RF の RSD
アボカド	7.00 %	6.94 %	9.35 %
ピーマン	8.35 %	8.86 %	8.25 %
タマネギ	13.62 %	15.98 %	11.38 %
オレンジ	8.59 %	10.18 %	7.97 %
プラム	9.34 %	16.12 %	9.68 %
ホウレン草	7.40 %	8.54 %	12.44 %
イチゴ	12.69 %	17.24 %	8.85 %

結論

ガラスフリット付き Agilent ウルトライナートスプリットレスライナは、GC/MS/MS による食品中の農薬の検査に適しています。ガラスフリット付きライナでは、ターゲット農薬 22 種のすべてについて、1 ~ 500 ng/mL の濃度範囲で平均決定係数 (R^2) 0.996 という直線性に優れた検量線を作成することができました。ガラスフリット付きライナのレスポンスはガラスウール入りスプリットレスライナとほぼ同じでしたが、70 回にわたるマトリックス適合注入においてマトリックス注入回数が増加しても、ガラスウール入りライナよりピーク面積が維持される傾向にありました。また、すべてのガラスフリット付きライナで 16 % 未満、ウール B ライナでは 20 % 未満の RSD 値が得られ、ライナ内再現性およびライナ間再現性に優れていることがわかりました。これは、不活性化および農薬とライナとの相互作用が一貫していることを示します。

参考文献

1. Veeneman, R.; Stevens, J. MultiResidue Pesticide Analysis with the Agilent Intuvo 9000 GC and Agilent 7000 Series Mass Spectrometer, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7216EN, **2016**.
2. Zhao, L.; Meng, C. Quantitative and Repeatability Analysis of Trace Level Pesticides in Plantation Food by GC/MS/MS. *Agilent Technologies*, publication number 5990-9317EN, **2011**.
3. Westland, J. Advantages of Reversed Sandwich Injection for Pesticide Residue Analysis, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7973EN, **2017**.
4. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed; *European Commission Directorate for Health and Food Safety*, SANTE/11813/2017, 21-22 November **2017** rev. 0, 2017.

付録

表 A1. 7 種類のマトリックスにわたる農薬全 22 種の検量線 (1~500 ng/mL) の決定係数 (R² 値)

化合物	RT (分)	検量線 (1 ~ 500 ng/mL) の R ² 値						
		アボカド	ピーマン	タマネギ	オレンジ	プラム	ホウレン草	イチゴ
メタクリホス	6.029	0.9849	0.9999	0.9996	0.9993	0.9992	0.9957	0.9995
オトエート	6.838	0.9985	0.9949	0.9982	0.9996	0.9928	0.9911	0.9944
エタルフルリン	7.047	0.9993	0.9994	0.9970	0.9983	0.9998	0.9968	0.9997
スルホテップ	7.288	0.9990	0.9997	0.9994	0.9991	0.9967	0.9967	0.9995
デメトン-S	7.772	0.9946	0.9958	0.9975	0.9971	0.9990	0.9921	0.9966
シマジン	7.891	0.9984	0.9999	0.9992	0.9989	0.9972	0.9951	0.9973
γ-リンデン (γ-BHC)	8.177	0.9954	0.9999	0.9963	0.9939	0.9991	0.9958	0.9987
クロルピリホスメチル	9.072	1.0	0.9998	0.9934	0.9995	0.9997	0.9994	0.9995
フェニトロチオン	9.602	0.9994	0.9980	0.9962	0.9954	0.9987	0.9989	0.9994
アルドリノ	10.026	0.9958	0.9987	0.9992	0.9994	0.9987	0.9993	0.9998
ベンジメタリン	10.451	0.9986	0.9981	0.9950	0.9929	0.9931	0.9988	0.9977
フォルベット	10.966	0.9969	0.9966	0.9965	0.9911	0.9997	0.9933	0.9924
ディルドリン	11.847	0.9991	0.9998	0.9996	0.9999	0.9975	0.9975	0.9995
ブピリメート	11.759	0.9965	0.9993	0.9984	0.9994	0.9985	0.9972	0.9992
トリアゾホス	12.711	0.9996	0.9991	0.9913	0.9979	0.9956	0.9953	0.9973
イプロジオン	13.826	0.9997	0.9996	0.9959	0.9985	0.9925	0.9990	0.9994
EPN	14.035	0.9998	0.9960	0.9931	0.9934	0.9921	0.9975	0.9949
ホサロン	14.65	0.9999	0.9994	0.9904	0.9978	0.9932	0.9997	0.9972
マイレックス	15.147	0.9967	0.9998	1.0	0.9994	0.9988	0.9996	0.9938
クマホス	15.904	0.9982	0.9999	0.9908	0.9956	0.9921	0.9998	0.9932
ピラクロストロピン	17.63	0.9984	0.9996	0.9958	0.9981	0.9896	0.9992	0.9991
デルタメトリン	18.265	0.9965	0.9819	0.9930	0.9981	0.9975	0.9942	0.9907

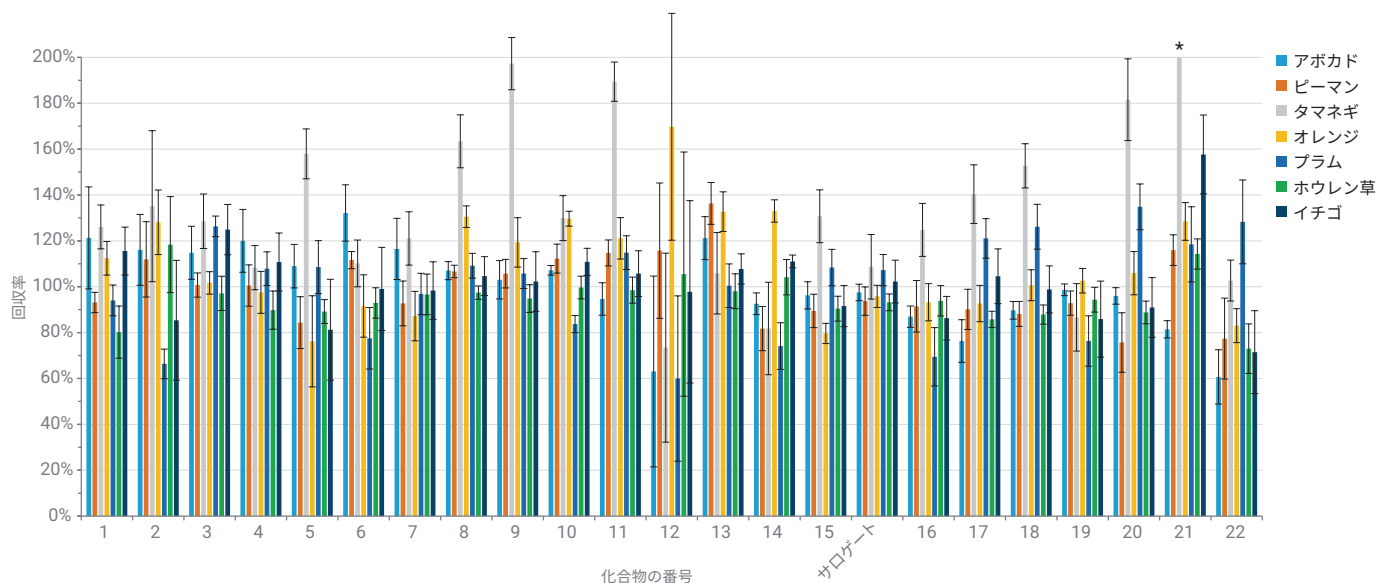


図 A1. 7 種類のマトリックスの平均回収率。大半のマトリックスで良好な回収率が得られています。各マトリックスの注入をランダムな順序で 10 回ずつ、合計 70 回の注入を完了し、6 本のライナの結果を平均しました。各番号が表す化合物については、表 1 をご覧ください。オニオンマトリックスのピラクロストロピンの上に表示されたアスタリスクは、スケール外の回収率 (> 250 %) を示します。

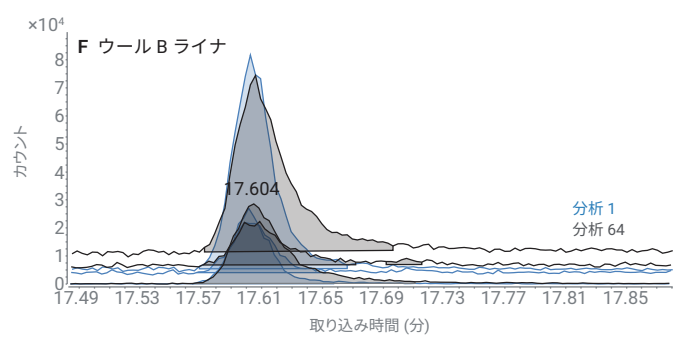
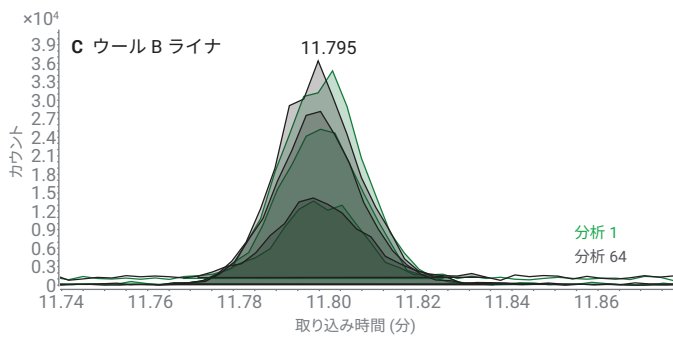
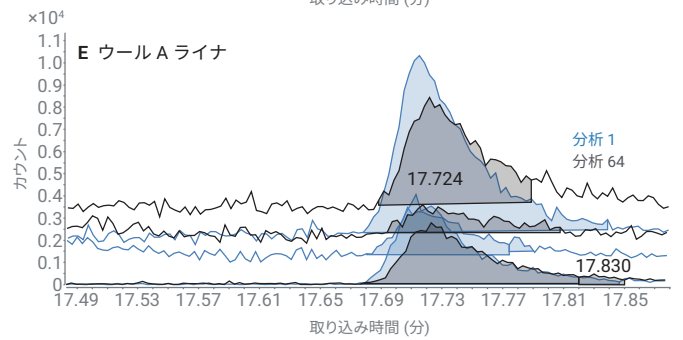
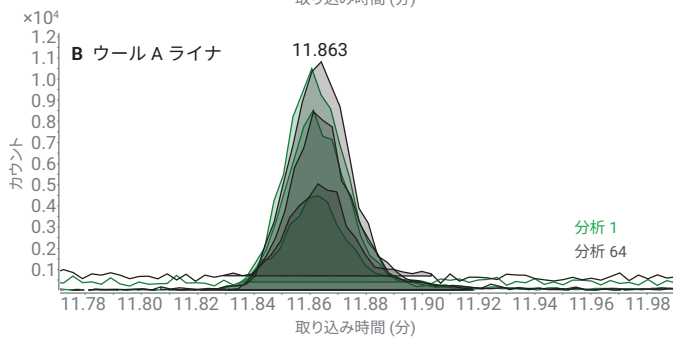
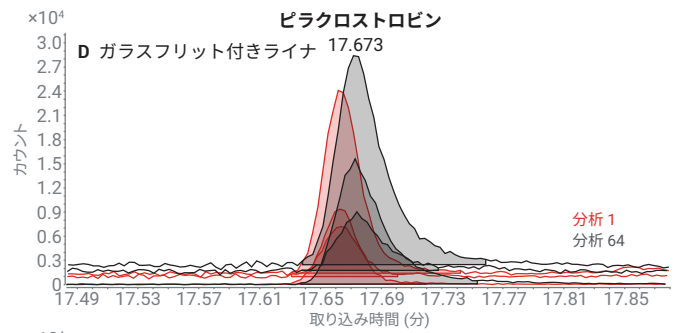
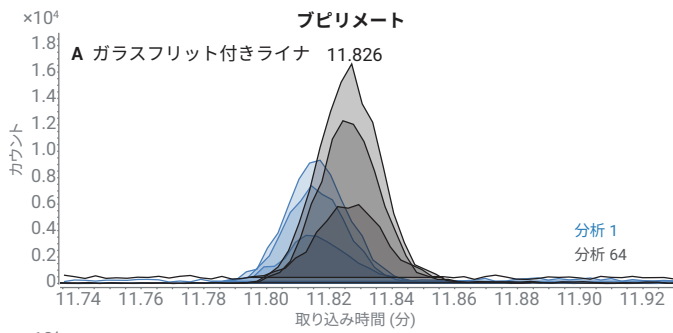


図 A2. ガラスフリット付きライナ (A、D)、ウール A ライナ (B、E)、およびウール B ライナ (C、F) を用いたピーマンマトリックスの最初の分析 (分析 1) と最後の分析 (分析 64) で特定化合物について得られた MRM トランジションの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示。10 ng/mL の農業とピーマンマトリックスをサンドイッチ注入了。

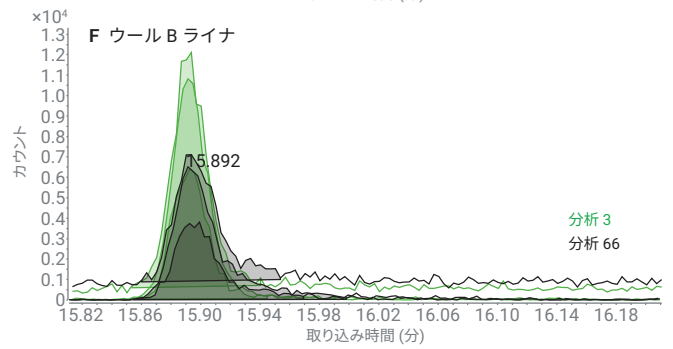
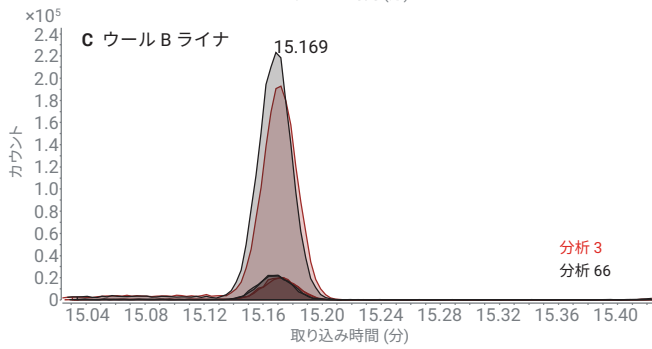
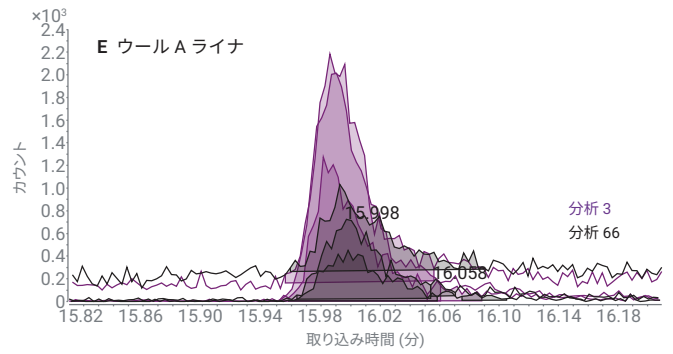
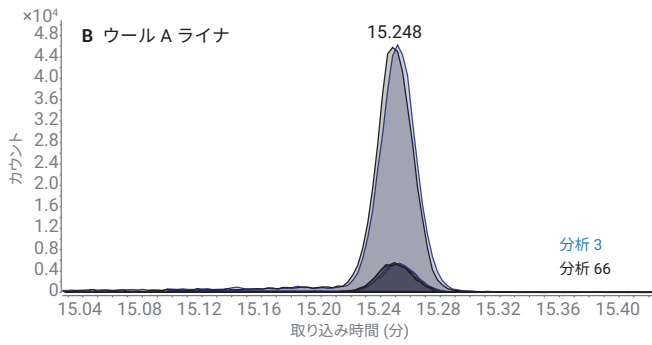
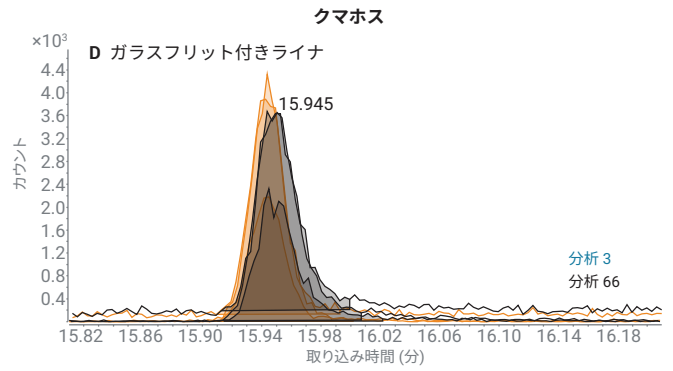
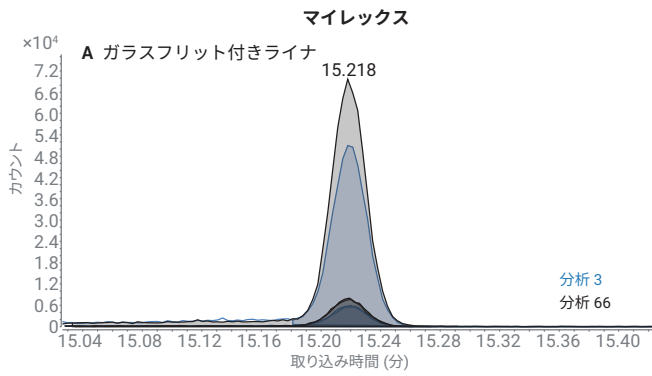


図 A3. ガラスフリット付きライナ (A、D)、ウール A ライナ (B、E)、およびウール B ライナ (C、F) を用いたイチゴマトリックスの最初の分析 (分析 3) と最後の分析 (分析 66) で特定化合物について得られた MRM トランジションの抽出イオンクロマトグラムの重ね表示。10 ng/mL の農薬とイチゴマトリックスをサンドイッチ注入しました。

表 A2. 70 回のマトリックス適合分析シーケンスにランダムに組み込まれた 10 ng/mL の農薬とマトリックスの 10 回の注入にわたる、ガラスフリット付きライナ 6 本のライナ内再現性 (平均レスポンス係数の RSD)

マトリックス/ライナ	平均レスポンス係数の RSD (10 ng/mL の 10 回の繰り返し分析)					
	フリット 1	フリット 2	フリット 3	フリット 4	フリット 5	フリット 6
アボカド	10.40 %	7.23 %	10.72 %	15.93 %	12.65 %	8.57 %
ピーマン	11.45 %	9.47 %	9.60 %	13.73 %	11.90 %	11.70 %
タマネギ	10.14 %	9.11 %	13.21 %	11.09 %	12.16 %	10.02 %
オレンジ	11.14 %	8.94 %	9.91 %	12.88 %	14.10 %	11.35 %
ブラム	10.35 %	9.50 %	12.63 %	12.10 %	13.82 %	12.08 %
ホウレン草	11.72 %	8.47 %	9.18 %	10.65 %	14.33 %	9.68 %
イチゴ	12.57 %	9.12 %	11.14 %	11.80 %	17.12 %	11.15 %

表 A3. 70 回のマトリックス適合分析シーケンスにランダムに組み込まれた 10 ng/mL の農薬とマトリックスの 10 回の注入にわたる、ウール A ライナ 3 本およびウール B ライナ 3 本のライナ内再現性 (平均レスポンス係数の RSD)

マトリックス/ライナ	平均レスポンス係数の RSD (10 ng/mL の 10 回の繰り返し分析)					
	ウール A ライナ 1	ウール A ライナ 2	ウール A ライナ 3	ウール B ライナ 1	ウール B ライナ 2	ウール B ライナ 3
アボカド	14.45 %	10.84 %	8.08 %	8.96 %	5.95 %	12.55 %
ピーマン	14.30 %	11.34 %	8.91 %	10.51 %	10.36 %	9.86 %
タマネギ	22.41 %	17.38 %	14.24 %	11.15 %	11.22 %	18.55 %
オレンジ	16.13 %	10.11 %	11.00 %	12.76 %	8.24 %	10.45 %
ブラム	24.51 %	23.69 %	12.50 %	12.61 %	10.03 %	13.64 %
ホウレン草	12.56 %	12.34 %	7.99 %	8.98 %	6.12 %	13.21 %
イチゴ	32.19 %	21.70 %	11.61 %	10.14 %	9.99 %	16.21 %

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. 2019
Printed in Japan, October 4, 2019
5994-1473JAJP