

# Agilent イナートフローパスを用いた GC/MS/MS による果物および 野菜中の農薬分析

## アプリケーションノート

食品検査と農業

### 著者

Limian Zhao and Mike Szelewski  
Agilent Technologies, Inc.

### 要約

Agilent イナートフローパス (IFP) ソリューションを用いて、各種果物および野菜に含まれる微量農薬の GC/MS/MS 分析について詳しく評価、検証しました。その結果、IFP は GC の流路全体にわたり表面が非常に不活性で、表面の活性部位が分析対象物に与えるマイナスの影響を低減できることが明らかになりました。さらに比較試験の結果、Agilent IFP は特定のマトリックス中の不安定な農薬の一部について、Agilent 以外の不活性化された同等の部品よりも有効であることが判明しました。

### はじめに

マトリックスが複雑なサンプルに含まれる農薬を分析する際に流路が不活性であることは、分析の精度や確度、耐久性、安定性において重要です。Agilent IFP ソリューションには、UltiMetal Plus イナート注入口、キャピラリフローテクノロジー (CFT) デバイス、およびフレキシブルメタルフェラルと共に、ウルトライナートカラム、ウルトライナート注入口ライナ、およびゴールドシールが含まれます。サンプルが通る GC 流路全体にわたり表面が非常に不活性で、表面の活性部位が分析対象物に与えるマイナスの影響を低減します。

GC や GC/MS による測定で農薬の多成分残留分析を行う際には、常に困難が伴います。求められる定量限界は多くの農薬について ppb という低レベルであり、より高度な分析性能が要求されます。広く用いられているシングル四重極型の GC/MS と比べて、GC/MS/MS 法は選択性がはるかに優れているため、装置の検出限界が著しく向上します。



**Agilent Technologies**

農薬の化合物には、しばしばヒドロキシル基 (-OH) やアミノ基 (R-NH-)、イミダゾールやベンゾイミダゾール (-N=)、カルバメート (-O-CO-NH-)、尿素誘導体 (-NH-CO-NH-)、有機リン酸基 (-P=O) などの官能基が含まれます。こうした種類の分子は流路表面の活性部位との相互作用が発生しやすく、その結果、化合物が吸着したり分解したりします。そのため、流路の表面が不活性であることは、微量農薬分析にとって重要です。

QuEChERS サンプル前処理法は 2003 年、食品中の農薬を分析するために USDA の科学者によって導入されました [1]。この処理法は、高速、簡単、低価格、効果的、高い耐久性、安全性という利点を持ち、その特長により農薬の多成分残留分析法として急速に世界中で受け入れられました。QuEChERS による抽出物は、MS と組み合わせた LC および GC で同時に分析され、広範な残留農薬が測定されます。しかしながら、QuEChERS 法で処理したこれらの食品抽出物は依然として高沸点化合物などのサンプルの不純物が含まれています。GC/MS あるいは GC/MS/MS を検出器として使用する場合、QuEChERS の抽出物が原因で分析カラムや MS イオン源が汚染されたり、劣化したりすることがあります。その結果、活性のある化合物のピークの形状や強度が悪化して、結果が不正確になる可能性があります。また、QuEChERS の抽出物によって分析カラムの寿命が短くなり、MS を頻繁にメンテナンスしなければならない場合もあります。信頼できる結果が得られるだけでなく、分析カラムと MS イオン源の汚染を低減する技術と消耗品を利用する必要があります。

アジレントのウルトライナート部品は、微量農薬分析において、表面が極めて不活性であることが実証されています [2-6]。本研究では、さまざまな果物および野菜のマトリックスに含まれる複数の農薬の分析について、Agilent IFP 全体を評価しました。比較対象として、アジレント以外のベンダーの不活性化した部品を用いたシステムを構築して検討しました。さらに、Agilent IFP と共にアナリティカルプロテクタント (AP) を使用した際の影響について、マトリックスの検量線の直線性、スパイクした QC の定量結果の精度と確度、複数注入した際の経時的な耐久性について比較しました。二層または三層注入のサンドイッチ注入法を、オンラインのマトリックススパイクに適用しました。サンドイッチ注入法を用いることにより、検量線の標準溶液の注入時にマトリックスブランクのサンドイッチ注入を使用して、マトリックスを考慮した検量線を得ることができます。サンドイッチ注入を適用することでマトリックス適合キャリブレーション標準を調製するためのベンチワークを大幅に節減する一方で、安定性を高め、調製ミスによる誤差の可能性を低減しました。6 種類のマトリックス (イチゴ、オレンジ、プラム、タマネギ、赤トウガラシ、ハウレン草) を用いてシステムの性能を評価しました。

## 実験方法

試薬および溶媒はすべて HPLC 用または分析グレードのものを用いました。アセトニトリル (ACN) は Honeywell B&J (マスキーゴン、ミシガン州、米国) から、Ultra Resi 分析グレードのアセトンは J. T. Baker (フィリップスバーグ、ニュージャージー州、米国) から、酢酸は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州、米国) から入手しました。農薬の標準および内部標準 (リン酸トリフェニル、TPP) は、Sigma-Aldrich、Chem Service (ウエストチェスター、ペンシルバニア州、米国)、または Ultra Scientific (ノースキングスタウン、ロードアイランド州、米国) から入手しました。L-グルタミン酸 g-ラクトンおよび D-ソルビトールは Sigma-Aldrich から入手しました。

## サンプル前処理

ACN 100 mL に氷酢酸 1 mL を加えて 1% 酢酸 ACN 溶液を調製し、試薬ブランクとして使用しました。また、この溶液は QuEChERS 法の抽出溶媒および純粋な農薬標準を調製するブランク溶媒としても使用しました。標準および内部標準 (IS) 溶液 (2 mg/mL) はそれぞれアセトンで調製し、-20 °C で保管しました。20 µg/mL の混合標準 (32 種類の農薬) 溶液は、各農薬原液を適度にアセトンで希釈して調製しました。20 µg/mL のリン酸トリフェニル ACN 溶液を調製し、各農薬原液を適度に希釈して、内部標準 (IS) のスパイク溶液として使用しました。8 種類の標準溶液 (2、4、10、20、40、100、150、200 ng/mL) は、20 µg/mL 混合標準溶液を試薬ブランクで適度に希釈して調製しました。確認用の 3 レベルの QC (20、100、200 ng/mL) は、20 µg/mL 混合標準溶液を適度にマトリックスブランクで希釈して調製しました。次に、IS 溶液をサンプルにスパイクして、サンプル中の濃度を 200 ng/mL にしました。

L-グルタミン酸原液 (50 mg/mL) および D-ソルビトール原液 (50 mg/mL) は水で調製しました。次に、AP の溶液 (20 mg/mL L-グルタミン酸および 10 mg/mL D-ソルビトール) をアセトニトリルで適度に希釈して調製しました。溶液 (40 µL) を 500 µL のマトリックスブランクまたは試薬ブランクにスパイクし、標準またはサンプルとのサンドイッチ注入に使用しました。

イチゴ、オレンジ、プラム、タマネギ、赤トウガラシ、ハウレン草の 6 種類の果物または野菜を用いて、マトリックスブランクサンプルを調製しました。標準の AOAC QuEChERS 抽出法に従い、Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キットおよび一般的な果物および野菜用の分散 SPE キットを使用してマトリックスブランクを調製しました。

## 機器

すべてのテストは、7693B オートサンブラと 7000 シリーズ GC/MS/MS システムを備えた Agilent 7890A GC で行いました。32 種類の分析対象のマルチブルリアクションモニタリング (MRM) 条件は以前の文献 [3,5] に掲載されており、本研究ではそのまま参照しているのを再掲していません。先に述べたように、MRM メソッドの最適化プロセスは、Agilent 農業および環境汚染物質 MRM データベース (G9250AA) を用いて容易に実現できます。このデータベースには、1,070 種類を超える化合物の MS/MS 条件とリテンションタイムの情報が収められています [7]。

バックフラッシュを適用しましたが、これは複雑なサンプルマトリックスの測定で推奨しています [8,9]。リテンションタイムロッキング (RTL) を使用して、リテンションタイムや、MRM グループなどのタイムイベントを個別にリキャリブレーションしなくても済むように設定しました [10]。標準をスパイクしたサンプルの分析時間の合計は 23 分、バックフラッシュの時間は 2 分でした。分析途中でマトリックスブランクの測定は、8 分間の高速オーブングラジエントと 2 分間のバックフラッシュで時間を節約しました。

## カラムおよびサンプルの準備

### カラム

Agilent J&W HP-5ms UI、15 m × 0.25 mm、0.25 μm (部品番号 19091S-433UI)

### サンプル前処理

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 抽出キット (部品番号 5982-5755) および一般的な果物および野菜用分散 SPE キット (部品番号 5982-5022)

## GC 条件

GC:	Agilent 7890A GC
オートサンブラ:	Agilent 7693 オートサンブラおよびサンプルトレイ 5 μL シリンジ (部品番号 5181-5246)、注入量 1 μL プレ注入溶媒 A (アセトン) 洗浄 3 回 サンプルポンプ 3 台 ポスト注入溶媒 B (アセトニトリル) 洗浄 3 回
サンドイッチ注入:	総量 1.1 μL マトリックスを含まない標準溶液の場合、 標準溶液 0.5 μL、マトリックスブランク 0.5 μL、 溶媒ブランク 0.1 μL の三層サンドイッチ注入。 マトリックスを含むサンプルの場合、 マトリックスサンプル 0.5 μL、溶媒ブランク 0.6 μL の 二層サンドイッチ注入。
キャリア:	ヘリウム、コンスタントプレッシャーモード
ガスフィルタ:	GC/MS 用ガスクリーンキット、 1/8 インチ (部品番号 CP17974)
注入口:	UltiMetal スプリット/スプリットレス注入口 (部品番号 G3970A)、パルスドスプリットレスモード、280 °C
パルス注入 圧力:	36 psi、1 分間
スプリットベントへの パージ流量:	1 分で 50 mL/min
注入口圧力:	測定時 18.35 psi (RT ロック)、バックフラッシュ時 1.0 psi
RT ロッキング:	クロルピリフォスメチル、8.298 分
オープン:	サンプル測定時は、100 °C で 2 分間、 50 °C/min で 100~150 °C、 6 °C/min で 150~200 °C、 16 °C/min で 200~300 °C、2 分間保持。 マトリックスブランク測定時は、100 °C で 1 分間、 50 °C/min で 100~300 °C、1 分間保持。
ポストラン:	300 °C で 2 分間 (サンプル測定時)、300 °C で 4 分間 (マトリックスブランク測定時)
キャピラリー・フロー・ テクノロジー:	UltiMetal Plus パージ付 Ultimate ユニオン (部品番号 G3182-61581)、分析カラムおよび注入口のバックフラッシュ用
Aux EPC ガス:	パージ付き Ultimate ユニオン に配管されたヘリウム
ブリードライン:	外径 0.0625 インチ x 内径 0.010 インチ x 100 cm、316SS チューブ、オープンの上部に配置
Aux 圧力:	測定時 4 psi、バックフラッシュ時 75 psi
カラム 1 の接続:	注入口とパージ付き Ultimate ユニオンの間
リストリクタ:	不活性フューズドシリカチューブ、0.65 m × 0.15 mm (部品番号 160-7625-5)
カラム 2 の接続:	パージ付き Ultimate ユニオンと MSD の間

## MSD の条件

MSD:	Agilent 7000 トリプル四重極 GC/MS システム、 イナート、パフォーマンスエレクトロニクス付き
真空ポンプ:	パフォーマンススターボ
モード:	MRM
チューニングファイル:	Atune.u
トランスファーライン 温度:	280 °C
イオン源温度:	300 °C
四重極温度:	150 °C (Q1 および Q2)
溶媒待ち時間:	2.3 分
コリジョンガスフロー:	He クエンチガス 2.35 mL/min、 N <sub>2</sub> コリジョンガス 1.5 mL/min
MS 分離能:	MS1 および MS2 は 1.2 u

## 使用した消耗品

バイアル:	茶色スクリーバイアル (部品番号 5182-0716)
バイアルキャップ:	青色スクリーキャップ (部品番号 5182-0717)
バイアルインサート:	150 µL ガラスインサート、樹脂足付 (部品番号 5183-2088)
セプタム:	アドバンスドグリーン、ノンスティック、11 mm (部品番号 5183-4759)
フェラル:	内径 0.4 mm、85/15 ベスベル/グラファイト注入口フェラル (部品番号 5181-3323)、 内径 0.4mm、85/15 ベスベル/グラファイト MS インタフェースフェラル (部品番号 5062-9526)、 UltiMetal Plus フレキシブルメタルフェラル (部品番号 G3188-27501)
キャピラリー・フローテクノロジー:	パージ付 Ultimate ユニオン (部品番号 G3182-61581)
内部ナット:	部品番号 G2855-20530
ブリードライン:	外径 0.0625 インチ × 内径 0.010 インチ × 100 cm、316SS チューブ (部品番号 0100-2354)
ティーパー:	1/16 インチ、真鍮製 Swagelok (部品番号 0100-0680)
ティーパーブリードのフェラル:	1/16 インチ、ベスベル、10 個 (部品番号 0100-1329)
注入口シール:	ウルトライナート金メッキ注入口シール、ワッシャ付き (部品番号 5190-6144)
注入口ライナ:	Agilent ウルトライナートライナ、不活性化シングルテーパ、スプリットレス、ガラスウール入り、ノンスティック O リング付き (部品番号 5190-2293)

Agilent IFP および他社製のイナートフロー部品のシステム構成を表 1 に示します。

この研究では、ホットスプリットレスモードでスプリット/スプリットレス注入口を用いました。多くのケースではマルチモード注入口 (MMI) が農薬分析には強く推奨されていますが [11]、このようなアプリケーションには依然としてスプリット/スプリットレス注入口が一般的に使われます。MMI を用いた場合は、活性のある多くの分析対象に対して性能が向上し、活性のある分析対象成分を低温でカラムに導入する低温スプリットレスや、さらに高感度化を図ることができる LVI モードでも分析できます。

表 1. 比較用に不活性化した GC 流路部品

流路	スプリット/スプリットレス注入口	注入口シール	ライナ	カラム	CFT 装置およびフェラル
Agilent イナートフローパス	UltiMetal Plus	ウルトライナートゴールドシール	ウルトライナートシングルテーパ、スプリットレス、ウール入り	HP-5ms UI	UltiMetal パージ付 Ultimate ユニオン UltiMetal フレキシブルメタルフェラル
他社製の不活性化された流路部品	Siltek 処理	Siltek 処理ステンレスシール	Sky シングルテーパ、スプリットレス、ウール入り	Rxi-5ms	Siltek パージ付 Ultimate ユニオン Siltite メタルフェラル

## サンプル注入シーケンス

典型的なサンプルバッチでは合計 72 回の注入を行い、そのなかには試薬ブランク、マトリックスブランク、3 つのレベルのマトリックススパイク QC 6 セット、8 つのレベルのキャリブレーション標準 1 セットが含まれます。QC は、およそ 10 回の注入に 1 回注入しました。ただし、キャリブレーション標準溶液を注入した 10 回目から 20 回目を除きます。マトリックスブランクは、QC と標準の間で必要に応じて注入しました。マトリックスブランク測定のほとんどで高速オープン温度プログラムを使用し、シーケンス全体で機器分析の時間を短縮しました。

## 結果と考察

これらの試験の目的は、GC/MS/MS による果物および野菜のマトリックス中の農薬分析において、Agilent IFP を評価することです。評価と比較の結果は、2~200 ng/mL の範囲における検量線の直線性 ( $R^2$ ) で行いました。マトリックススパイク QC の精度は回収率で評価をし、確度は %RSD および 95 % 信頼区間 (CI) に基づきます。各シーケンスについて、QC 平均回収率および %RSD または 95 % CI を各農薬毎にサンプル数  $n = 18$  で算出しました。分析には 3 つのレベルの QC が含まれ、計 70 回の注入にわたって 6 セットの QC を測定したため、平均 QC の精度と確度のデータには、マトリックスサンプルを複数注入する手法の繰返し精度だけでなく、低濃度から高濃度の範囲におけるレスポンスの直線性も反映されています。

## サンドイッチ注入

サンドイッチ注入は単純な概念で、さまざまなサンプルマトリックス分析に非常に有効です。マトリックス適合キャリブレーション標準の利用は、農薬の分析において常に広く受け入れられてきており、マトリックスの影響を低減して、正確で信頼性の高い定量結果を得ることができます。しかし、マトリックス適合キャリブレーション標準の調整は単調かつ時間のかかる作業で、複数のサンプルマトリックスを分析する場合はなおさら時間がかかります。また、この作業では調製中に人為的なミスが起こる可能性があります。ミスによって測定結果が台無しになります。サンドイッチ注入は、7693 オートサンプラの二層および三層注入の機能を活かして、サンプル注入時のオンラインのマトリックススパイクに使用します。その結果、溶媒で調整した1セットのキャリブレーション標準溶液を、さまざまなサンプルマトリックスの分析で使用できます。例えば、この研究では1セットのキャリブレーション標準(8レベルの濃度)を試薬ブランクで調製しました。そして6種類のマトリックスサンプルにこのキャリブレーション標準溶液とマトリックスブランクをサンドイッチ注入で注入しました。これによりサンプルを調製するベンチワークに必要な時間と作業が大幅に削減され、異なるマトリックスサンプルにわたってより安定して定量でき、キャリブレーション標準溶液の調製における予測できない人為的なミスおよび無用な手順の誤りを低減することができます。

二層注入モードでは、オートサンプラのシリンジにより1回の注入で2個のバイアルからサンプルを分取することができ、さらに三層注入モードでは、シリンジにより1回の注入で3個のバイアルからサンプルを分取することができます。エアギャップがデフォルトで設定されており、別のバイアルからサンプルを取り出す際のクロスコンタミネーションを防ぎます。サンプルがすべて注入口ライナに注入されると、気化、混合され、GCカラムに注入されます。ウール入りウルトラライナートライナを使用しているため、ライナ内部の不活性化されたウールで得られる大きい表面積により、サンプルがカラムに入る前にライナ内で液体サンプルが気化し、サンプルを均質に混合することができます。試薬ブランクで調製したキャリブレーション標準には、分取したマトリックスブランクを添加することで、一方でマトリックスサンプルには、分取した試薬ブランクを添加できます。異なるサンプルのサンドイッチ注入において最終注入量での溶媒とマトリックスの比率を保持することが重要です。異なった比率ではマトリックスが異なる比率で希釈されてマトリックス効果が異なる結果になったり、あるいは分析対象物が異なる比率で希釈される可能性があります。いずれも誤った定量結果が導かれる恐れがあります。

マトリックスブランクあるいは試薬ブランクのいずれも注入中に添加されるため、実際に注入されるサンプル量は少なくなり、測定定量下限が引き上げられます。GC/MS/MSの高感度と選択性により、機器の検出下限および定量下限は通常、果物や野菜中の農薬のMRLを大きく下回ります。したがって、注入量が少なくなって感度が多少下がったとしても農薬分析与える影響は軽微です。サンドイッチ注入には明らかに効果があることから、さまざまなサンプルマトリックス中の農薬分析法としてこの手法を検討する価値があります。

サンドイッチ注入の手法を検証するために、イチゴのマトリックスブランクで一連のキャリブレーション標準 (1~100 ng/mL) を調製し、通常の注入量である 1  $\mu$ L の方法を適用しました。また、試薬ブランクでキャリブレーション標準 (2~200 ng/mL) をもう 1 セット調製して、標準 0.5  $\mu$ L とイチゴのブランク 0.5  $\mu$ L のサンドイッチ注入によるもう一つの方法を利用しました。次に、この 2

セットの検量線を使用して、20 および 100 ng/mL でスパイクした同じイチゴの QC を定量しました。その結果、サンドイッチ注入法により非常によく似たクロマトグラフィー (図 1) および優れた直線性 (図 2)、正確で精度の高い定量結果 (図 3) が得られることが実証されました。このように、サンプルマトリックス中の農薬の分析が十分に検証されています。

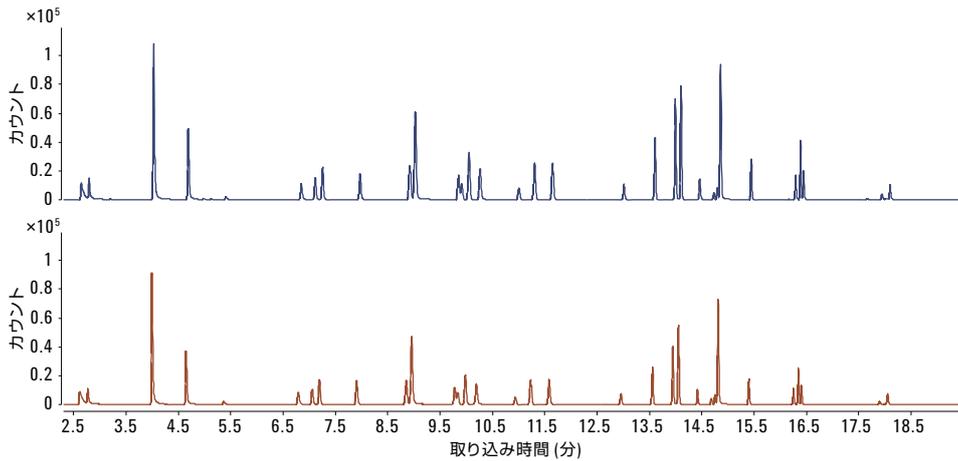


図 1. 通常の注入 (青) およびサンドイッチ注入 (赤) によるイチゴのマトリックスブランク中の 100 ng/mL 標準のクロマトグラム。

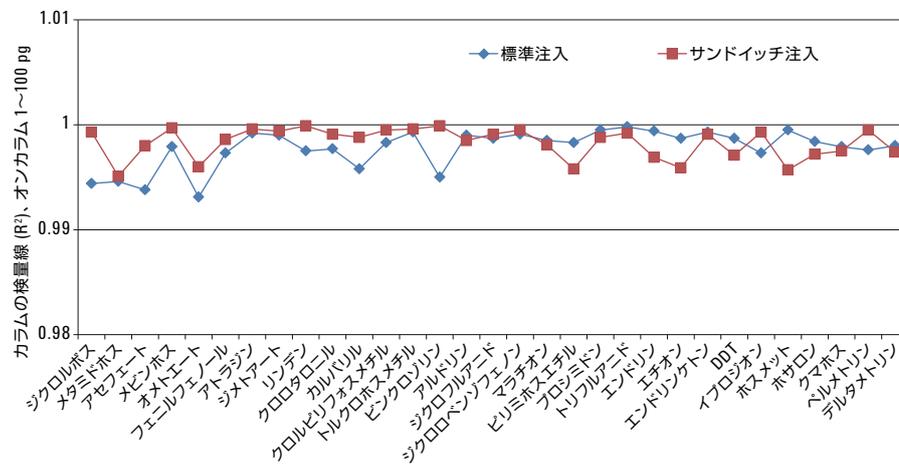


図 2. 通常の注入およびサンドイッチ注入による検量線の相関係数 (R<sup>2</sup>) の比較。キャリブレーション範囲は、すべての農薬についてオンカラム 1~100 pg。

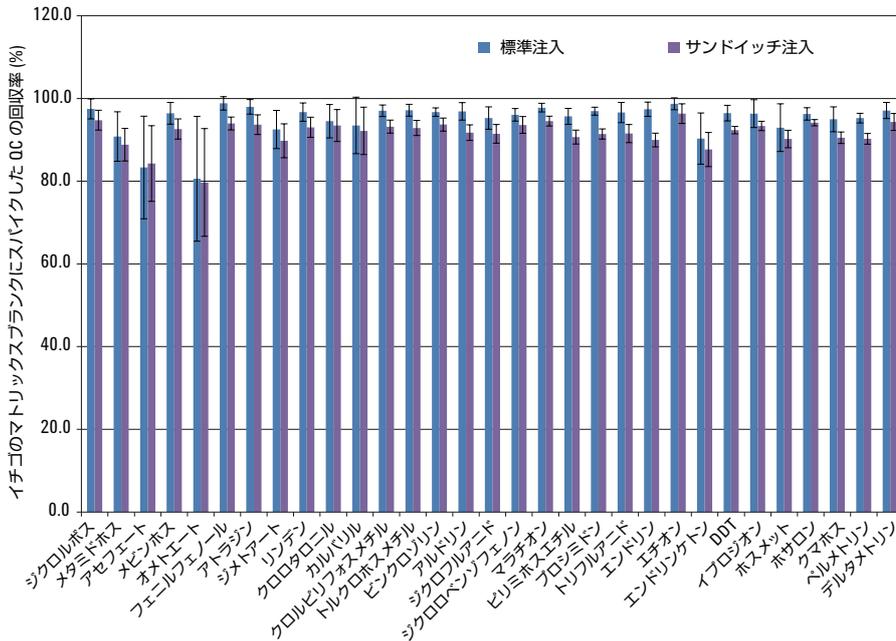


図 3. イチゴのマトリックススパイク QC、20 および 100 ng/mL、通常の注入およびサンドイッチ注入における回収率の比較、n = 12。エラーバー = 95 % CI。

## 6 種類のサンプルマトリックスにおけるメソッドバリデーション

Agilent IFP を用いて、確立されている GC/MS/MS 法を 6 種類のサンプルマトリックス (イチゴ、オレンジ、プラム、タマネギ、赤トウガラシ、ホウレン草) で検証しました。6 種類すべてのマトリックス中の農薬すべてについて、2 ng/mL の定量下限 (LOQ) を達成しました。赤トウガラシ中の典型的な LOQ の MRM クロマトグラムを、ピーク同定の例として図 4 に示しています。塩基

下で不安定な 3 種類の農薬、クロロタロニル、ジクロロフルアニド、トリフルアニドはタマネギのマトリックス中で非常に不安定で、マトリックスにスパイクすると速やかに分解します。タマネギのサンプルについては、これら 3 種類の化合物の検量線は許容範囲内でした。これは、サンドイッチ注入により、化合物とタマネギのマトリックスとの間で相互作用する時間が極めて短くなるため、これらの化合物が分解されなくなったからです。ただし、サンプルの測定直前に QC サンプルを調製した場合でも、後

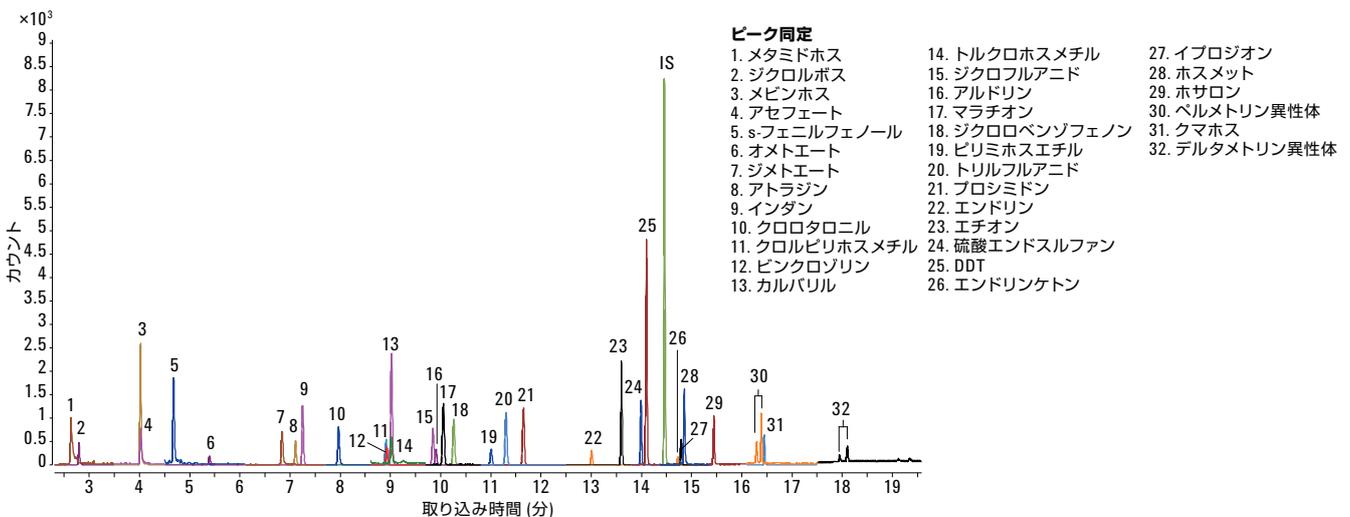


図 4. 20 ng/mL スパイクしたオレンジサンプルを Agilent イナートフローバスを用いて測定した GC/MS/MS クロマトグラム (MRM)



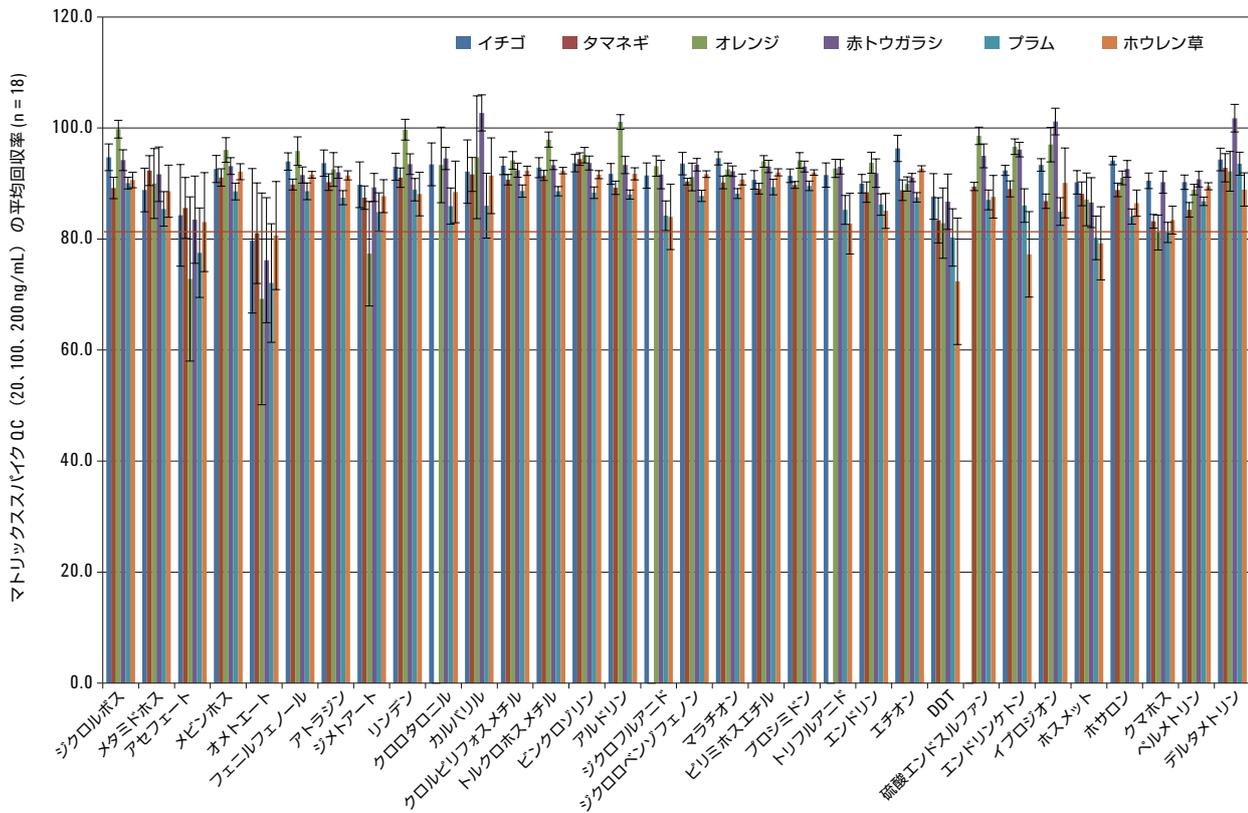


図 6. Agilent イナートフローパスを用いて GC/MS/MS で測定した、6 種類のマトリックススパイク QC の定量結果。マトリックスブランク抽出物に 3 レベルの QC (20, 100, 200 ng/mL) をスパイク。n = 18。エラーバー = 95 % CI。

## Agilent イナートフローパスと Agilent 以外の不活性化された部品の比較

Agilent IFP を他のメーカーの不活性化された対応する部品と比較しました。不活性化された部品を表 1 に示しています。2 つの GC 流路を同一の GC/MS/MS に取り付けました。Agilent IFP は、フロント注入口へ取り付け MS に接続し、最初に測定しました。次に、Agilent 以外の不活性化された部品をバック注入口へ取り付け MS に接続し、測定しました。同一のサンプルへ両方の流路で比較試験を行いました。MS に入る GC チャンネル (注入口およびカラム) を切り換えるたびに、MS をチューニングしました。

Agilent IFP の方が Agilent 以外の不活性化された部品の流路よりもレスポンスが良いという結果になりました。図 7 には、6 種類

のマトリックスに 20 ng/mL スパイクした QC について、Agilent IFP および Agilent 以外の不活性化された部品を用いて測定したクロマトグラムを示しています。異なるサンプルマトリックスでは、明らかな違いが見られます。赤トウガラシやオレンジ、タマネギなどのマトリックスでは違いがはっきり表れたのに対して、プラムやホウレン草などの他のマトリックスでは、レスポンスは全般に同等でした。このように、Agilent IFP を用いると全体のレスポンスが向上する点については過去に報告されています [12]。しかし、全体的なレスポンスが向上した理由は、表面の不活性度が改善されたからだけではありません。このレスポンスの改善は、活性のある分析対象物や多くの安定した対象物の両方で顕著であり、大抵の分析対象物において、2 種類の不活性流路の間で分析対象物と内部標準のピーク面積比が同程度だからです。

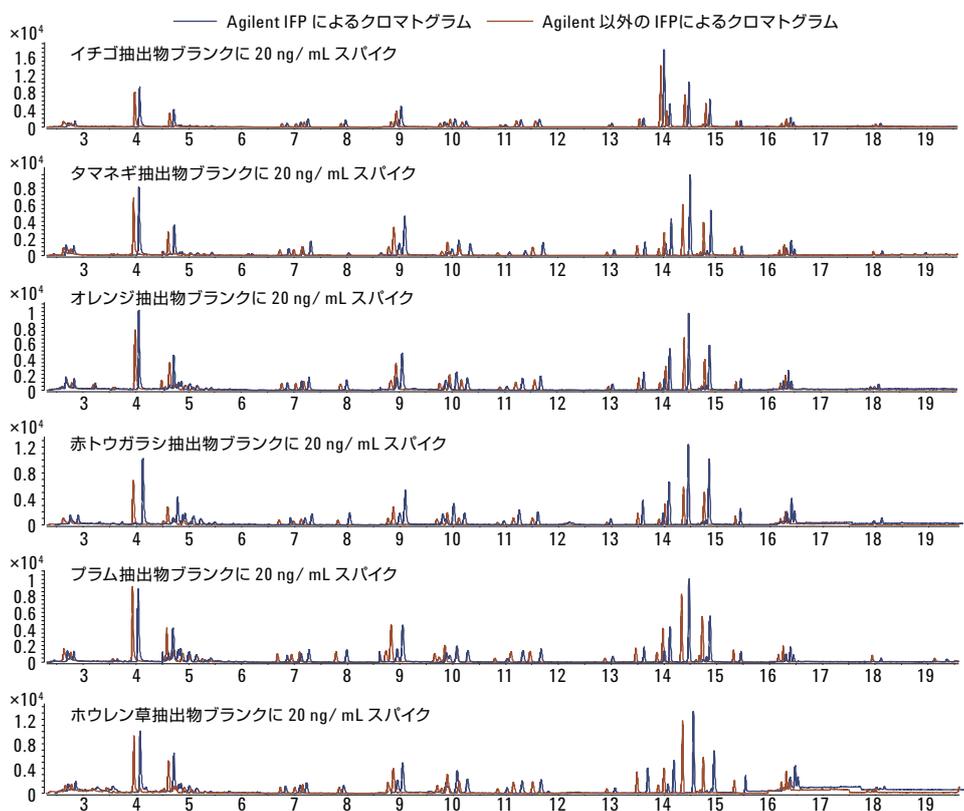


図 7. Agilent イナートフローパス (青) および Agilent 以外の不活性化された部品 (赤) を用いた 6 種類のマトリックス中の 20 ng/mL 標準のクロマトグラム

Agilent IFP の表面の不活性化度が Agilent 以外の不活性化された部品よりも改善していることを示す結果として、検量線の直線性が優れており、耐久性が持続する点があります。これは、活性のある不安定な農薬を複数回注入した際のシグナルの減少やリテンションタイムの遅れなどから明らかです。図 8 に示すとおり、不安定な農薬であるオメトエートに関し、6 種類のサンプルマトリックスで優れた検量線の直線性 ( $R^2 > 0.99$ ) が得られました。一

方で、Agilent 以外の不活性化された部品を用いた場合、マトリックス中のオメトエートの検量線は、6 本のうち 5 本で直線性が許容範囲を外れた ( $R^2 < 0.99$ ) 結果になりました。図 9 に、反応性の高い農薬に関するシステムの耐久性を比較した結果を示します。このように、Agilent IFP を使用すると、活性を持つ農薬のレスポンスがより安定し、より多くのサンプルで許容範囲に収まる結果が得られるようになりました。

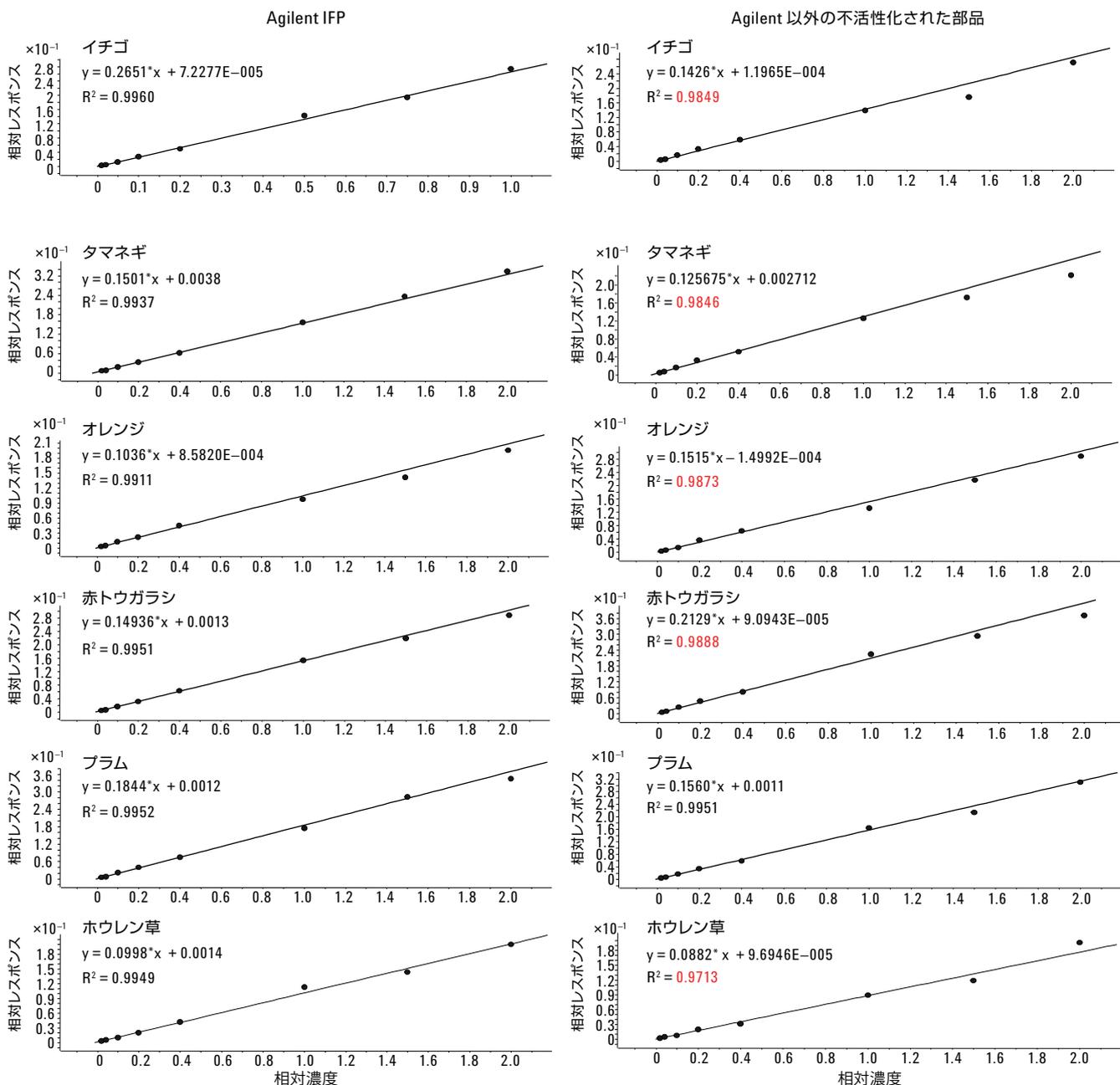


図 8. Agilent イナートフローパス (左) および Agilent 以外の不活性化された部品 (右) を用いた各種マトリックスでのオメトエートの検量線。キャリブレーション範囲は、マトリックスブランクにおいて 2~200 ng/mL。

タマネギ中のアセフェート

イチゴ中のホスメット

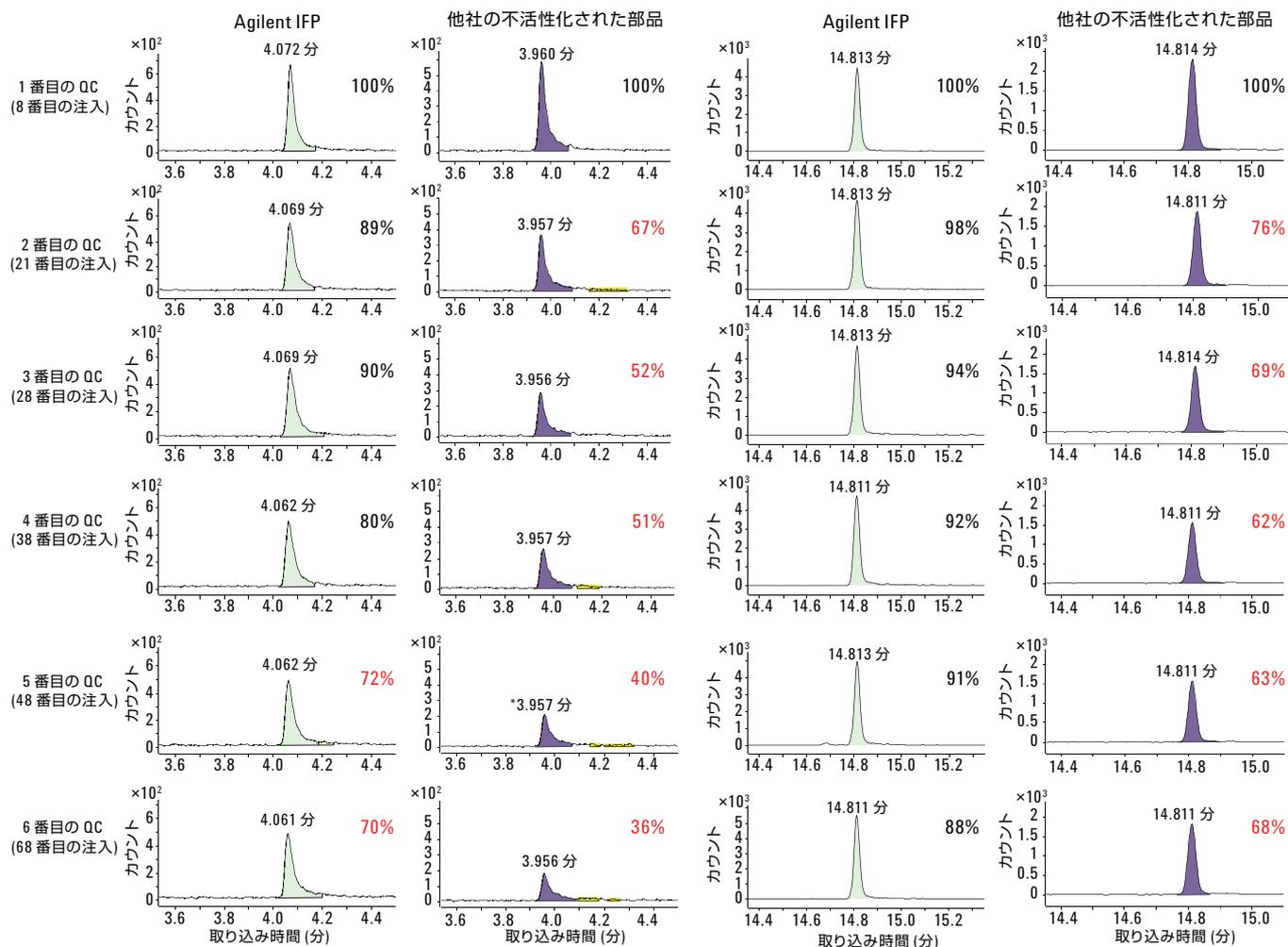


図 9. マトリックス中の不安定な農薬において、Agilent イナートフローバスおよび Agilent 以外の不活性化された部品のシステム耐久性を比較した例。  
マトリックスブランク中のマトリックススパイク QC 20 ng/mL

アナリティカルプロテクタント (AP)

AP は、各注入と同時に添加する化合物で、GC システムの活性部位と強く相互作用し、反応性の高い分析対象物の分解または吸着、あるいはその両方を低減します [11,13]。この手法では、マトリックスによる促進効果を利用して、GC システム内での測定対象化合物の損失を防止します。AP を使用すると、システム全体を通じて、注入毎にオンラインの不活性化を実現できます。この手法は、反応性の高い農薬のレスポンスやピーク形状、測定法全体の堅牢性を改善する方法として効果があることが示されており、GC/MS や GC/MS/MS による農薬分析に大いに推奨されています。

以前の研究では、不活性化されていない従来の GC 流路部品、あるいは部分的に不活性化された同部品のいずれかを使用していたため、今回、Agilent IFP と共に AP を用いた場合の影響を調査しました。AP の使用有無の比較は、Agilent IFP 用いて、イチゴ (弱いマトリックス) とホウレン草 (強いマトリックス) のサンプルで行いました。AP の使用方法 [11] に従って、グルノラクトンとソルビトールの混合溶液を調製しました。次いで、この AP 混合溶液をマトリックス対照ブランクまたは試薬ブランクにスパイクしました。サンドイッチ注入を利用すると、機器に注入しながら AP を自動的に添加することができます。これがサンドイッチ注入を利用するもう一つの利点です。サンプルの調製時に手作業で AP 溶液を各サンプルにスパイクするのではなく、オートサン

ブラがワークベンチの一部の役割を担い、サンプルの注入時に各サンプルに AP 溶液が添加されます。さらに、AP を添加しないシーケンスには同じサンプルを使用しました。クロマトグラムを比較して結果を評価し、さらに全体の定量結果を評価しました。

図 10 は、AP を添加した場合と添加していない場合に Agilent IFP を用いて得られたクロマトグラムを重ね合わせたものです。サンプルのクロマトグラムは、それぞれのシーケンスで 70 回注入した後集めたものです。文献 [11] に示されている代表的な 3 種

類の化合物を用いて AP により結果が改善することを実証しました。用いたリンデンは通常は影響を受けず、ホサロンはわずかに影響を受け、*o*-フェニルフェノールは非常に影響を受けやすい化合物です。これらの化合物は図 10 中に強調して示しています。定量結果の一覧を表 2 に示します。この表には検量線  $R^2$ 、マトリックススパイク QC の平均回収率、%RSD (3 レベル、レベル毎に  $n=6$ ) も記しています。

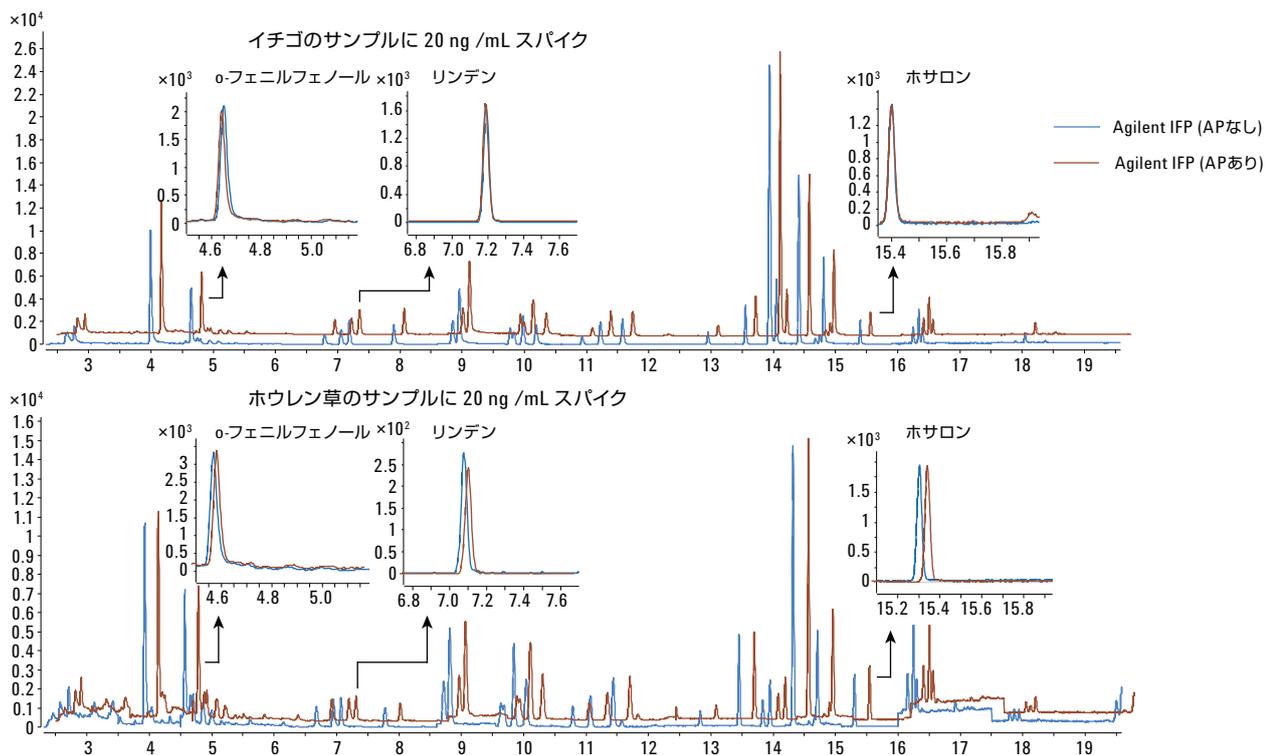


図 10. イチゴ (上段) およびホウレン草 (下段) 中のマトリックススパイク QC 20 ng/mL について Agilent イナートフローパスを用いて得られたクロマトグラムの比較。AP の添加あり (赤) と添加なし (青)。クロマトグラムは、各シーケンスにつきマトリックスサンプルを 70 回注入後に収集。参考文献 11 に基づいて選択した 3 種類の化合物の拡大ピークの重ね合わせ

表 2. イチゴおよびホウレン草のマトリックスにスパイクしたサンプルについて Agilent IFP を用いて、AP の添加あり/なしで比較した定量結果

農薬	イチゴ						ホウレン草					
	Agilent IFP			Agilent IFP (APあり)			Agilent IFP			Agilent IFP (APあり)		
	R <sup>2</sup>	平均 回収率 (%)	%RSD (n=18)	R <sup>2</sup>	平均 回収率 (%)	%RSD (n=18)	R <sup>2</sup>	平均 回収率 (%)	%RSD (n=18)	R <sup>2</sup>	平均 回収率 (%)	%RSD (n=18)
ジクロロボス	0.9993	95.6	5.4	0.9996	96.3	2.8	0.9963	90.6	3.4	0.9971	91.2	2.4
メタミドホス	0.9951	88.8	9.6	0.9992	94.2	3.9	0.9978	88.6	11.5	0.9969	86.1	9.4
アセフェート	0.9980	84.3	23.5	0.9997	94.9	8.8	0.9920	83.0	23.2	0.9976	84.7	22.6
メビンホス	0.9997	92.6	5.7	0.9988	95.7	2.5	0.9985	92.1	3.3	0.9996	93.0	2.5
オメトエート	0.9960	79.7	35.3	0.9974	96.1	13.0	0.9952	80.6	26.2	0.9925	79.9	28.1
o-フェニルフェノール	0.9986	94.0	3.6	0.9913	93.1	1.7	0.9994	91.6	1.4	0.9993	91.5	3.1
アトラジン	0.9996	93.7	5.5	0.9990	94.1	2.7	0.9993	91.5	1.9	0.9993	94.6	1.7
ジメトアート	0.9994	89.8	9.9	0.9991	96.2	2.1	0.9997	87.7	7.3	0.9985	87.6	10.1
リンデン	0.9999	93.0	5.7	0.9990	93.9	1.9	0.9996	88.1	9.7	0.9986	86.3	8.8
クロロタロニル	0.9991	93.5	8.9	0.9989	95.5	4.2	0.9990	88.5	13.6	0.9984	85.2	20.1
カルバリル	0.9988	92.2	13.4	0.9964	96.4	6.2	0.9947	91.4	16.2	0.9944	91.4	24.3
クロルピリフォスメチル	0.9995	93.2	3.7	0.9944	94.9	2.0	0.9992	92.3	1.9	0.9992	92.6	2.5
トルクロホスメチル	0.9996	92.9	4.2	0.9993	95.4	1.5	0.9992	92.3	1.4	0.9994	93.9	0.7
ピンクロゾリン	0.9999	93.7	3.6	0.9987	95.7	2.0	0.9991	91.6	1.7	0.9992	95.7	2.3
アルドリソ	0.9985	91.7	4.4	0.9988	93.5	2.6	0.9982	91.8	2.6	0.9974	96.0	2.3
ジクロフルアニド	0.9991	91.4	5.4	0.9987	92.3	2.6	0.9986	84.0	15.2	0.9985	80.9	16.5
ジクロロベンゾフェノン	0.9995	93.6	4.7	0.9976	95.5	2.0	0.9987	91.7	1.4	0.9997	93.7	1.2
マラチオン	0.9981	94.5	2.7	0.9988	95.6	1.3	0.9959	90.7	2.4	0.9995	92.0	3.4
ピリミホスエチル	0.9958	90.7	4.0	0.9985	94.7	1.6	0.9970	92.0	1.5	0.9973	93.4	3.5
プロシミドン	0.9988	91.4	2.9	0.9993	94.3	1.5	0.9988	92.0	1.1	0.9996	93.6	3.5
トリフルアニド	0.9992	91.5	5.2	0.9991	93.9	2.9	0.9990	82.8	14.3	0.9994	80.9	1.7
エンドリン	0.9969	90.0	4.0	0.9961	93.3	4.1	0.9991	85.1	8.0	0.9965	87.8	8.4
エチオン	0.9959	96.3	5.4	0.9967	95.1	1.6	0.9963	92.7	1.3	0.9991	92.4	1.0
DDT	0.9991	87.7	10.2	0.9954	92.3	13.9	0.9993	72.4	34.1	0.9983	72.5	33.1
硫酸エンドスルファン*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.9986	87.6	9.5	0.9989	87.7	10.2
エンドリンケトン	0.9971	92.4	2.1	0.9886	92.0	3.1	0.9938	77.3	21.6	0.9883	73.5	23.7
イブロジオン	0.9993	93.4	2.6	0.9975	94.3	2.8	0.9986	90.1	15.0	0.9981	89.4	17.0
ホスメット	0.9957	90.2	5.1	0.9956	92.5	3.8	0.9984	79.2	18.0	0.9977	80.2	23.2
ホサロン	0.9972	94.2	1.8	0.9969	93.7	1.9	0.9992	86.5	5.9	0.9972	87.3	9.7
クマホス	0.9905	90.5	3.4	0.9980	88.4	3.7	0.9984	83.4	6.5	0.9993	85.3	10.6
ベルメトリン	0.9995	90.2	3.1	0.9980	90.5	1.9	0.9981	89.5	1.5	0.9948	94.3	1.9
デルタメトリン	0.9974	94.3	4.7	0.9986	97.9	4.2	0.9957	88.9	7.3	0.9960	89.6	15.0

\* 硫酸エンドスルファンがイチゴのマトリックスブランク中に検出されましたが、定量はできませんでした。

この結果は、複数のマトリックス注入にわたって優れたピークレスポンス、ピーク形状、安定した分析物のレスポンスを示すもので、サンプルマトリックスに含まれる農薬の分析に Agilent IFP を使用することの有効性を実証しています。Agilent IFP のみを使用して得られた定量結果は、AP を添加して得られた結果と極めて類似しています。非常に影響を受けやすい化合物である *o*-フェニルフェノールに対しても、AP なしで IFP のみを使用した場合のピーク形状とレスポンスは、70 回注入した後も安定していました。同じような結果は、両方のサンプルマトリックスに含まれるリンデンやホサロンでも得られています。しかしながら、アセフェートやオメトエートなど非常に不安定な農薬では、依然としてシグナルの低下が観察されています。このように比較的極性が高く揮発性の対象物は、LC/MS で分析する必要があります。イチゴのマトリックスにおいて、AP を使用すると、この 2 種類の分析物のレスポンスは安定性が著しく改善しました。一方、ホウレン草のマトリックスでは、AP を使用しても必ずしも効果的な改善は見られず、両方のケースで許容範囲を外れた結果が得られました。ホウレン草は極めて複雑なマトリックスで、AP の使用にかかわらず他の農薬についてはさらに結果が劣化します。

不安定な分析対象物のシグナル低下は、おそらくマトリックスによるレスポンスの低減効果に関係しています。これは、不揮発性あるいは揮発性の低いマトリックス干渉物が GC システム内、特に注入ラインやシール、カラムヘッドに次第に蓄積するためです。このように蓄積した成分は新たな活性部位となり、徐々にシグナルを低減させる原因になります。ウール付きライナを使用し、バックフラッシュを行うと、マトリックス残留物の導入と蓄積は緩和されますが、完全には避けられません。したがって、完全に不活性な流路であっても新たに形成される活性部位が依然として問題を引き起こします。このような場合、注入毎に AP を用いて「オンライン」で不活性化することで、多量のマトリックスに含まれる極めて反応性の高い化合物の回収率を飛躍的に向上させることができます。しかし、AP はいかなる場合でも効果がある「魔法」の溶液ではありません。ホウレン草のマトリックスの場合、AP を使用しても不安定な分析対象物にはさほど効果がありませんでした。問題のある農薬では AP を添加しても、やはり許容範囲を外れた結果が得られました。GC/MS で測定が困難な化合物については LC/MS で測定する [11,13] か、あるいはさらにサンプルを調製する処理を加えてマトリックス効果を低減する方法が推奨されています。

## 結論

Agilent イナートフローパスを詳しく評価しました。分析対象は、QuEChERS 技術により抽出した 6 種類のサンプルマトリックスに含まれる残留農薬です。サンドイッチ注入法を採用して、注入時にマトリックスブランクを添加しました。これにより各種マトリックスサンプルのキャリブレーションに、試薬ブランクで調製した標準を用いることができました。この手法を、6 種類のマトリックスについて Agilent IFP を用いた GC/MS/MS で検証しました。その結果、優れた感度 (LOQ 2 ng/mL)、2~200 ng/mL の範囲にわたる検量線の優れた直線性 ( $R^2 > 0.99$ )、そして許容範囲に収まる定量精度および確度を得られました。これにより、Agilent IFP は GC の流路全体にわたり表面が非常に不活性で、表面の活性部位が分析対象物に与えるマイナスの影響を大幅に低減することが示されました。Agilent 以外の不活性化された部品と比べると、Agilent IFP は全般にレスポンスが良好で、不安定な農薬に対する直線性に優れ、果物や野菜のマトリックスに含まれる反応性の高い農薬に対して耐久性が持続しました。

## 謝辞

機器のトラブルシューティングをサポートしてくださった Adam Milecki 氏に感謝いたします。

## 参考文献

1. M. Anastassiades, S.J. Lehotay *J. AOAC Int.* 86, 412 (2003).
2. L. Zhao, D. Mao “Analysis of Pesticides in Food by GC/MS/MS using the Ultra Inert Liner with Wool” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-7706 EN (2011).
3. L. Zhao, C-K. Meng “Quantitative and Repeatability Analysis of Trace Level Pesticides in Plantation Food by GC/MS/MS” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-9317 EN (2011).
4. K. Lynam, D. Smith “Ultra Inert (UI) Wool Liner Performance Using and Agilent J&W DB-35ms UI Column with and without an Analyte Protectant for Organophosphate (OP) Pesticides” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-8235 EN (2012).
5. L. Zhao, C-K. Meng “Optimized Method Development of Large Volume Injection for GC/MS/MS of Food Pesticides” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-1196 EN (2012).
6. L. Zhao “Evaluating Inert Flow Path Components and Entire Flow Path for GC/MS/MS Pesticide Analysis” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-1860 EN (2013).
7. C-K Meng “The GC/MS/MS Analyzer and the Pesticides and Environmental Pollutants MRM Database” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5990-9453EN.
8. M. J. Szelewski, B. Quimby “New Tools for Rapid Pesticide Analysis in High Matrix Samples” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5989-1716EN.
9. C-K. Meng “Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5989-6018EN.
10. V. Giarocco, B. Quimby “Retention Time Locking : Concepts and Applications” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5966-2469EN.
11. K. Mastovska “GC/MS/MS Pesticide Residue Analysis” Reference guide, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2389EN (2013).
12. K. Lynam “Agilent Inert Flow Path Enhancements : Impact on Semivolatile Analysis” Application note, Agilent Technologies, Inc., Publication number 5991-2745EN (2013).
13. K. Mastovska, S. J. Lehotay, M. Anastassiades *Anal.Chem.* 77, 8129 (2005).

## 詳細

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントの Web サイト ([www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

September 19, 2013

5991-3234JAJP



**Agilent Technologies**