

サンプルマトリックスが GC/MS/MS 多成分残留農薬分析に与える影響

著者

Jessica Westland
Agilent Technologies, Inc.

概要

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最大残留基準値 (MRL) 範囲を得るには、妥当な直線範囲と低い検出下限 (LOD) 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) が適しています。低い定量下限 (LOQ) 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るからです。低濃度の検出が必要な場合は、GC/MS システムを清潔に保つことが重要です。システムメンテナンス (ライナやセプタム、カラムヘッドの切断、イオン源のクリーニングなど) が必要になる頻度は、注入サンプルの性質 (とその他の要因) に応じて変わります。サンプルを注入すると、GC/MS の流路全体 (注入口からカラムを経由して検出器に達する経路) がそのサンプルの影響を受けます。注入の繰り返しや複数のシーケンスによって、GC の注入口やカラムが劣化したり、MS が汚染されたりします。このアプリケーションノートでは、適切なサンプル前処理手順を行い、バックフラッシュを実行し、マトリックス最適化マルチプルリアクションモニタリング (MRM) を使用しても GC/MS/MS システムに導入されてしまうマトリックスの存在について検証します。

はじめに

GC/MS のメンテナンス¹⁻³

GC/MS メンテナンスは分析を成功させるために欠かせない要素です。GC 注入口のメンテナンスは、消耗品が摩耗したとき(セプタム、シリンジ、ナット、フェラル、Oリングなど)や、汚れたとき(ライナ、カラム、ガスライン、トラップなど)に実施します。サンプル導入の主要なコンポーネントの1つに注入口セプタムがあります。カラム経路のフローを確立するためには、すべてのカラムでキャリアガスヘッド圧が必要です。セプタムはリークのないシールを保持して、注入口から空気を排出します。セプタムは通常、推奨温度上限に従って使用できます。低温のセプタムは通常、高温のセプタムより柔らかく、密封性が高く、より多くの穴(注入)に対応できます。注入を繰り返すとセプタムが劣化し、注入口のヘッド圧とリークのないシールを保持することができなくなります。セプタムに明らかな劣化の兆候がある(大きな穴、注入口ライナの破断、クロマトグラフィー機能の低下、カラム圧力の低下など)場合は交換すべきです。アジレントのノンスティック高性能グリーンセプタム(p/n 5183-4759)は、さまざまなアプリケーションに使用できる優れたノンスティックセプタムです。

GCの場合、サンプルが最初に接触する機器の部品は注入口です。注入口の主な機能は、サンプルを分析用のGCカラムに送ることです。このため、ライナが汚染されやすくなります。ライナは使用することで非揮発性/揮発性物質、塩、過剰な試薬などを収集して汚染されます。アジレントの4mmのウルトラライナート、スプリットレス、シングルテーパーライナ、ガラスウール入り(p/n 5190-2293)を使用すれば、汚れたサンプルでの微量分析が可能です。(ライナの底部近くにある)ガラスウールには、高分子

量成分の揮発促進、サンプルのより均質な混合、カラムヘッドの保護という機能があります。ライナの明らかな汚染が確認できるときや、クロマトグラフィー機能が低下したときは、ライナを交換してください。

アプリケーションに適したキャピラリーカラムの選択は、ときに不確かで難しい作業です。考慮すべき主要なカラムパラメータは次の4つです。

- 固定相
- 直径
- 長さ
- フィルムの厚さ

最も重要なのは固定相の選択で、選択性、極性、フェニル含有量などの要素によって決まります。より低い検出下限を求める世界的な需要に対応するため、Agilent J&W HP-5ms ウルトラライナートカラム(p/n 19091S-431UI など)は、活性化化合物に対する不活性度の試験を受けています。そのためS/N比が向上し、感度と質量スペクトルの完全性が改善されています。カラムの寿命は通常、注入口セプタムやライナよりは長いものの、セプタムやライナの交換時にはカラムのメンテナンスも必要です。クロマトグラフィーで問題が発生したら(ピークテーリング、レスポンスやリテンションタイムの変化など)、カラムヘッドをトリミングしてください。通常は、カラム前部から0.5~1m切断すれば、クロマトグラフィー性能が最適な状態に戻ります。

Agilent 7010B トリプル四重極 GC/MS では、高効率なエレクトロスプレーイオン化(EI)源によって前モデルの20倍以上のイオン化効率を図れるため、分析効率が上がります。検出器の感度が上がれば注意事項も増えます。システムの運用中は、GC/MS イオン源のクリーニングが必要です。成分のレスポンス

が低下し、GC 注入口やカラムをメンテナンスしても改善されない場合(またはイオン源でキャリアントイオンのピーク形状が不良で調整が必要であったり、リペラーやエレクトロンマルチプライヤの電圧が上昇したりした場合)は、クリーニングが必要です。堅牢で信頼性の高い運用のためには、適切なクリーニング(酸化アルミナ粉末およびメタノールのスラリー)、組み立て、設置が重要です。目的は、GC システムの性能を標準溶液中のターゲット化合物のレスポンスを検討して確立された標準の状態に戻すことです。劣化の指標はレスポンスだけではありません。ピーク形状の劣化(クロマトグラフィーの基準)、活性の高いターゲット成分の選択的減少、MS 信号とクロマトグラフィーの基準の組み合わせも指標となります。

サンプル前処理⁶

クロマトグラフィーを成功させるには、サンプル前処理が重要です。サンプル前処理をすることで、カラム寿命を延ばし、サンプル分析を繰り返す必要性を減らし、分離、検出、定量に悪影響を及ぼす可能性のある干渉を最小限に抑えます。食品中の残留農薬分析に取り組む多くのラボは通常、QuEChERS(キャッチャーズ: Quick(高速)、Easy(簡単)、Cheap(低価格)、Effective(効果的)、Rugged(高い耐久性)、Safe(安全)の略)メソッド^{4,5}を使用します。この簡単なサンプル前処理法により、1回の抽出で数百種類の低濃度の農薬が分析できます。しかしラボでは、サンプル前処理の省略がより一般的になってきています。これはデータ品質の低下だけでなく、GC/MS システムのメンテナンス頻度の増加にもつながります。

マトリックスの違いを示すために、3種類のマトリックスを選択しました。有機蜂蜜、ジャスミン米、ルーズリーフ紅茶です。各マトリックスを所定の QuEChERS 手法 (図 1) で抽出しました。ここでは、マトリックスクリーンアップにさまざまな分散固相抽出 (dSPE) を使用しました。QuEChERS は迅速なクリーニングなしのサンプル前処理手順で良好な結果を得られますが、それでも手順が省略される場合があります。QuEChERS 手順の間に、次の段階で抽出しました。

- 10 mL のアセトニトリル (ACN) 抽出の後 (データファイルのルーズリーフ)
- 最初の遠心分離手順の後 (データファイル中の塩)
- 最後の dSPE の後 (データファイル中の dSPE)

マトリックス最適化 MRM⁶

マトリックス効果は、農業分析時の MRM 取り込みメソッドにおける一般的な課題です。特定の化合物の MRM を使用できるかどうかは、測定されるマトリックスによって変わる場合があります。複数の MRM の中から選択して、ラボの生産性の向上、定量化メソッド生成の改良、分析の最適化に役立てることができます。Agilent G9250AA Rev. A.04.02 農業および環境汚染物質 (P&EP) 標準 MRM データベースは、利用できる最も包括的な GC MRM データベースです。このデータベースには、1,100 種類を超える化合物と最大 10 種類の MRM/化合物が含まれており、これを各ターゲット化合物のマトリックス最適化 MRM の取得に使用しました。

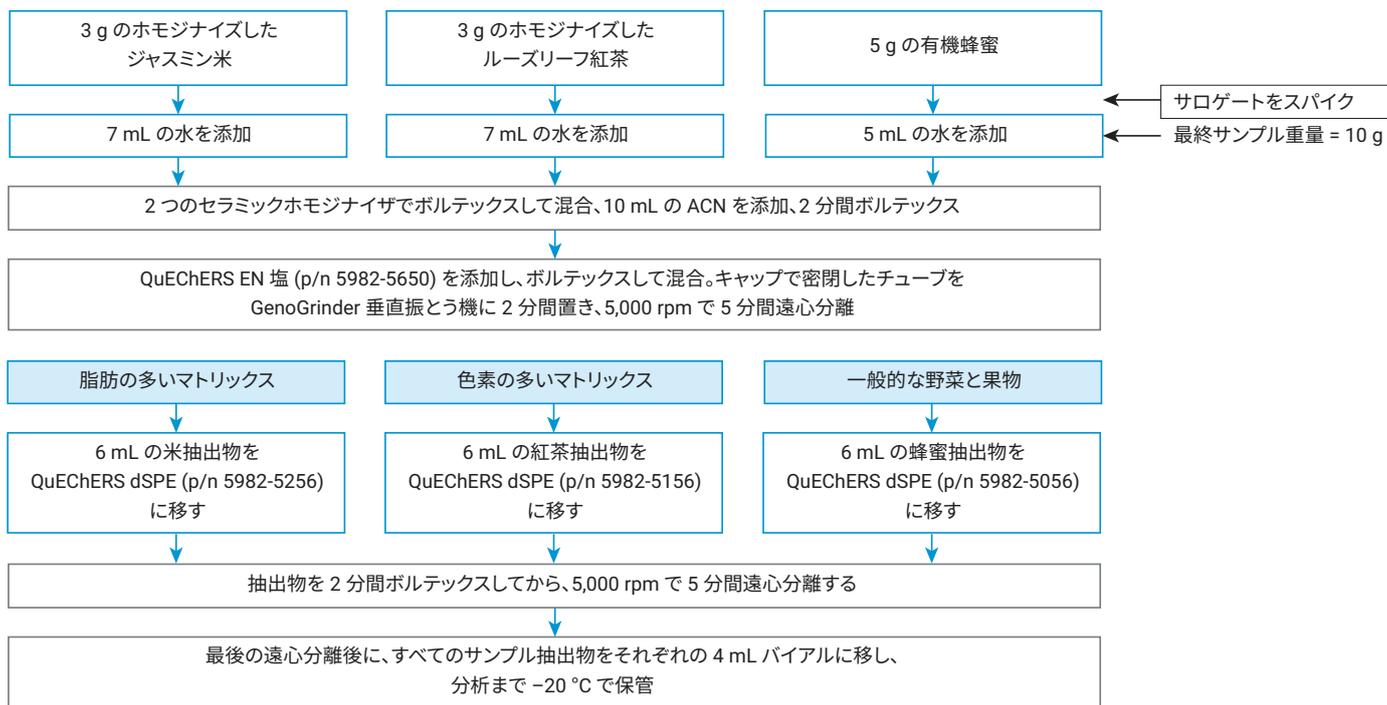


図 1. アプリケーションの QuEChERS 手法

実験方法

装置構成

すべての分析に、Agilent 7890B GC に Agilent 7693B オートサンプラおよび Agilent 7010A トリプル四重極 GC/MS を接続したシステムを使用しました。表 1 は GC とバックフラッシュのパラメータ、表 2 と 3 はスキャンおよび dMRM メソッドのパラメータをそれぞれ示しています。GC は、4 mm のウルトライナートスプリットレスシングルテーパガラスウール入りライナ (p/n 5190-2293) とマルチモード注入口 (MMI) で構成しました。注入口から、2 本の Agilent J&W HP-5ms ウルトライナートカラム (15 m × 0.25 mm、0.25 μm、p/n 19091S-431 UI) を互いにパーズ付き Ultimate ユニオン (PUU) を用いて接続して、ミッドカラム/ポストランバックフラッシュ (図 2) に対応できるようにしました。

表 1. 7890B GC メソッド条件

パラメータ	設定値
MMI 注入モード	ホットスプリットレス
注入量	1 μL
注入口温度	280 °C
キャリアガス流量	He、一定流量 1.00 mL/min (カラム 2 = 1.20 mL/min)
MS トランスファライン温度	280 °C
オープンプログラム (20 分メソッド)	60 °C (1 分間)、40 °C/min で 170 °C まで昇温 (0 分間)、10 °C/min で 310 °C まで昇温 (3 分間)
PUU バックフラッシュ設定 *	
タイミング	ポストラン中の 1.5 分間
オープン温度	310 °C
AUX EPC 圧力	~ 50 psi
注入口圧力	~ 2 psi

* バックフラッシュ条件はアジレントのラボでのアプリケーションメソッドに合わせて最適化しています。他のメソッドでは、1.5 分のバックフラッシュが短すぎる場合があります。推奨時間は 5 分間です。

表 2. 7010A スキャンパラメータ

パラメータ	設定値
スキャンタイプ	MS1 スキャン
イオン化エネルギー	70 eV
チューニング	atunes.eihs.tune.xml
EM ゲイン	10*
MS1 開始質量 - 終了質量	40 ~ 600
コリジョンセル	1.5 mL/min N ₂ および 2.25 mL/min He
イオン源温度	280 °C
四重極温度	150 °C
スキャン時間	200 ms
ステップサイズ	0.1 amu
スレッシュホールド	100

* 7010A でゲイン 10 は高い数値です。7010 のゲイン推奨値は 0.2~1 です。

表 3. 7010A dMRM パラメータ

パラメータ	設定値
スキャンタイプ	dMRM
イオン化エネルギー	70 eV
チューニング	atunes.eihs.tune.xml
EM ゲイン	10*
MS1 および MS2 分離能	ユニット
コリジョンセルガスフロー	1.5 mL/min N ₂ および 2.25 mL/min He
イオン源温度	280 °C
四重極温度	150 °C
定量/定性トランジション	マトリックス最適化
右側と左側の RT デルタ	0.1 分
ドウェルタイム	dMRM で最適化
最小ドウェルタイム (ms)	10
サイクル/秒	3.07

* 7010A でゲイン 10 は高い数値です。7010 のゲイン推奨値は 0.2~1 です。

バックフラッシュ

分析性能を維持し、システムメンテナンスの頻度を減らすには、さまざまな方法を利用できます。カラムバックフラッシュは、GC/MS メンテナンスプロセスでの重要な拡張機能の 1 つです。これにより、イオン源および GC の耐久性が向上し、GC/MS カラムおよび注入口のメンテナンスを迅速かつ大気開放することなく実施できます (図 3)。最後の分析対象化合物が溶出した後、バックフラッシュによって GC システムのカラム内で逆流を発生させ、高沸点化合物を除去します。バックフラッシュによってカラム寿命が延び、GC のメンテナンス時間と MS のメンテナンス回数を減らすことができます。このアプリケーションでは、ミッドカラムバックフラッシュを実行しました。

結果と考察

適切なサンプル前処理手順を使用し、バックフラッシュを実行して、マトリクス最適化 MRM を使用することで、GC/MS 条件を最適化できます。しかしラボでは、サンプル前処理の省略がより一般的になってきています。これはデータ品質の低下だけでなく、GC/MS システムのメンテナンス頻度の増加にもつながります。図 4～11 は、3 種類のマトリクス (有機蜂蜜、ジャスミン米、ルーズリーフ紅茶) で実施した各サンプル前処理手順を示しています (「実験方法」セクションを参照)。また、MRM 取り込みとそのスキャンクロマトグラムを比較した図も含まれています。

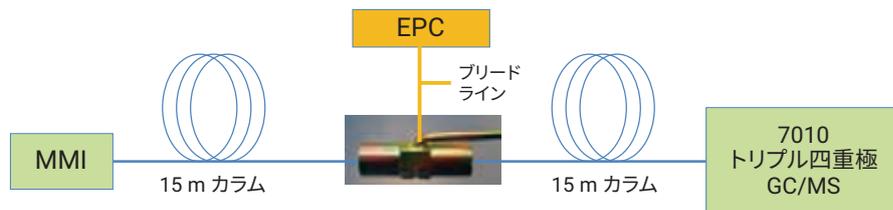
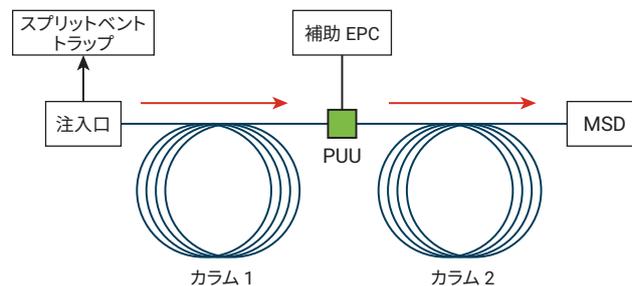


図 2. 最適な MRM アプリケーションのカラム構成

GC 分析



バックフラッシュサイクル

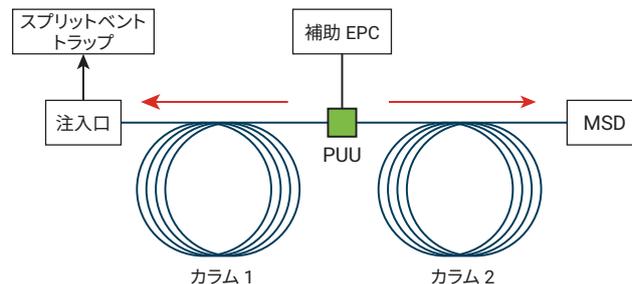


図 3. 分析およびバックフラッシュサイクルの間のミッドカラムバックフラッシュフローの図

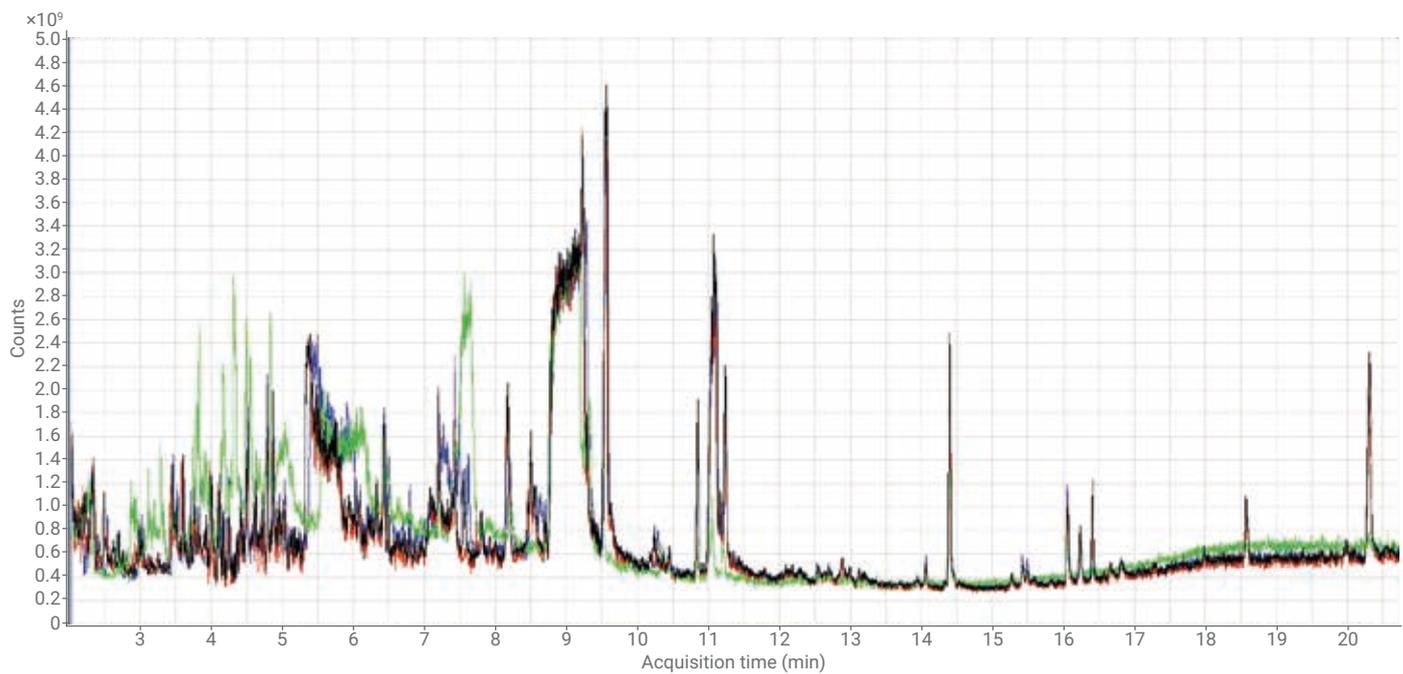


図 4. さまざまなマトリックス抽出手順でのルーズリーフ紅茶サンプルのスキャン: dSPE 紅茶blank_スキャン (黒)、dSPE 紅茶スパイク_スキャン (赤)、ルーズリーフ 紅茶blank_スキャン (緑)、塩 紅茶blank_スキャン (青)

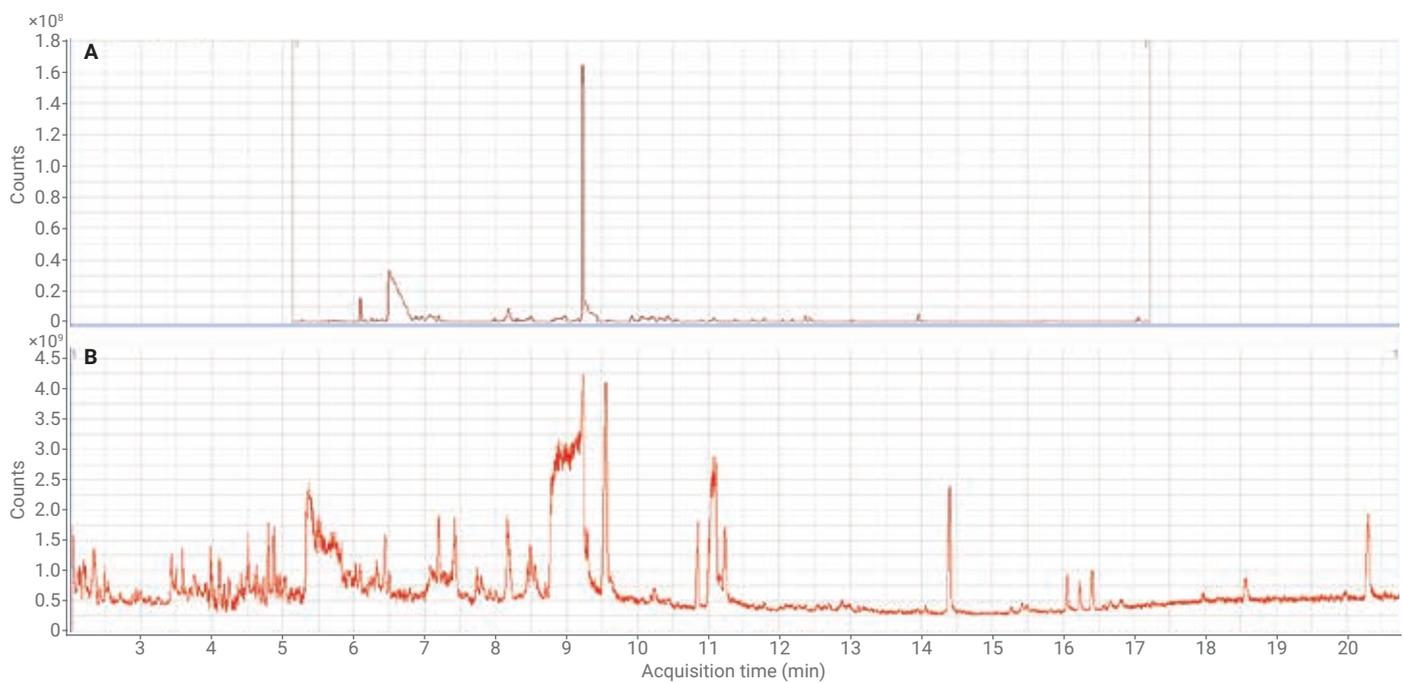


図 5. 最終的な dSPE 紅茶抽出物 (A) の MRM 取り込みとそのスキャン取り込み (B)



図 6. 紅茶分析後のライナ

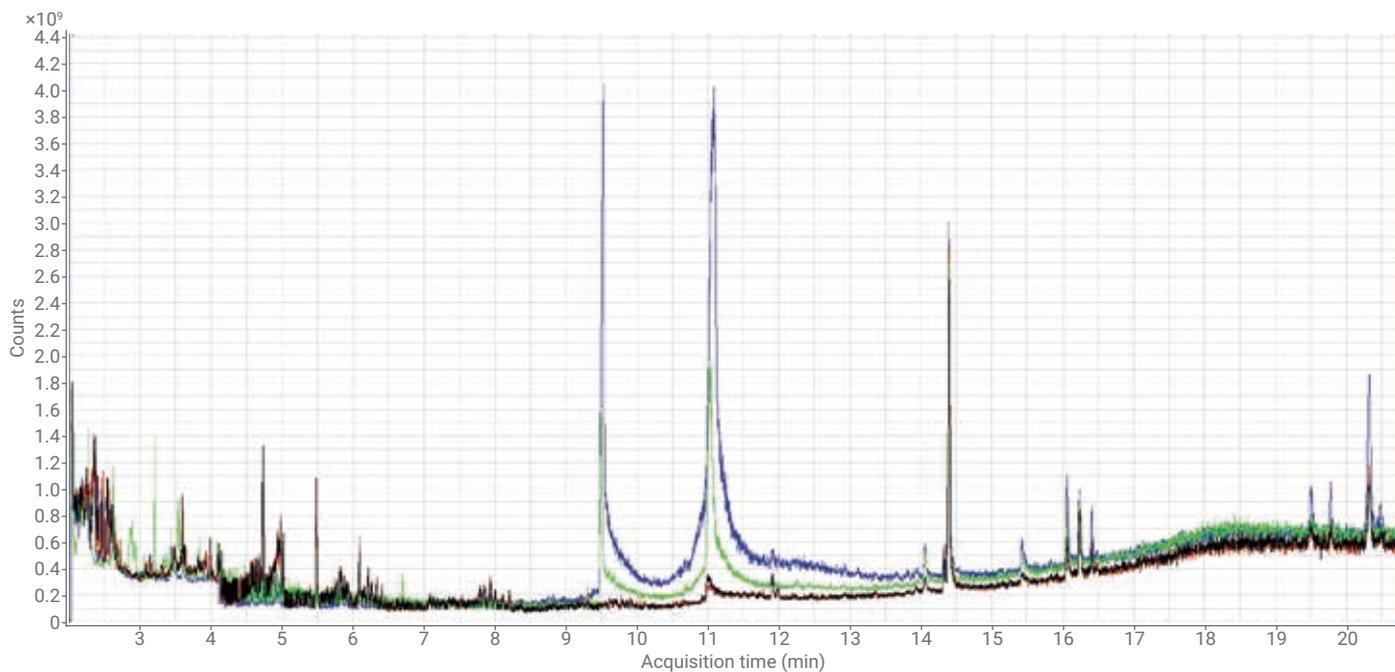


図 7. さまざまなマトリックス抽出手順でのジャスミン米サンプルのスキャン: dSPE 米ブランクスキャン (黒)、dSPE 米スパイクスキャン (赤)、ルースリーフ 米ブランクスキャン (緑)、塩 米ブランクスキャン (青)

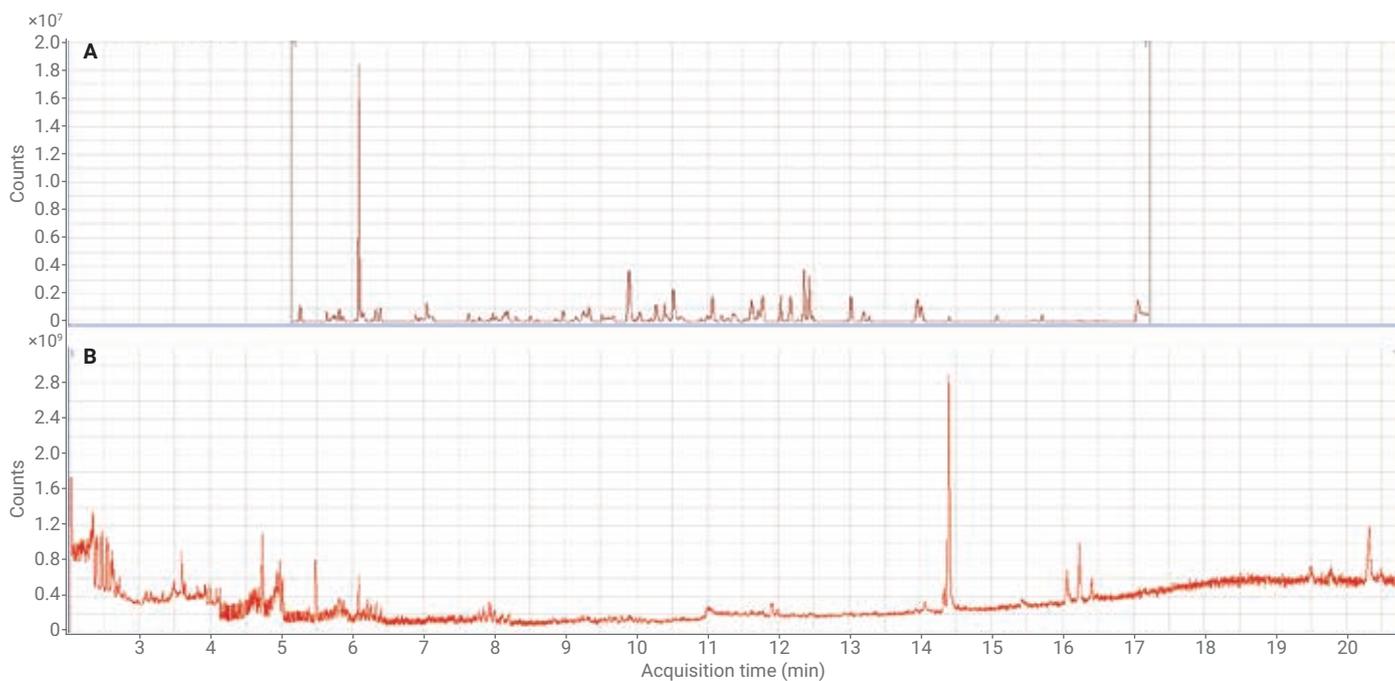


図 8. 最終的な dSPE 米抽出物 (A) の MRM 取り込みとそのスキャン取り込み (B)

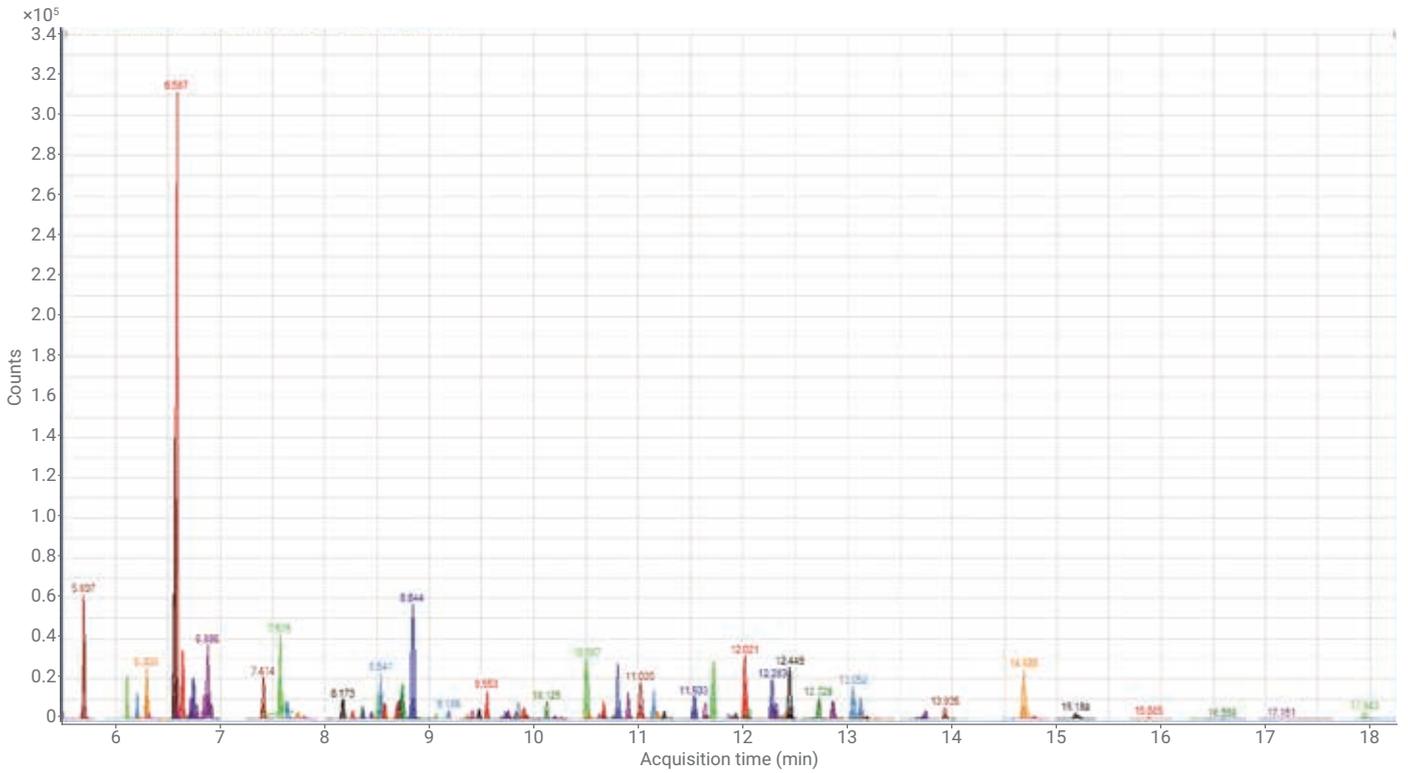


図 9. 最終的な dSPE 米抽出物の抽出された MRM クロマトグラム

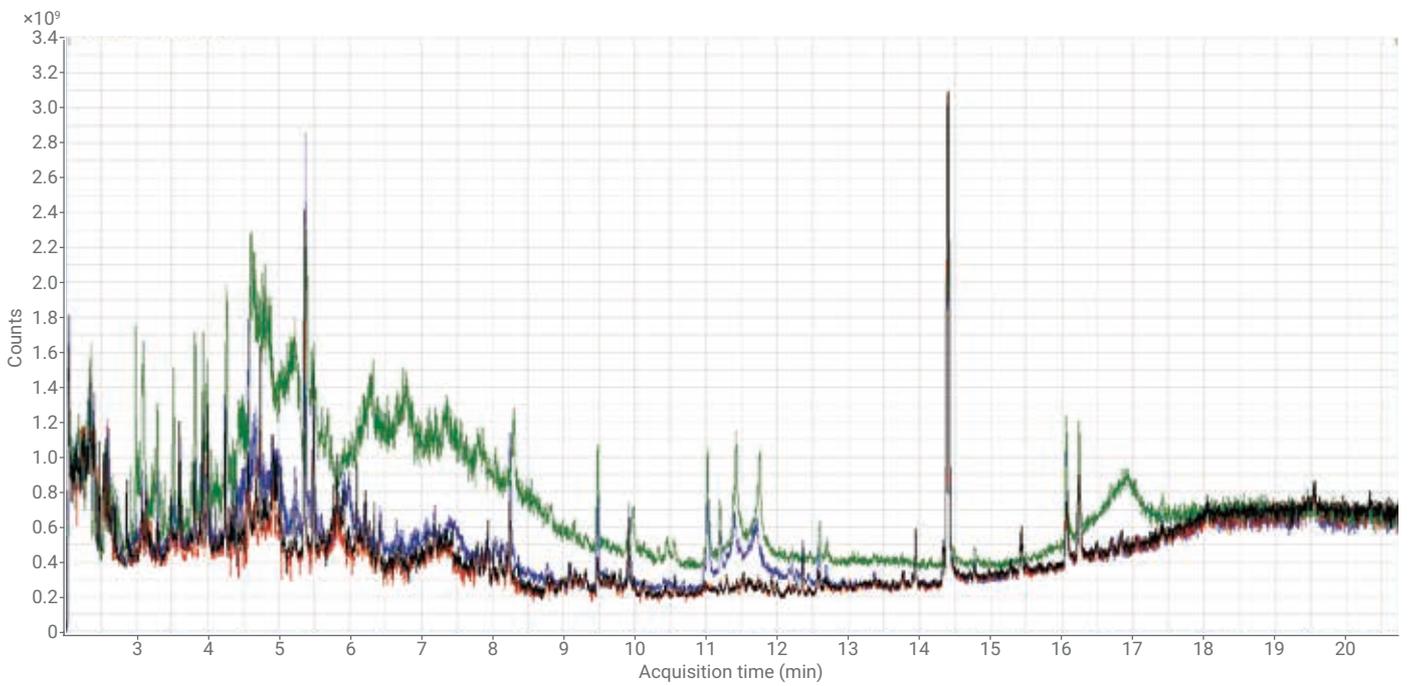


図 10. さまざまなマトリックス抽出手順での有機蜂蜜サンプルのスキャン: dSPE 蜂蜜ブランク_スキャン (黒)、dSPE 蜂蜜スパイク_スキャン (赤)、リーズリーフ 蜂蜜ブランク_スキャン (緑)、塩 蜂蜜ブランク_スキャン (青)

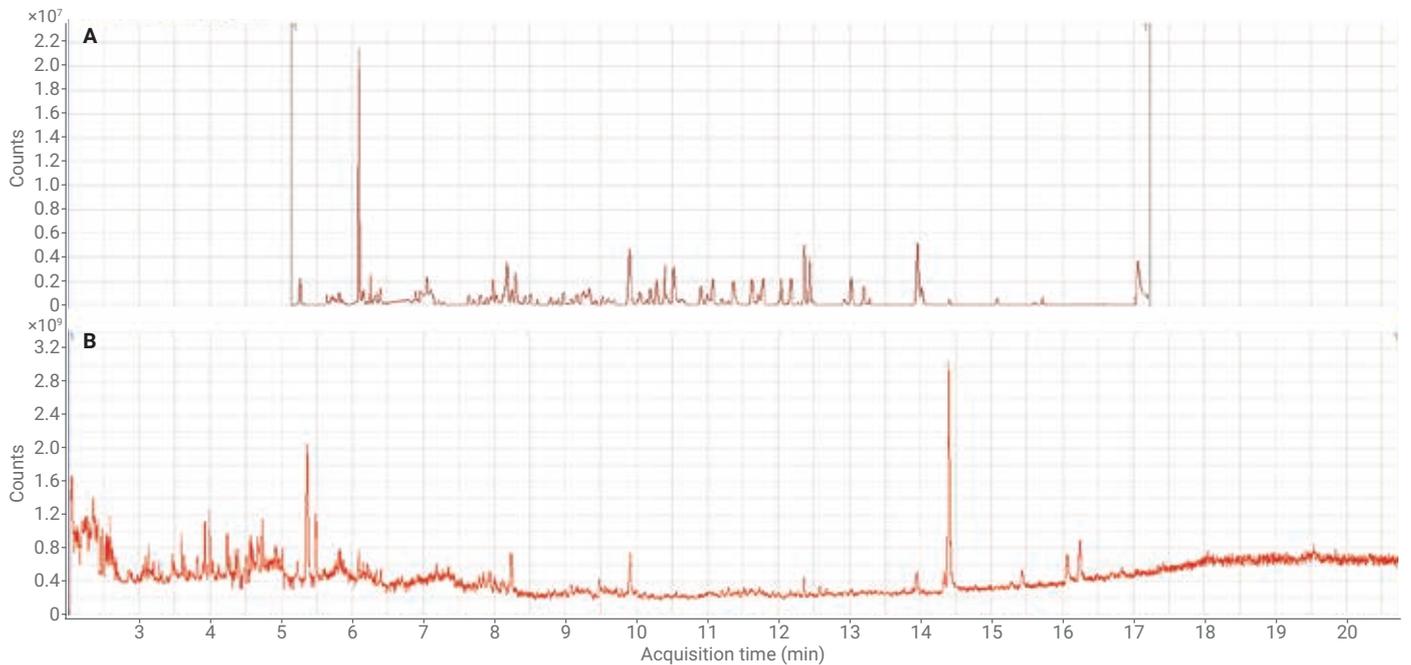


図 11. 最終的な dSPE 蜂蜜抽出物 (A) の MRM 取り込みとそのスキャン取り込み (B)

表 4. 有機蜂蜜分析のデータ結果

化合物	有機蜂蜜のデータ			
	% RSD	MDL (pg/ μ L)	iLOQ (pg/ μ L)	誤差 %
2,4-D ブチルエステル	8.09	0.26	0.94	7.08
アミノカルブ	8.4	0.285	1.032	2.09
アジンホスエチル	13.77	0.436	1.579	8.53
ベンチアバリカルブイソプロピル	14.22	0.437	1.583	10.49
α -BHC	7.83	0.261	0.943	4.01
β -BHC	17.19	0.541	1.959	9.1
クロルデン- <i>cis</i>	13.08	0.411	1.486	9.42
クロルピリホスメチル	7.76	0.252	0.91	6.42
ダゾメット	4.38	0.152	0.552	0.45
DDT- <i>o,p'</i>	8.78	0.27	0.977	11.35
ダイアジノン	7.33	0.238	0.862	6.15
ジフェノコナゾール II	19.99	0.663	2.399	4.12
エトフェンプロックス	16.5	0.539	1.951	6.88
エトプロホス	8.72	0.293	1.061	3.11
フルレノールブチル	6.85	0.219	0.793	6.32
ハロキシホップ- α -メチル	6.74	0.217	0.786	7.2
ヘプタクロル- <i>endo</i> - エポキシド	7.75	0.493	1.783	8.13
ヘキサジノン	4.91	0.157	0.569	7.85
イプロベンホス	4.69	0.157	0.569	2.94
ベルメトリン、(1R)- <i>trans</i> -	10.25	0.335	1.211	5.57
フェナントレン-D10	6.59	0.217	0.786	4.92
ホレート	29.01	1.023	3.699	2.01
テルブホススルホン	3.46	0.112	0.404	6.54
トリアジメホン	4.26	0.137	0.497	6.97

結論

MS/MS による多成分残留農薬の分析は、低濃度の農薬のスクリーニング、確認、定量に使用されます。この方法は定量下限が低く、干渉を最小限に抑えることができます。低濃度の検出が必要な場合は、GC/MS システムを清潔に保つことが重要です。注入の繰り返しや複数のシーケンスによって、GC の注入口やカラムが劣化したり、MS が汚染されたりします。このアプリケーションノートでは、適切なサンプル前処理手順を使用し、バックフラッシュを実行して、マトリックス最適化 MRM を使用しても GC/MS/MS システムに導入されてしまうマトリックスの存在について検証しました。

7010 シリーズトリプル四重極 GC/MS システムでは、非常に複雑な抽出物であっても、低 ppb レベルの農薬残留物を確認できます。標準溶液は 0.12 pg/μL ~ 50 pg/μL の濃度で前処理しました。化合物のうち 90 % で、 R^2 が 0.990 以上の検量線が生成されました。すべての分析対象農薬で、繰り返し測定の %RSD が 30 % 以下でした。また、これらの農薬の 90 % で LOQ が 1.5 pg/μL 以下でした。

参考文献

1. Maintaining Your GC/MS System - Operate your Agilent GC/MS System with maximum efficiency, *Agilent Technologies*, publication number 5988-3960EN, **2001**.
2. GC System Recommended Maintenance Schedule, *Agilent Technologies*, publication number 5988-6630EN, **2002**.
3. Prest, H. Agilent JetClean: GC/MS イオン源の In-situ クリーニングとコンディショニング、アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、5991-7254JAJP, **2016**.
4. Westland, J. An Optimal Method for the Analysis of Pesticides in a Variety of Matrices, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7303EN, **2016**.
5. Anastassiades, M.; et al. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 412-431.
6. Lehotay, S. J.; Mastovská, K.; Lightfield, A. R. *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 615-629.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2018

Printed in Japan, June 1, 2018

5991-9237JAJP