

スクリーナーによる ピーク自動判定機能を利用した 残留農薬分析における解析時間の短縮化

著者

杉立 久仁代、野原 健太、
大塚 剛史、中村 貞夫

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

スクリーナーは MassHunter Quantitative Analysis に追加された新しい機能で、農薬検出を判定する SANTE のクライテリア¹⁾を利用したピーク自動判定ツールです。残留農薬一斉分析では、分析対象は数百成分にも及ぶことが多いため、解析には多大な時間がかかります。そこで、スクリーナーを用い、ピーク検出にかかる結果の自動判定機能のためのパラメータを最適化し、残留農薬多成分一斉分析における、解析時間の短縮を試みました。マトリックスの多い香辛料をサンプルとして解析を行った結果、従来の解析時間と比べて約 1/4 にまで短縮することができました。

はじめに

残留農薬分析では、GC/MS/MS や LC/MS/MS を用いた多成分一斉分析が主流です。分析対象は数百成分にも及ぶことが多いため、分析が終わっても、その解析には多大な時間がかかります。最新のソフトウェアでは、複数のクロマトグラムを並べながら解析できる機能等も存在しますが、それでも多成分の農薬の検出の有無を確認することは負担が大きい作業となっています。

そこで近年開発された、ピーク検出にかかる結果の自動判定機能を用い、判定のためのパラメータを最適化し、残留農薬多成分一斉分析における解析時間の短縮を試みましたので報告します。

方法

サンプル

唐辛子 2 種類、フェンネル、マンダリン、花椒

前処理

STQ GC-B 法に準ずる (アイスティサイエンス社)

検量線

サンドイッチ注入を用いた標準添加法

検量線：サンプル 1 μ L + 標準溶液 1 μ L

サンプル：サンプル 1 μ L + 溶媒 1 μ L

濃度 2 ~ 25 ppb

分析条件

装置	Intuvo 9000GC-7000D トリプル四重極 GC/MS
カラム	VF-5ms (p/n CP-8944-INT) 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m
注入モード	パルスドスプリットレス (20 psi, 1 min)
注入口温度	250 $^{\circ}$ C
ガードチップ温度	オーブントラック
バス温度	280 $^{\circ}$ C
注入口ライナ	ウルトライナートスプリットレスライナ (p/n 5190-2293)
注入量	サンドイッチ注入 1 μ L
カラム流量	水素 1.3 mL/min
オープン温度	70 $^{\circ}$ C (2 min) - 25 $^{\circ}$ C /min - 150 $^{\circ}$ C - 3 $^{\circ}$ C /min - 200 $^{\circ}$ C (0 min) - 8 $^{\circ}$ C /min - 310 $^{\circ}$ C (5 min)
トランスファーライン温度	290 $^{\circ}$ C
イオン源温度	300 $^{\circ}$ C
測定モード	MRM
ゲイン係数	10

Intuvo 9000 GC について

Intuvo 9000 GC はカラムをダイレクトに加熱することができ、消費電力を従来の 1/2 に抑えることができる GC です。また、カラムのトリミングが不要となっており、ガードチップ (不活性化処理済み) がガードカラムの役割をします。

図 1 に Intuvo 9000 GC-7000D トリプル四重極 GC/MS の写真とカラムおよびガードチップの写真を示します。

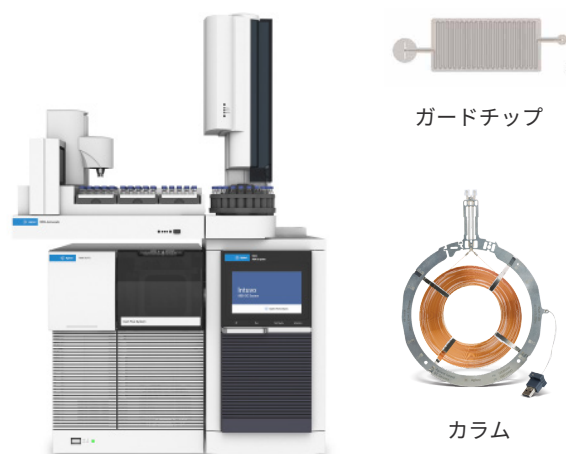


図 1. Intuvo 9000 GC-7000D トリプル四重極 GC/MS

データ解析

MassHunter Quantitative Analysis ver 12.0

ピーク自動判定のためのクライテリア

GC/MS を用いたときの、農薬検出を判断するクライテリアは、SANTE11312/2021 ガイドライン中で、Requirements for chromatography と Requirements for mass spektrometry (MS) でそれぞれ定義されています。

クロマトグラフィーではリテンションタイム (RT) のずれは matrix-matched 標準溶液を原則としており、 ± 0.1 分とされています。

またマスマスペクトロメトリーではトリプル四重極を使った場合は下記のクライテリアが示されています。

- ① 2 つ以上のトランジション
- ② SN比が 3 以上
- ③ 検量線に用いた標準溶液のターゲットとクオリファイアの比に対して $\pm 30\%$ 以内 (同一シーケンスで) が定められています。

ただし、この基準のみで自動判定にかけると【要検討】に相当する農薬が多くなってしまい、結果を確認する作業がこれまでの解析と変わらなくなってしまうことから、クライテリアの設定項目には、共溶出スコア（ターゲットとクオリファイアのリテンションタイムのずれ）が、追加の基準として設けられています。また、自動判定をより効率的に行うために、既存のMassHunterの機能である、非リファレンスウィンドウや、検出と判定するためのスレッシュホールドの設定を行いました。

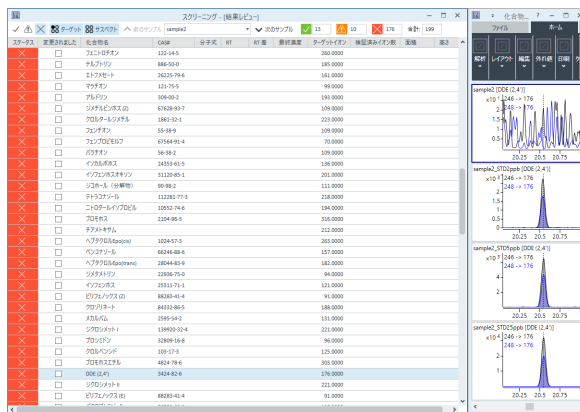
結果

農薬の検出のための自動判定ソフトウェアを使うと、結果は【検出】、【要検討】、【非検出】の3つのグループに分類されます。

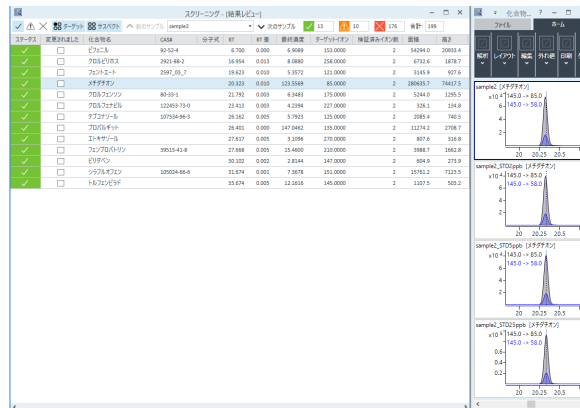
ピーク自動判定による解析時間の短縮化のためのポイントは、【要検討】を少なく、【非検出】を多くすることです。しかしながら、偽陰性（検出しているのに【非検出】に分類されてしまうこと）はあってはならないため、スレッシュホールドについては、検量線に用いた標準溶液の各農薬のレスポンスを元に農薬ごとに設定しました。今回は検量線最低濃度のレスポンスの20%をスレッシュホールドに設定しました。スレッシュホールドの値はスク립トのSet Peak Filter Area Threshold*で一括設定することができます。図2に自動検出による分類の様子を示しました。基本的には【非検出】に分類された農薬はクロマトグラムを確認しなくても済むようなパラメータ設定をしましたが、クロマトグラムを確認する場合でも、【非検出】としての確認になることから、心理的負担が少なくなります。

* 感度の厳しい農薬では検量線最低濃度はメソッド内の有効ポイントのチェックを外すことで変更することができます。

非検出



検出



要検討

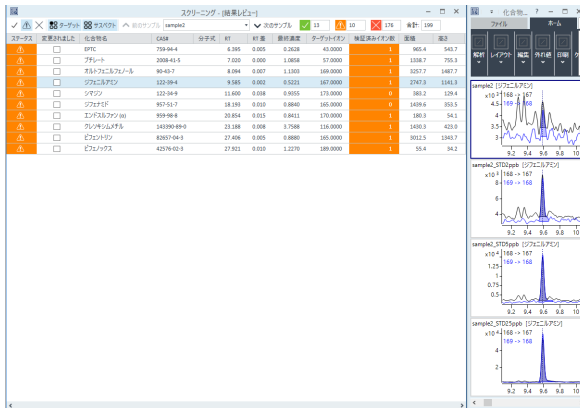


図2. ピーク自動判定機能を使った結果の例

図 3 には、自動判定によって分類されたクロマトグラムを示します。選択性が高く、検出の有無が容易に判断できた農薬は【非検出】もしくは【検出】に分類されました。一方、ジメトモルフ (Z) は近接する夾雑成分のピークを拾っており、プロピコナゾールではターゲットイオンのピーク形状も悪く、クオリファイイオンも検出していないことから、【要検討】に分類されました。クロマトグラムを確認したのちに、検出していない可能性が高いと判断できた場合は自動判定結果から容易に【非検出】に変更することができ、効率よい解析が可能になっています。

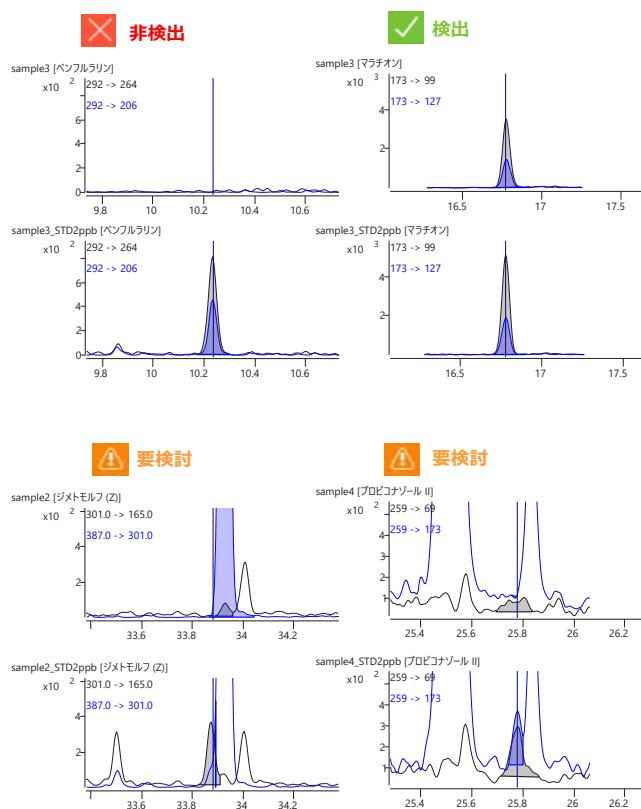


図 3. クロマトグラム例
上段：実サンプル 下段：標準添加サンプル

検量線最低濃度に対するスレッシュホールドやリテンションタイムのずれなどのパラメータを最適化することで、【要検討】に分類された農薬数は表 1 のように大幅に絞ることができ、確認作業の時間を短縮することができました。ただし、マンダリンは夾雑成分が多く、他のサンプルでは 10 前後の農薬が【要検討】に分類されたのに対して 38 と多い結果となりました。

またパラメータを最適化した後の各サンプルの自動判定結果を図 4 のグラフに示しました。

表 1. パラメータの最適化による要検討農薬数の変化

	最適化前	最適化後
唐辛子 1	148	11
唐辛子 2	148	10
フェネル	144	7
マンダリン	162	38
花椒	165	11

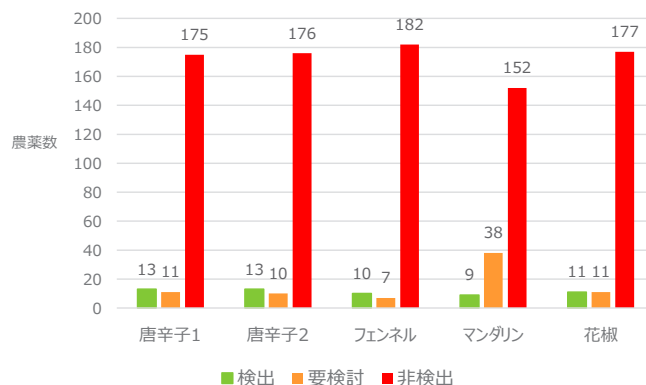


図 4. 各サンプルの自動判定結果

まとめ

マトリックスの多い香辛料をサンプルとし、ピーク自動判定機能を用いて解析しました。パラメータを最適化することで、要検討農薬を大幅に減らし、従来の解析時間と比較して約 1/4 にまで短縮できました。判定結果がグループ分けされることで、解析者の心理的負担も大幅に軽減することができました。また自動判定機能を使ったとしても、結果一覧とクロマトグラムは連動しているため、クロマトグラムを確認しながら作業できることの意味は大きいと考えられます。

一方、マトリックスの特に多いサンプルでは、夾雑成分による妨害が大きく、自動判定機能でも要検討になる農薬が多く認められました。また、マトリックスの影響でリテンションタイムが大幅にずれると、クライテリアを緩く設定する必要があり、せっかくの自動判定機能を生かすきれないデメリットが生じてしまう可能性があります。そのため、自動判定による解析を効率的に利用するには、サンプルの精製も重要なキーとなります。

本報告では、標準添加法のため、標準溶液と実試料間での RT のずれはほぼないという前提で RT の絞り込み設定は 0.1 分 (±0.05 分) で行いました。それ以外の自動判定のパラメータについては、異なる前処理や異なるサンプルなどで検証した結果、ほぼ同一の条件で問題なく使えることが分かりました。

スクリーナーのワークフローおよびパラメータ設定についての詳細は、【GCスクリーニング for SIMMRM_ワークフローガイド】を参照ください。なおスクリーナーは MassHunter Quantitative Analysis ver.12.0 より使用可能です。

謝辞

本検討にあたり、サンプルをご提供いただきましたエスピー食品株式会社 佐川岳人氏、大岡祐二氏に深謝申し上げます。

なお本アプリケーションノートは第 119 回日本食品衛生学会学術講演会 (2023, 船堀) で発表した内容です。

参考文献

- 1) ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED SANTE 11312/2021 v2
[ANALYTICAL QUALITY CONTROL \(europa.eu\)](https://europa.eu)

※ 水素ガスの取り扱いについて

水素ガスは酸素との混合により引火爆発を起こしやすいガスです。水素ガスは水素ガス供給源、ガスを導入する分析機器および途中配管を含めた使用環境、機器操作等に、使用者の責任において細心の注意の上で取り扱う必要があります。Intuvo 9000 GC に関するより詳細な情報は、下記の技術概要をご確認ください。

5994-5412JAJP [Agilent Intuvo 9000GC システムにおける水素の安全性](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマ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。

DE87813031

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2024
Printed in Japan, March 4, 2024
5994-7218JAJP