



マトリックス効果による異常回収率の対策について
～ PEG共注入による対策 ～

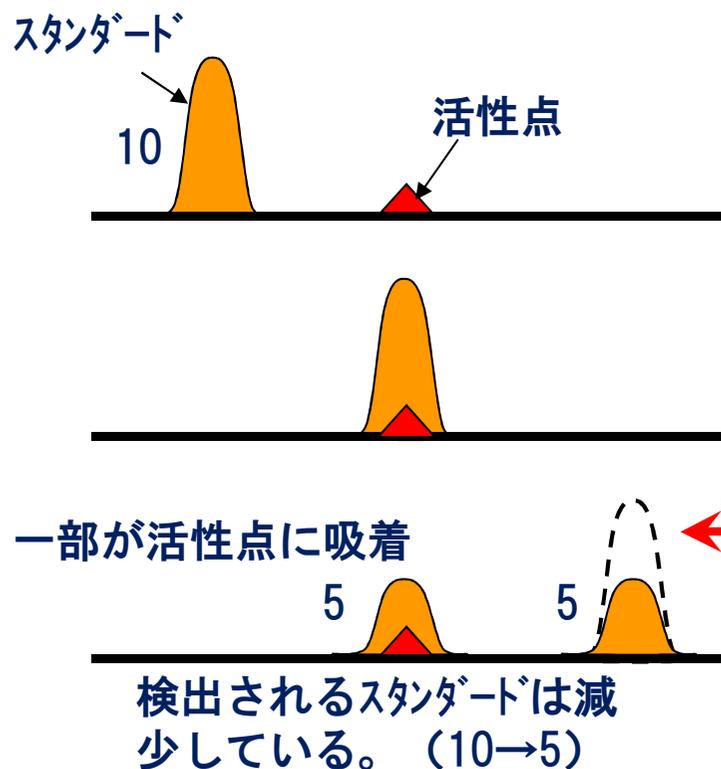
株式会社アイスティサイエンス

AiSTI SCIENCE

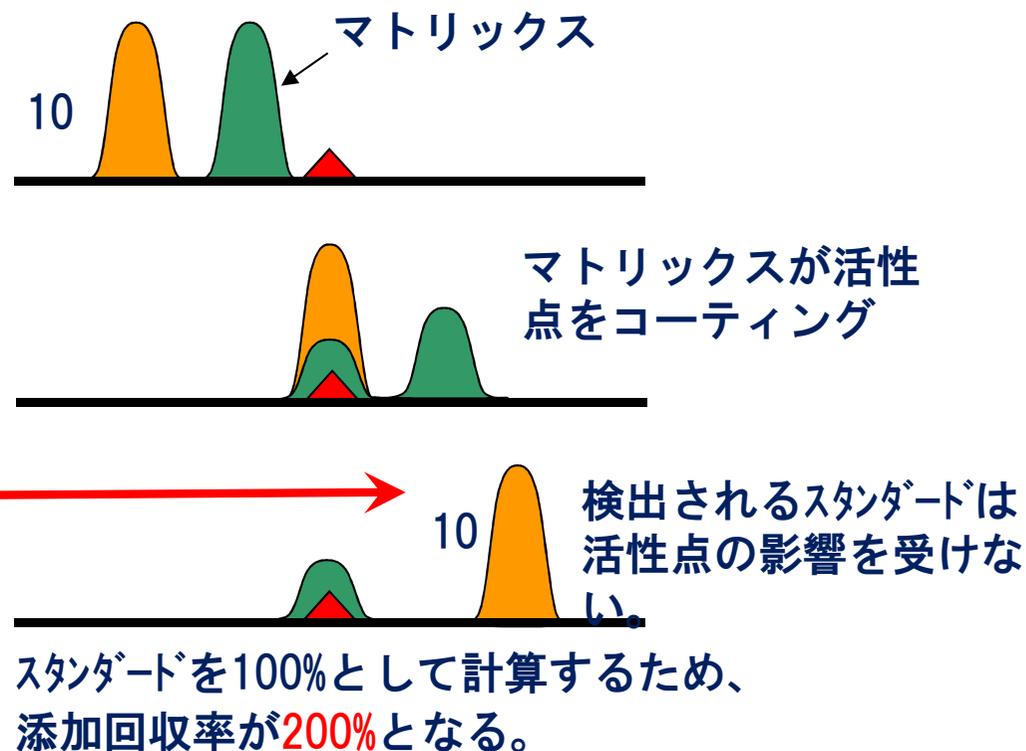
異常回収率の原因は？

原因として注入口やカラムやイオン化室（MSの場合）などの活性点が異常回収率（100%以上）を引き起こしていると考えられる。

標準試料（スタンダード）

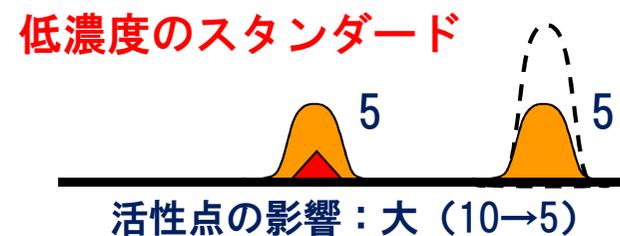
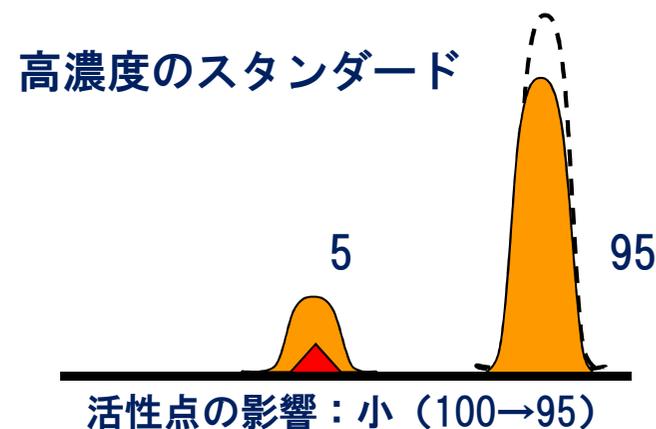
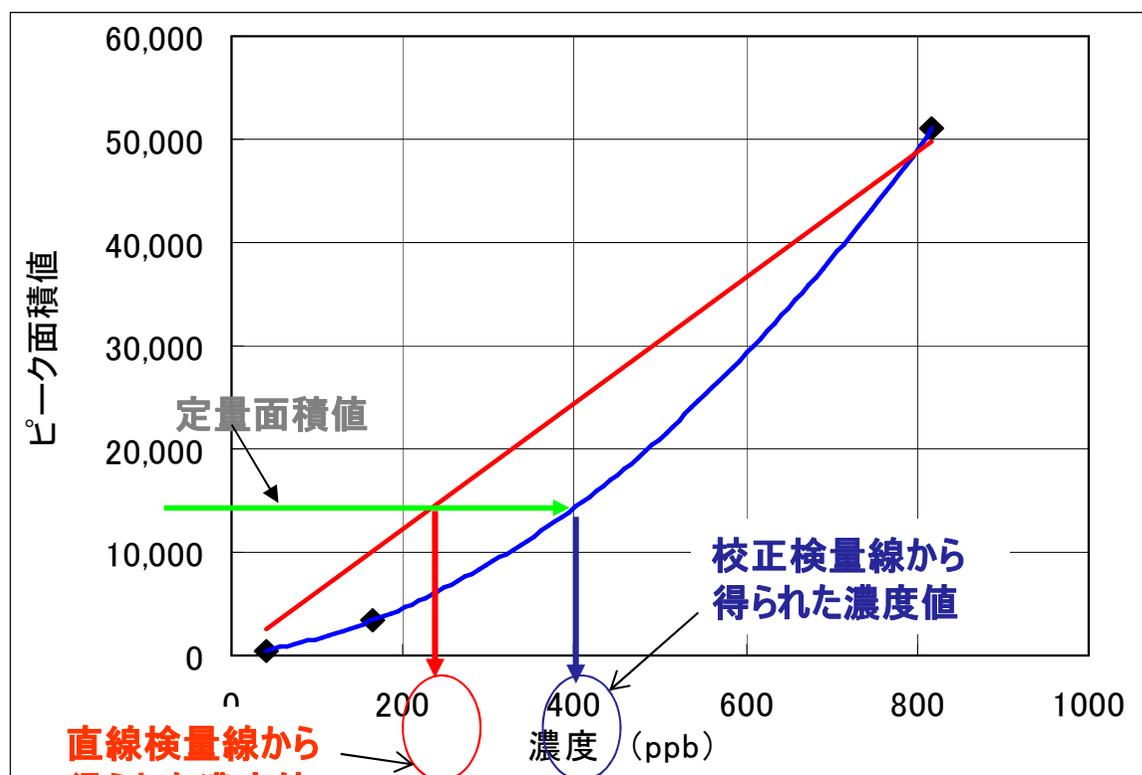


マトリックスを含んだ標準試料（e.g. 添加回収試験）



検量線の問題について

- 低濃度の検量線を作成した時に、2次曲線に沿うような検量線になるような経験はないでしょうか？



低濃度程、活性点の影響を受けやすくなる。

これを無理やり直線で検量線を作成した場合、添加回収率試験や定量において大きな問題を引き起こす事があります。

異常回収率が引き起こす検量線の問題点

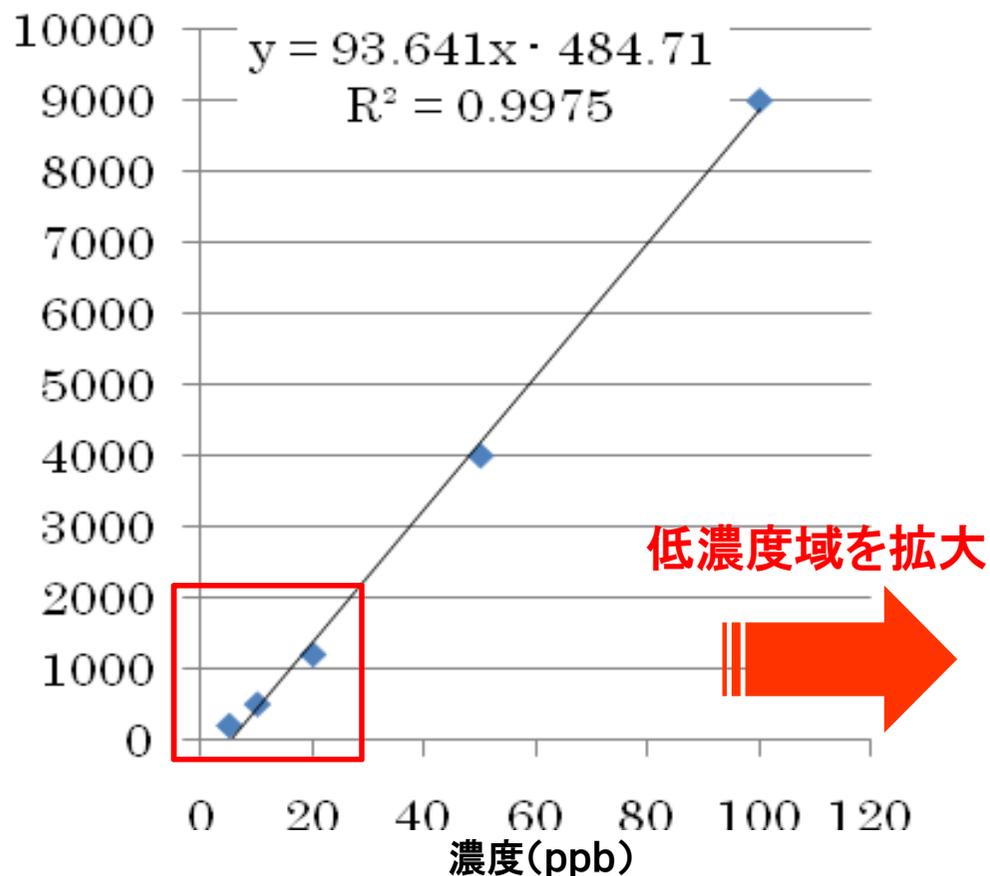


図1. 検量線

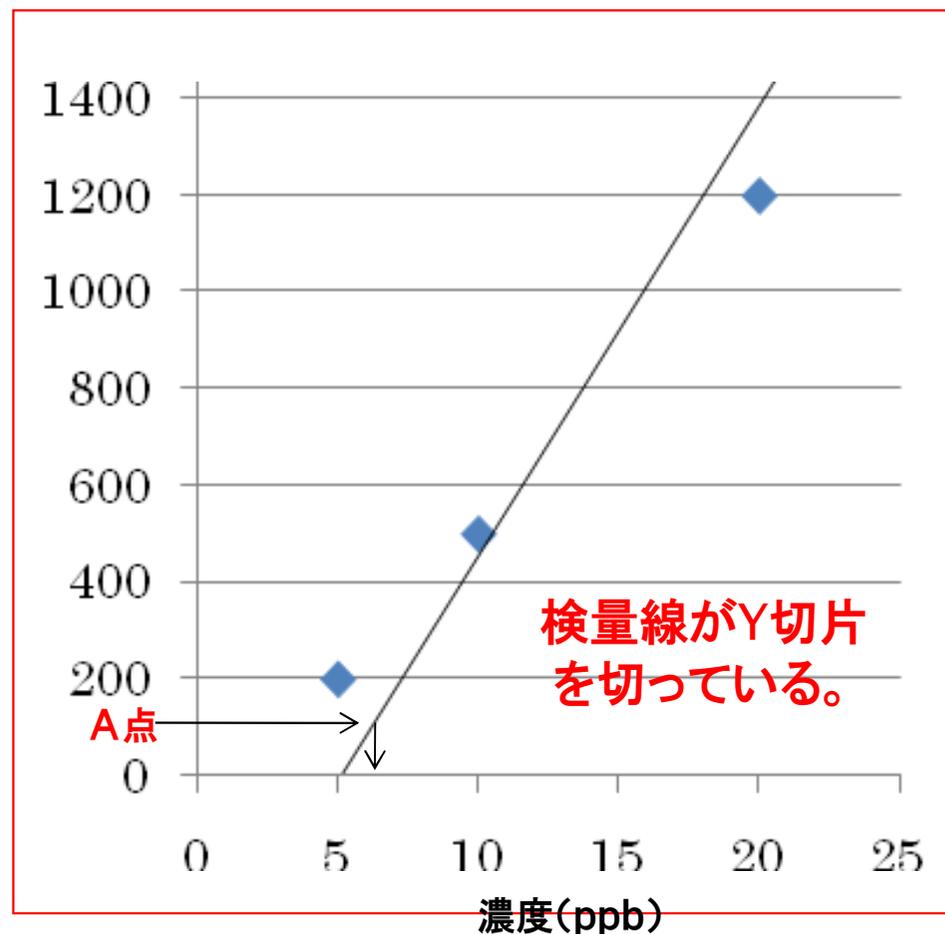
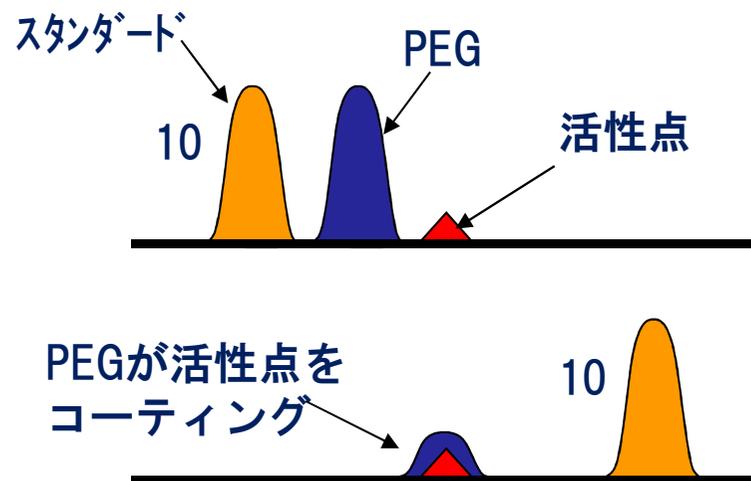


図2. 検量線拡大図

対策：PEG共注入法

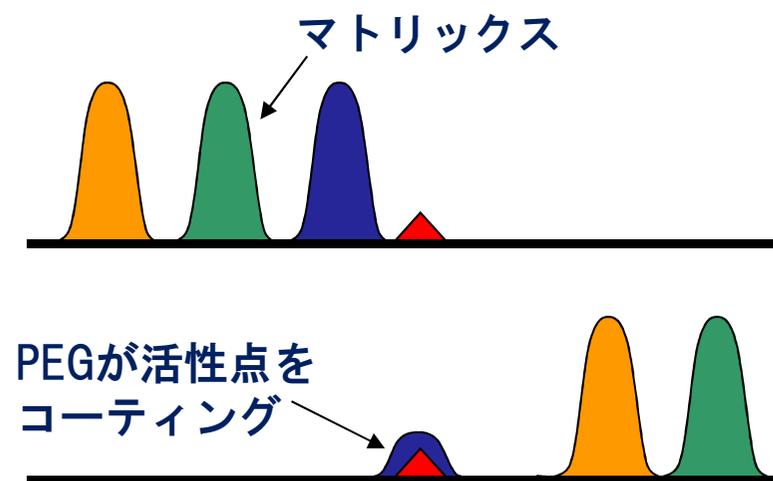
標準液（スタンダード）にマトリックスのかわりに**PEG（ポリエチレングリコール）**を添加し、そのPEGで活性点をコーティングすることで、スタンダードの吸着を防ぐ。

標準試料（スタンダード）



PEGが活性点をコーティングするため、スタンダードは活性点の影響を受けにくい。

マトリックスを含んだ標準試料

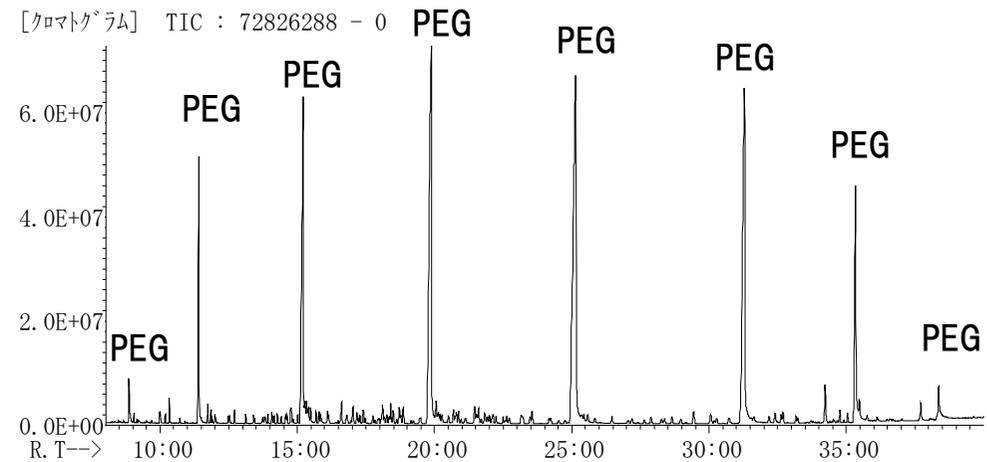


PEGが活性点をコーティングするため、マトリックスの吸着による活性点の増大を防げる。

PEG共注入による効果

【PEG共注入による効果】

- マトリックスによる異常回収率の低減
- 感度向上
- ピーク形状の改善
- カラム劣化の防止
- 検量線の直線性の向上



☆ PEG300を使用

- ・ ほとんどの農薬のリテンションタイムをカバーしている。
- ・ **フラグメントイオンは主に100以下**しか持たないため、農薬のマスペクトルと重なりにくい。

☆ 標準液（スタンダード）だけでなく**最終試験溶液**にもPEG共注入

- ・ マトリックスによる活性点の増大をPEGのコーティングにより防ぐことができる。

➤ PEG共注入検量線法

- ✓ 標準液（スタンダード）にマトリックスのかわりにPEG（ポリエチレングリコール）を添加して検量線を作成する手法。マトリックス検量線の欠点である残留農薬の影響を受けない。

PEG共注入の使用法

☆PEG300の作成方法

PEG300を1 g 秤とり、アセトンで100mLにメスアップし、1% (w/v)PEGアセトン溶液を作成し、その溶液を適量添加する。

※使用上の注意点

- GC**絶対量**で約**500ng**となるようにPEG300をGCへ注入する。少ないと効果が無く、多すぎると吸着を引き起こし悪影響を及ぼす。
 GCへ1 μ L注入の場合：500ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
 GCへ2 μ L注入の場合：250ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
 GCへ25 μ L注入の場合：20ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
- 必ず**PEG300**を使用する。**PEG400以上**は高沸点のPEGが分離カラムに残る可能性があり、分離カラムの極性を変えてしまう。
- GCの**最終最高温度**を**310°C**まで上げる。高沸点のPEGを分離カラムに残さない。
- 高温に対して耐久性のある分離カラムの選択。（例：最高使用温度370°C）
- GCのインターフェース温度を**290°C**に設定する。

PEG共注入の使用手法

☆PEG300の作成方法

PEG300を1g秤とり、アセトンで100mLにメスアップし、1% (w/v)PEGアセトン溶液を作成する。

500ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$) の場合：1% (w/v)PEGアセトン溶液50 μL を1mLで定容

250ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$) の場合：1% (w/v)PEGアセトン溶液25 μL を1mLで定容

20ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$) の場合：1% (w/v)PEGアセトン溶液2 μL を1mLで定容

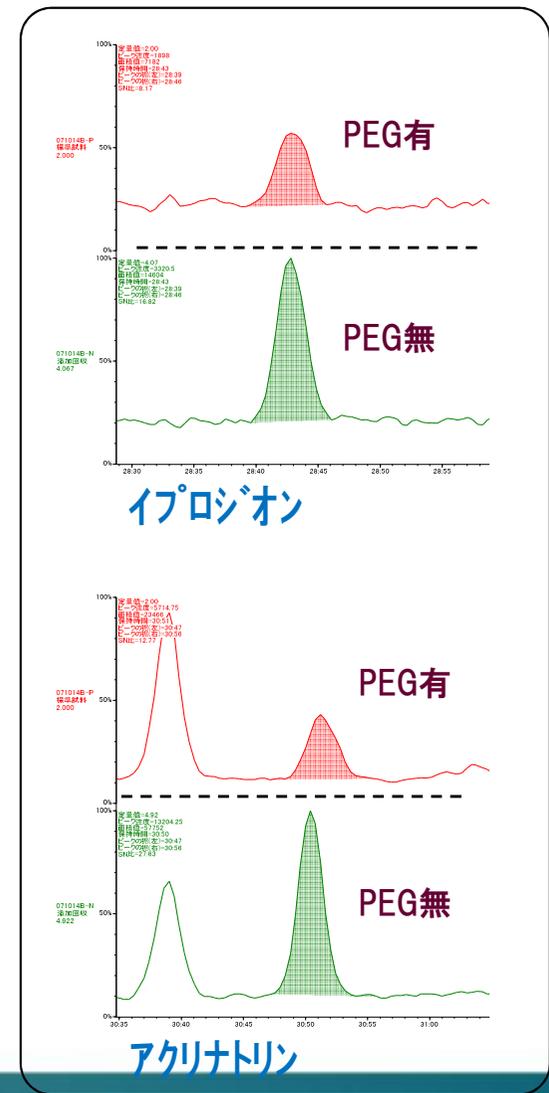
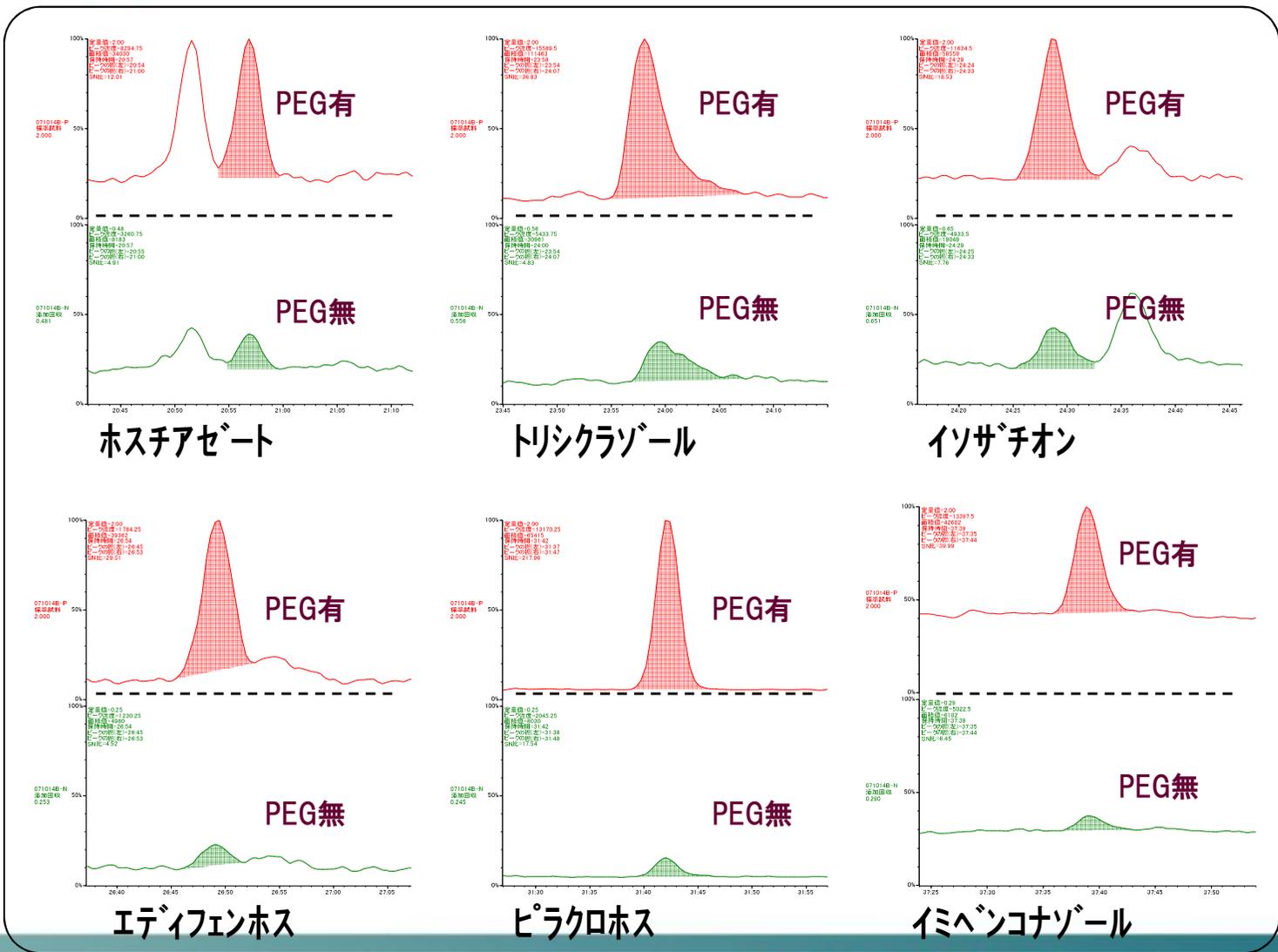
※使用上の注意点

- GC絶対量で約500ngとなるようにPEG300をGCへ注入する。少ないと効果が無く、多すぎると吸着を引き起こし悪影響を及ぼす。
 GCへ1 μL 注入の場合：500ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
 GCへ2 μL 注入の場合：250ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
 GCへ25 μL 注入の場合：20ppm($\text{ng}/\mu\text{L}$)
- 必ずPEG300を使用する。PEG400以上は高沸点のPEGが分離カラムに残る可能性があり、分離カラムの極性を変えてしまう。
- GCの最終最高温度を310 $^{\circ}\text{C}$ まで上げる。高沸点のPEGを分離カラムに残さない。

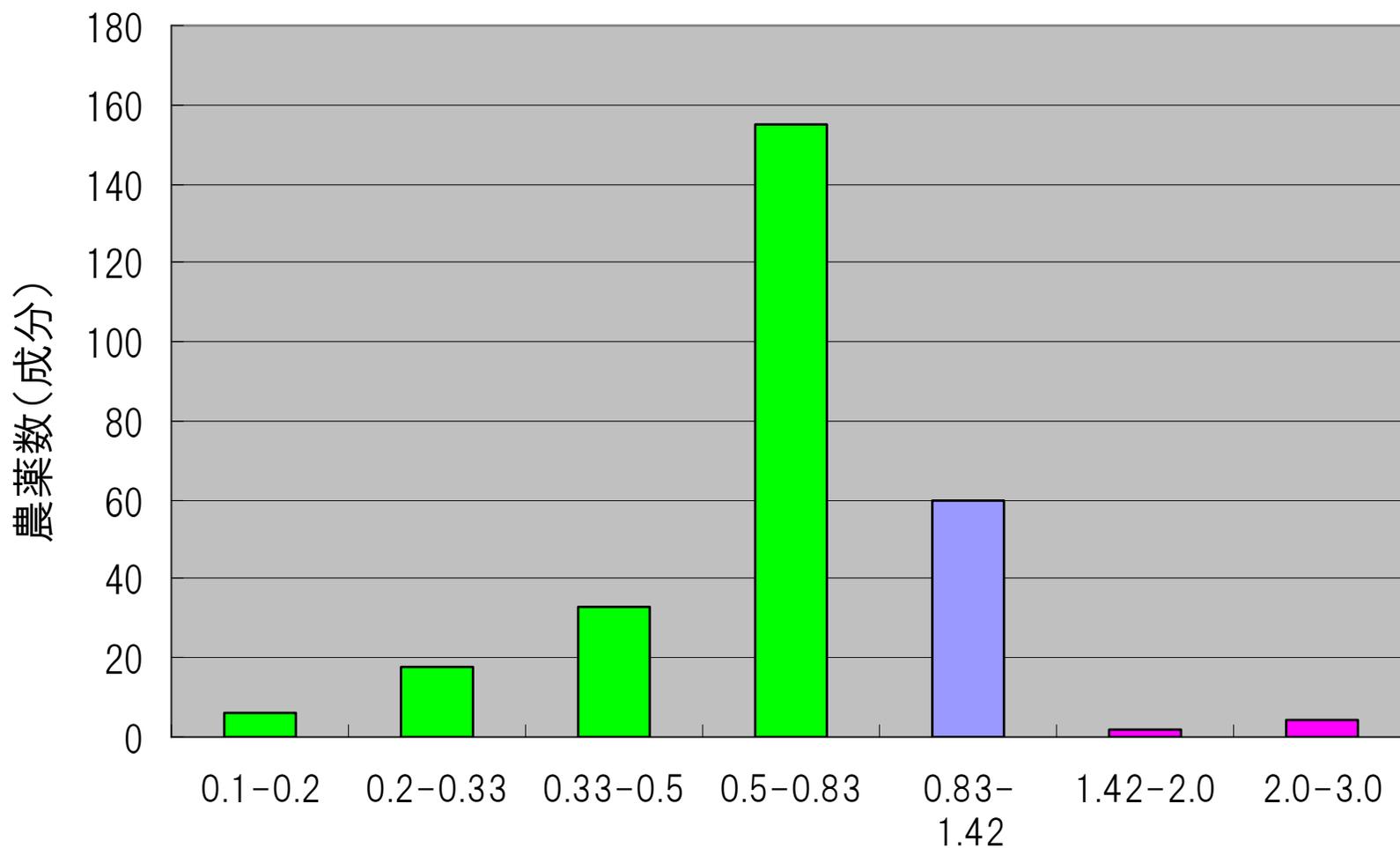
PEG共注入によるクロマトグラム比較

●ポジティブ効果

●ネガティブ効果



PEG共注入による効果



(STのピーク面積)/(PEG共注入STのピーク面積) 面積比

農薬標準品の測定における問題点

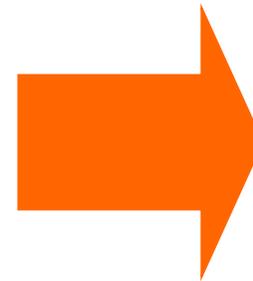
GC/MSで農薬標準溶液を**単品**で測定した場合と**混合標準溶液**で測定した場合で、同じ濃度にもかかわらず、**面積値が大きく異なる**経験をしたことはありませんか？



本当に起きている？

原因は？

対策は？

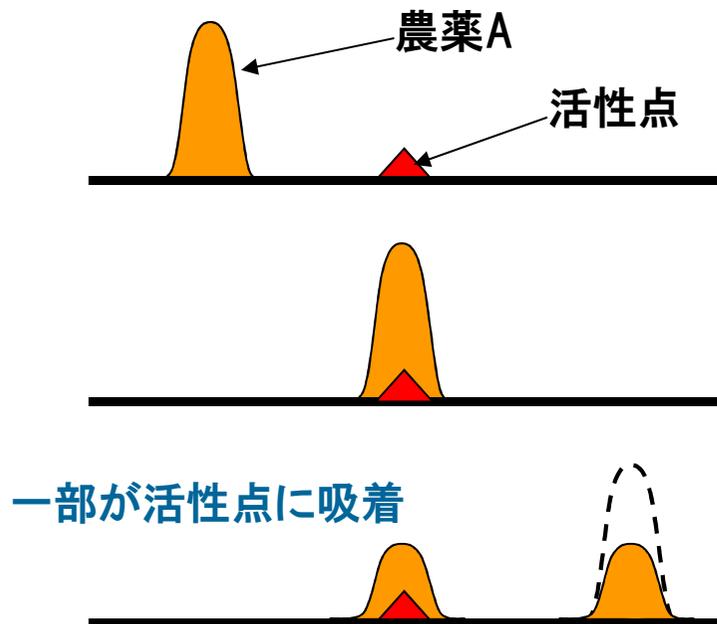


検証実験

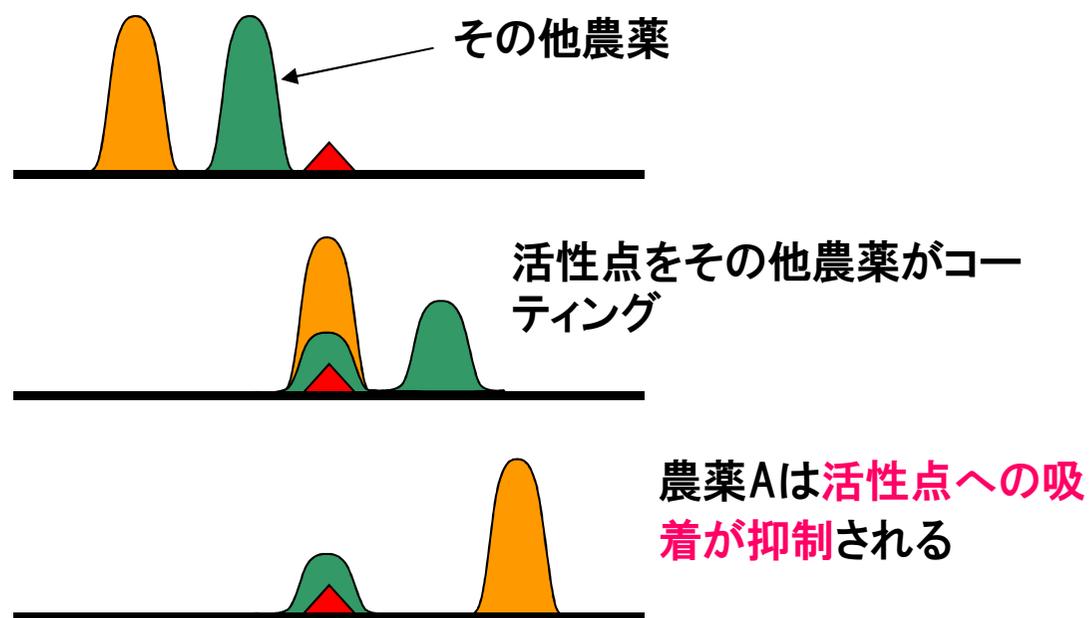
原因の推測

GC/MS分析におけるマトリックス効果と似たような現象がおきているのではないかと推測されています。

農薬A単品標準溶液



混合標準溶液(農薬A+その他農薬)



単品標準溶液より混合標準溶液の方がピーク面積が大きくなる！

検証実験

目的成分:フェニトロチオン、クロルピリホス

検討内容:①**単品標準溶液** フェニトロチオン 0.5ppm

②**混合標準溶液32** (フェニトロチオンを含む) 0.5ppm

③**混合標準溶液34** (フェニトロチオンを含まない)+フェニトロチオン 0.5ppm

④ 上記①+ポリエチレングリコール(PEG)300を一定濃度添加

⑤ 上記②+ポリエチレングリコール(PEG)300を一定濃度添加

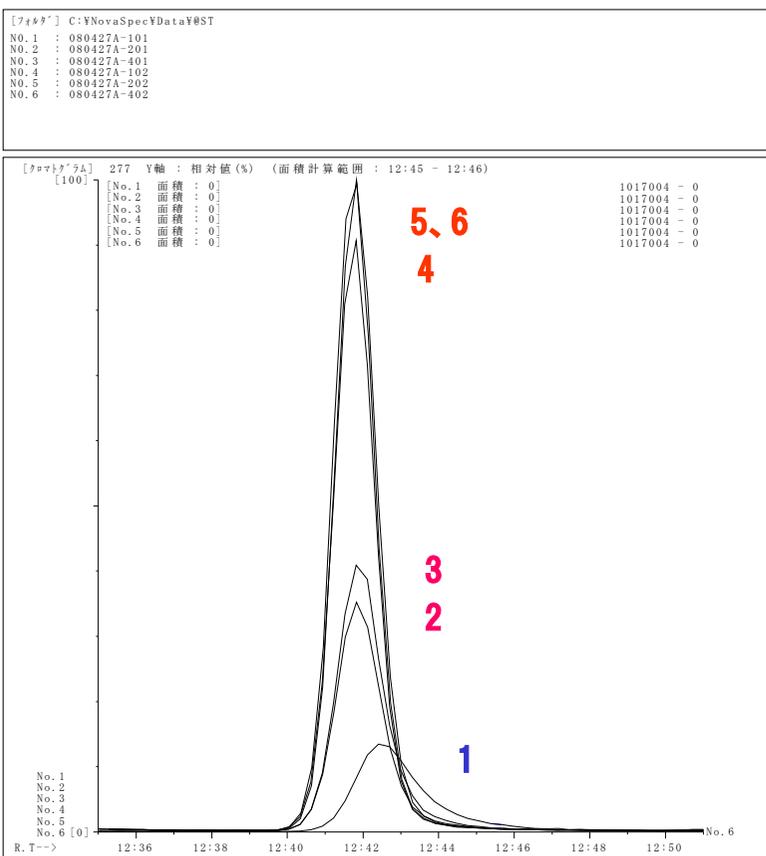
⑥ 上記③+ポリエチレングリコール(PEG)300を一定濃度添加

*クロルピリホスも上記と同様に検討

測定方法:上記①～⑥をそれぞれスプリットレス注入法で2 μ L注入し、GC/MS測定を行った。

結果-フェニトロチオン-

フェニトロチオン 0.5ppm



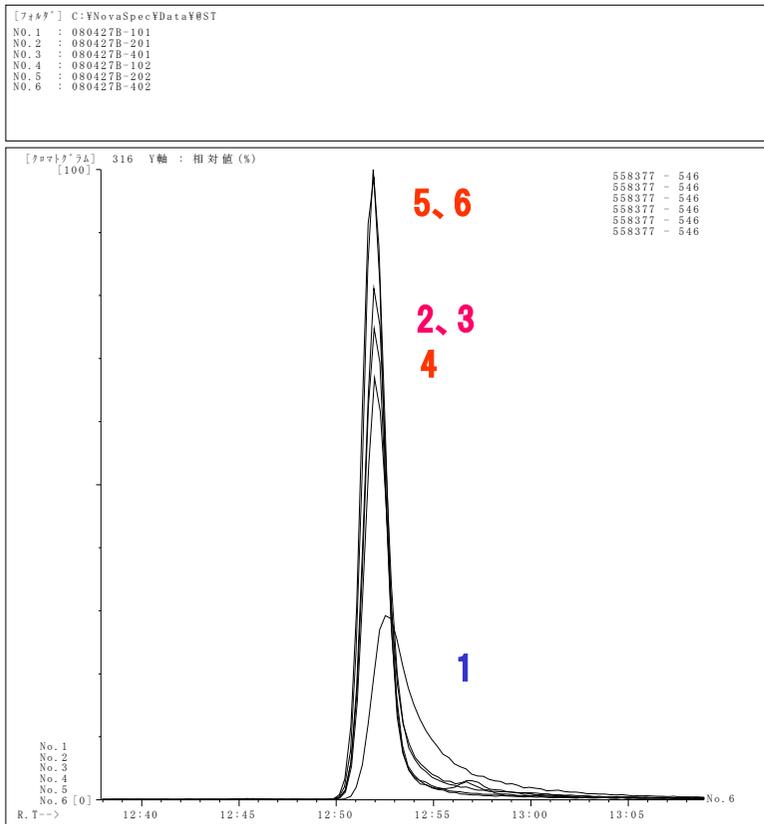
フェニトロチオン 0.5ppm 2uL スプリットレス注入

		Area
1	単品標準溶液(フェニトロチオンのみ)	580385
2	混合標準溶液32(フェニトロチオン含む)	1077579
3	混合標準溶液34(フェニトロチオン含まない)+フェニトロチオン	1276349
4	単品標準溶液(フェニトロチオンのみ)+PEG300	2703933
5	混合標準溶液32(フェニトロチオン含む)+PEG300	2440677
6	混合標準溶液34(フェニトロチオン含まない)+フェニトロチオン+PEG300	2724961

- ①が最も面積値が小さく、ピーク形状もテーリングを起している。
 ②と③の面積値はほぼ同じで、①よりもピーク形状面積値が高くなった。
 PEG添加により、ピーク形状・面積値ともに向上した。(④・⑤・⑥)

結果-クロルピリホス-

クロルピリホス 0.5ppm



クロルピリホス 0.5ppm 2uL スプリットレス注入

	Area
1 単品標準溶液(クロルピリホスのみ)	995061
2 混合標準溶液32(クロルピリホス含む)	1518705
3 混合標準溶液34(クロルピリホス含まない)+クロルピリホス	1335686
4 単品標準溶液(クロルピリホスのみ)+PEG300	1294356
5 混合標準溶液32(クロルピリホス含む)+PEG300	1669142
6 混合標準溶液34(クロルピリホス含まない)+クロルピリホス+PEG300	1719705

- ①が最も面積値が小さく、ピーク形状もテーリングを起している。
 ②と③の面積値はほぼ同じで、①よりもピーク形状面積値が高くなった。
 PEG添加により、ピーク形状・面積値ともに向上した。(④・⑤・⑥)

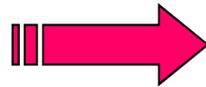
結果と対策

本当に起きている？



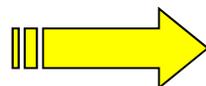
単品標準溶液と混合標準溶液では、同じ濃度に調製しても面積値が異なる現象を確認

原因は？



標準溶液の濃度ではなく、GC/MS分析における要因(単品のほうがより活性点への吸着を起しやすい)が大きいことがわかった

対策は？



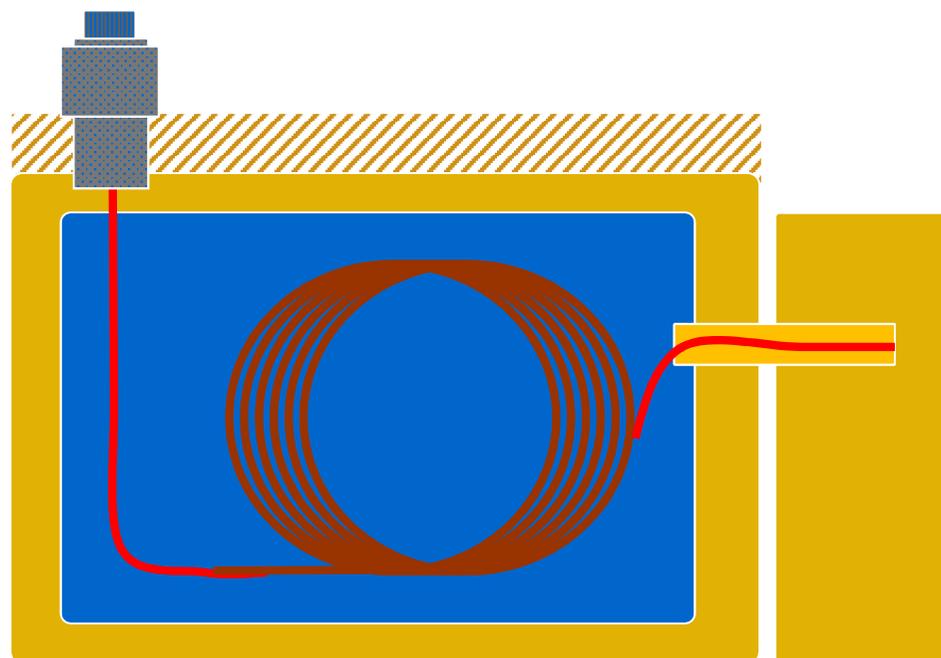
PEG300の添加(共注入)により、農薬の活性点への吸着が抑制され、より正確な定量値に近付けることができると考える

PEG共注入のGC/MS条件

注入口条件

LVI-S200の場合：
最高温度を290°Cとする。

Splitless注入口の場合：
設定温度を270°Cとする。



インターフェース・MS条件

◆ ポストカラム：
不活性化処理カラム
0.25mm × 0.5M

● インターフェース温度：290°C

* 高沸点のPEGをインターフェースに残さないため。

イオン化室温度：260°C

GCオープン条件

◆ プレカラム：
不活性化処理カラム
0.25mm × 0.5M
プレスフィット

◆ 分離カラム：
PBX-5
0.25mm × 30M, df.0.25um
最高使用温度：360°C
* 高温条件に対して耐久性のある分離カラムを選択。

● オープン温度：
最高温度を310°C (5min以上)とする。

* 高沸点のPEGを分離カラムに残さないため。

GC/MSでのサンプル測定順序について

測定順序について

■検量線作成用のスタンダードをどの順序で測定すればよいのか？

◎ 各スタンダードをサンプルで挟んで測定する。

起爆注入（標準溶液を注入する前に試料溶液を注入する）

例1)

1	ほうれんそう	Blank	dummy
2	ほうれんそう	Blank	
3	ほうれんそう	0.01ppm	添加1
4	Standard	0.005ppm	
5	ほうれんそう	0.01ppm	添加2
6	Standard	0.01ppm	
7	ほうれんそう	0.01ppm	添加3
8	Standard	0.02ppm	

サンプル測定後はマトリックスが活性点をコーティングしているため、吸着が抑制される。

測定している分子数について

クロルピリホス (分子量: 350.6)

10ppbを1uL注入した時の**分子数**は？

$$10\text{ppb } 1\text{uL注入} = 10\text{pg}$$

$$= 10 \times 10^{-12}\text{g}$$

1 mol 6.02×10^{23} 個の原子・分子の集団

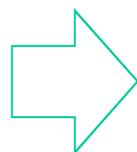
1 mol の物質の質量 = 原子量・分子量 [g]

$$6.02 \times 10^{23} \text{ 個} \times \frac{10 \times 10^{-12}\text{g}}{\text{MW: } 350.6} = 1.7 \times 10^{10} \text{ 個} = \mathbf{170\text{億個!}}$$

GC大量注入とGC/MSMS

GC/MSMS

高感度
高選択性

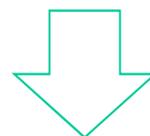


■ 測定対象成分の絶対量が少ない場合

- ・再現性が損なわれやすい。
- ・マトリックス効果の影響(異常回収率)を受けやすい。
- ・検量線の直線性が損なわれやすい。



どんなに感度が良くてもある程度の**絶対量**が必要



GC大量注入 + GC/MSMS

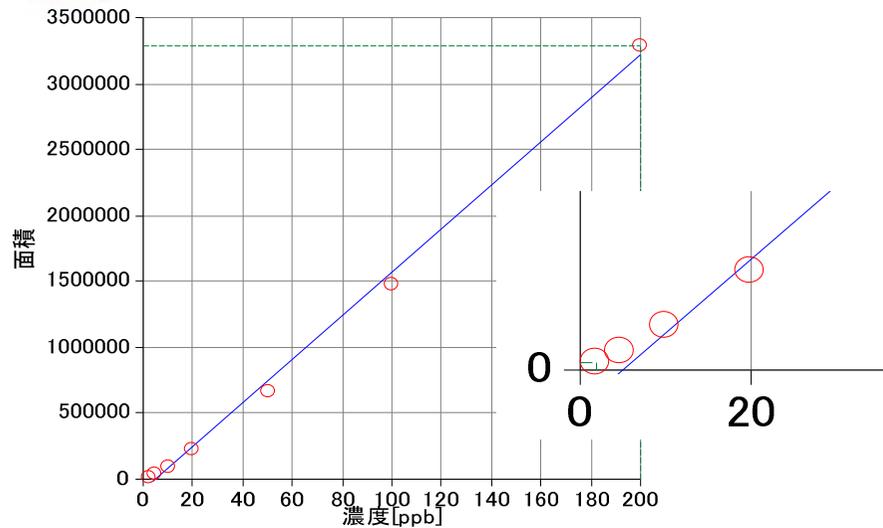


検量線の種類について

検量線比較 : Pyributicarb

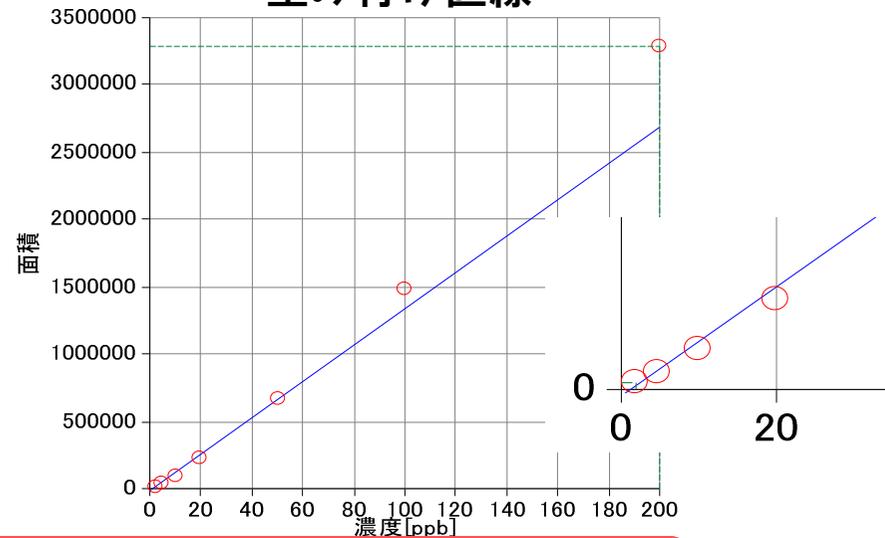
検量線:直線
 面積(比率)=16525.21726*Q-82784.17874
 相関係数=0.9985702

直線



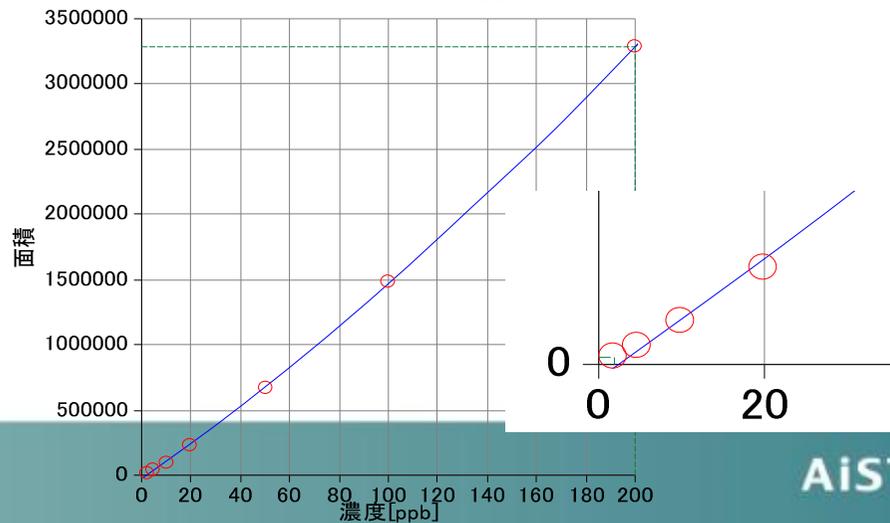
検量線:重み付き直線
 面積(比率)=13460.080182*Q-13014.16664
 相関係数=0.9985702

重み付け直線



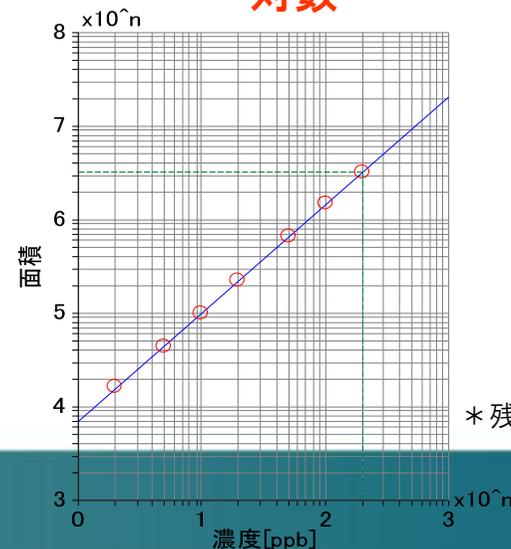
検量線:2次曲線
 面積(比率)=16.26921*Q²+13335.30299*Q-29676.041172
 相関係数=0.9999246

2次曲線



検量線:対数
 面積(比率)=7085.84726*Q^{1.15744}
 相関係数=0.9999899

対数



* 残農研の坂様からの助言

検量線と定量値比較

検量線を作成したスタンダードの面積値でその検量線により定量値を求め、回収率として表した。理想は100%になるはず。。

直線

化合物名	Pyributicarb	直線	
ファイル名	濃度	定量値	(回収率%)
101211A-S02	200ppb	203.81	101.9
101211A-S03	100ppb	94.71	94.7
101211A-S04	50ppb	45.37	90.7
101211A-S05	20ppb	18.44	92.2
101211A-S06	10ppb	10.99	109.9
101211A-S07	5ppb	7.67	153.5
101211A-S08	2ppb	6.02	301.0

重み付け直線

化合物名	Pyributicarb	重み付け直線	
ファイル名	濃度	定量値	(回収率%)
101211A-S02	200ppb	245.03	122.5
101211A-S03	100ppb	111.09	111.1
101211A-S04	50ppb	50.52	101.0
101211A-S05	20ppb	17.46	87.3
101211A-S06	10ppb	8.31	83.1
101211A-S07	5ppb	4.24	84.7
101211A-S08	2ppb	2.21	110.3

2次曲線

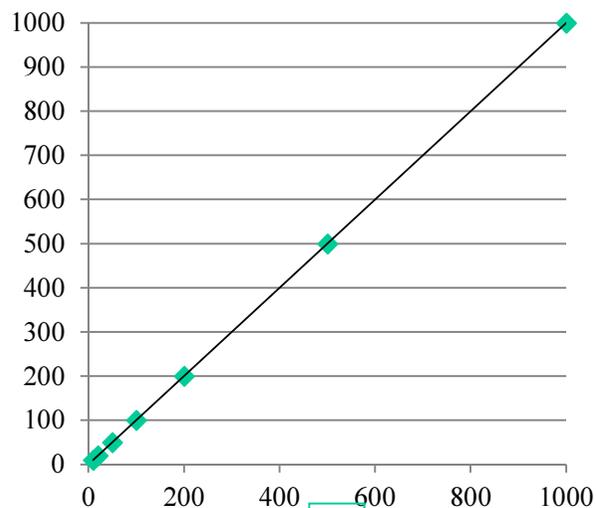
化合物名	Pyributicarb	2次曲線	
ファイル名	濃度	定量値	(回収率%)
101211A-S02	200ppb	199.85	99.9
101211A-S03	100ppb	100.95	100.9
101211A-S04	50ppb	49.28	98.6
101211A-S05	20ppb	18.46	92.3
101211A-S06	10ppb	9.52	95.2
101211A-S07	5ppb	5.49	109.8
101211A-S08	2ppb	3.46	173.1

対数

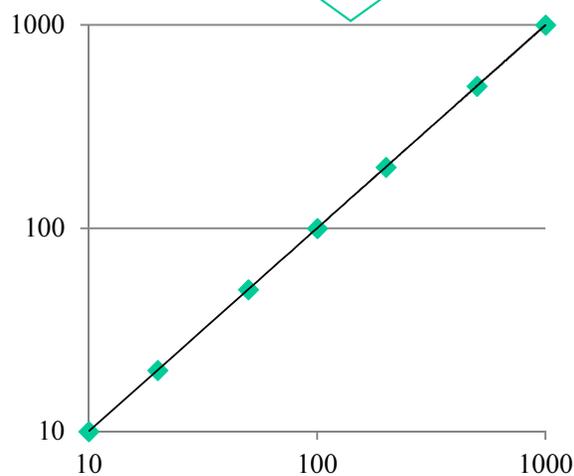
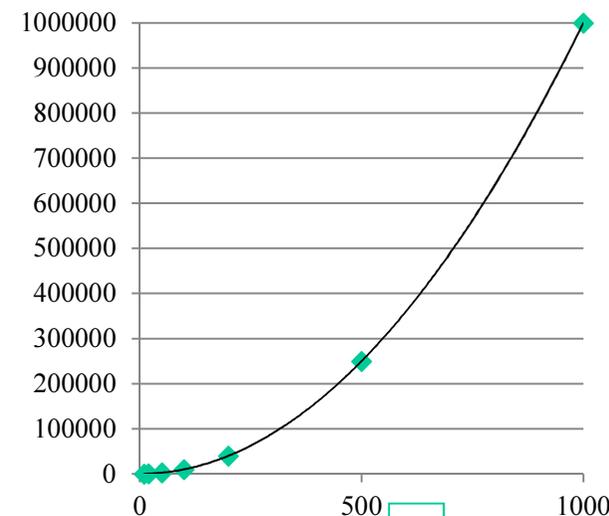
化合物名	Pyributicarb	対数	
ファイル名	濃度	定量値	(回収率%)
101211A-S02	200ppb	201.14	100.6
101211A-S03	100ppb	101.13	101.1
101211A-S04	50ppb	50.73	101.5
101211A-S05	20ppb	19.61	98.0
101211A-S06	10ppb	9.74	97.4
101211A-S07	5ppb	4.84	96.9
101211A-S08	2ppb	2.09	104.7

対数検量線への表記

濃度	面積
10	10
20	20
50	50
100	100
200	200
500	500
1000	1000

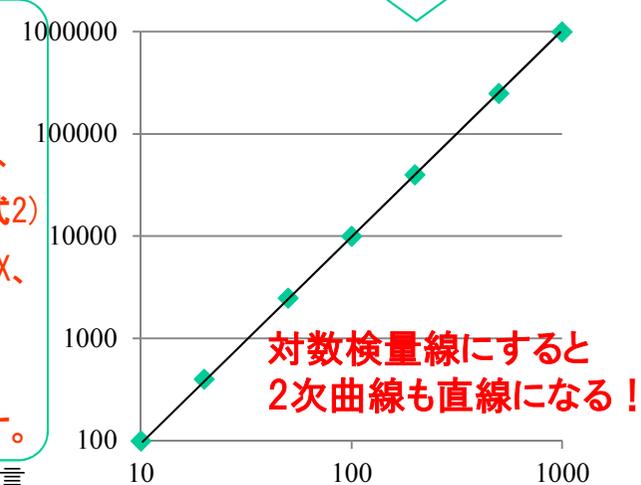


濃度	面積
10	100
20	400
50	2500
100	10000
200	40000
500	250000
1000	1000000



二次曲線で得られる式は、
 $y = ax^2$ (式1)
 式1の両辺を対数変換すると、
 $\log(y) = \log(a) + 2\log(x)$ (式2)
 そこで、 $\log(y) = Y$ 、 $\log(x) = X$ 、
 $\log(a) = A$ と置き換えると、
 $Y = 2X + A$ 式(3)
 となり、一次直線になります。

*JAあいちの永井様からの助言



対数検量線にすると
 2次曲線も直線になる!



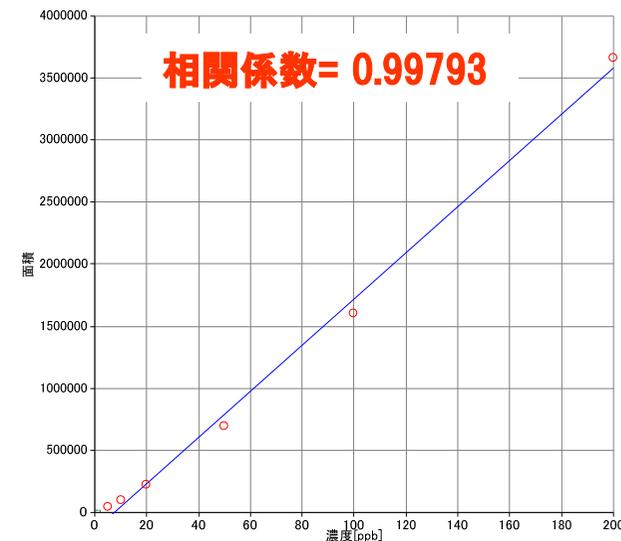
実際のデータによる各検量線

濃度	面積
	A
200	3664586
100	1602024
50	694737
20	219287
10	95921
5	42917

対数検量線の相関係数が一番良好！

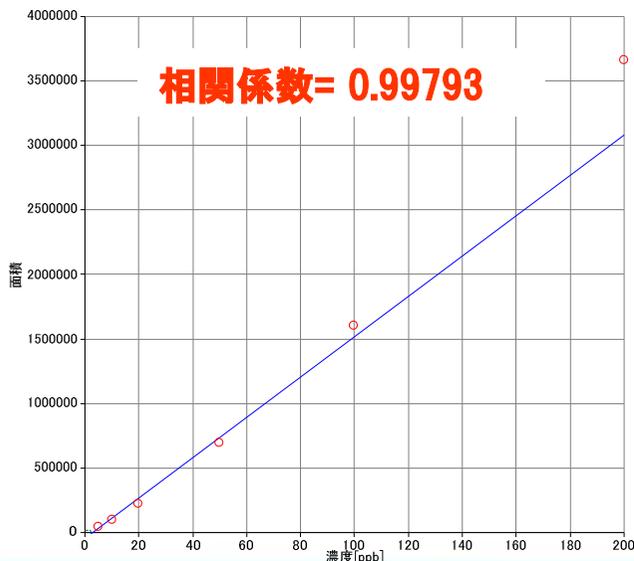
検量線:直線
面積(比率)=18640.57261*Q-142858.2367
相関係数=0.9979314

直線検量線



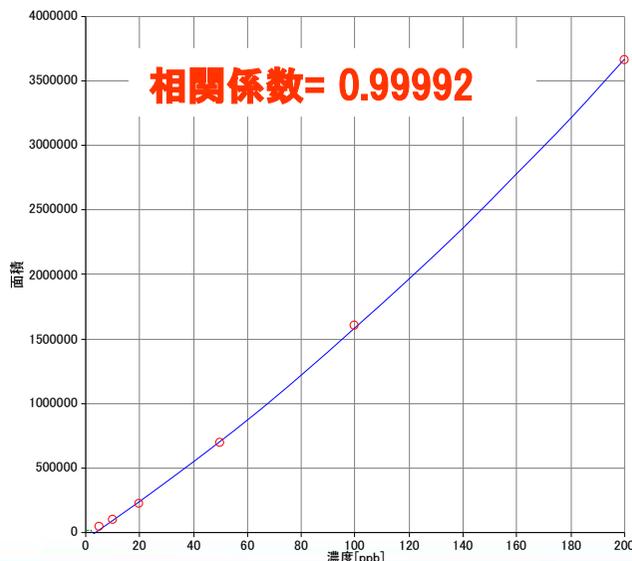
検量線:重み付き直線
面積(比率)=15640.63379*Q-42769.091544
相関係数=0.9979314

重み付き直線検量線



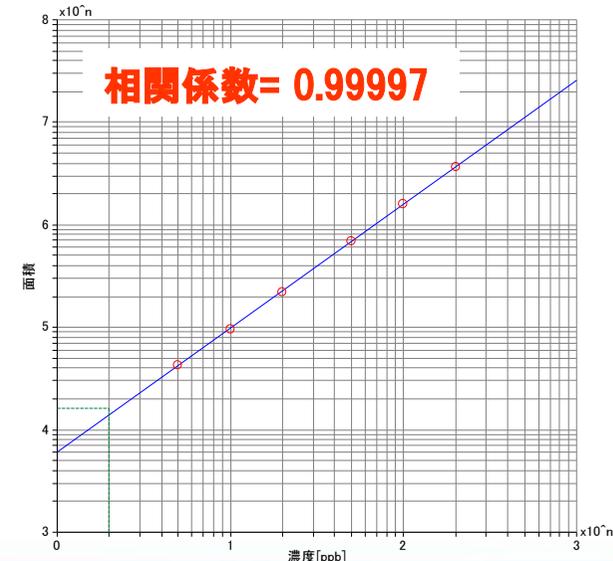
検量線:2次曲線
面積(比率)=22.47327*Q²+14092.33921*Q-49620.78284
相関係数=0.9999220

2次曲線検量線



検量線:対数
面積(比率)=5966.1335*Q^{-1.21243}
相関係数=0.9999763

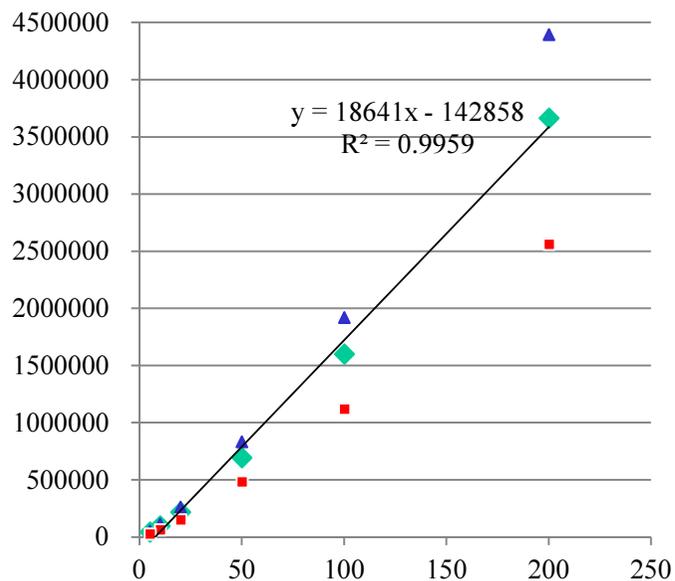
対数検量線



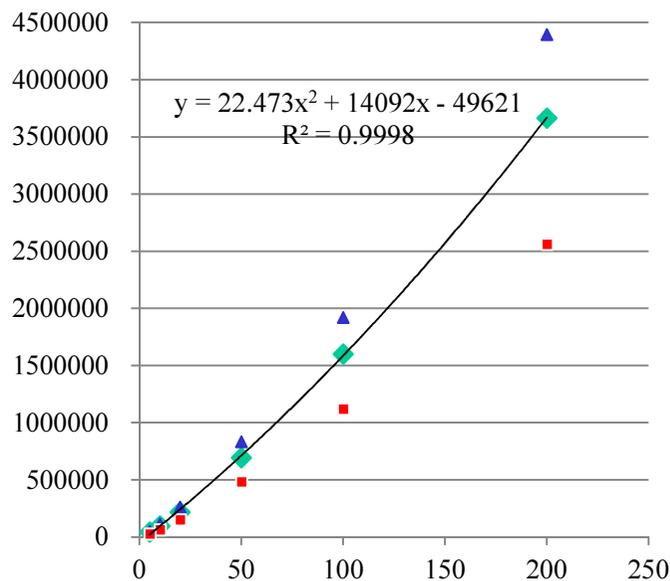
各検量線

濃度	面積		
	A	High: A × 1.2	Low: A × 0.7
200	3664586	4397503	2565210
100	1602024	1922429	1121417
50	694737	833684	486316
20	219287	263144	153501
10	95921	115105	67145
5	42917	51500	30042

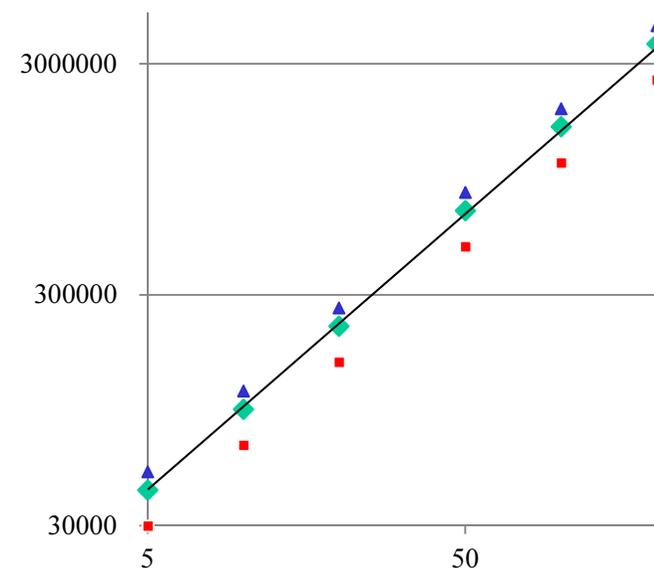
対数検量線の場合、どの濃度においても面積Aに対して
同じ比率での差で認識できる。



直線検量線



2次曲線検量線



対数検量線



GC/MSを用いた食品中残留農薬分析 における検量線に関する検討

株式会社アイスティサイエンス

○佐々野僚一 谷澤春奈

目的

厚生労働省が提示している「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に従い、比較検討している分析手法の妥当性評価を行っていたところ、検量線の作成方法により回収率や精度の評価が異なることがわかった。

今回、検量線の作成方法に着目し、GC/MSを用いた食品中残留農薬分析における各種検量線の比較検討を行ったので報告する。

□ 同じ前処理や測定でも

「検量線の作成方法」により回収率や精度の評価が異なる !?

検量線の種類

➤ 絶対検量線法

➤ 内部標準法

- ✓ 測定対象物質と内標準物質との物性の違いなどからその補正に関して問題視されることもあるが、前処理工程や測定による影響を除去する手段として採用されている

➤ 標準添加法

- ✓ 1)すべての検体について2回ずつ注入しなければならない, 2)添加した標準溶液の濃度よりも極端に高い濃度の農薬を検出した場合に誤差が大きくなり, 正確な試料濃度が求められない, などの理由により難しい面もあるが, マトリックスの影響を除去して測定する手段としては有用であると報告されている

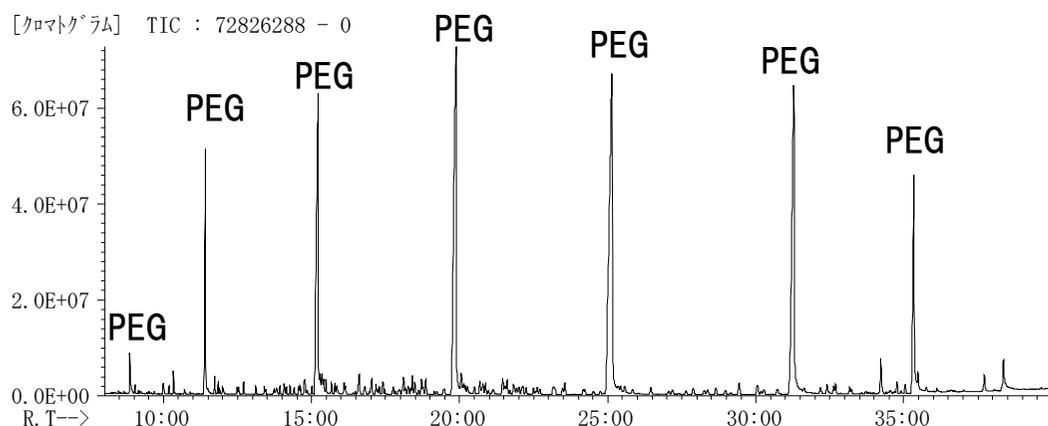
➤ マトリックス検量線法

- ✓ 前処理後の検液（マトリックス）に標準液を添加して検量線を作成するため、マトリックスの影響を除去して測定することが可能となるが、標準液を添加する検液に測定対象農薬を含んでいないことが大前提となる

検量線の種類

➤ PEG共注入検量線法

- ✓ 標準液にマトリックスのかわりにPEG（ポリエチレングリコール）を添加して検量線を作成する手法。マトリックス検量線の欠点である残留農薬の影響を受けない。



効果

- マトリックスによる異常回収率の低減
- 感度向上
- ピーク形状の改善
- カラム劣化の防止
- 検量線の直線性の向上

☆PEG300を使用

- ほとんどの農薬のリテンションタイムをカバーしている。
- フラグメントイオンは主に100以下しか持たないため、農薬のマスペクトルと重なりにくい。

☆標準溶液だけでなく最終試験溶液にもPEG共注入

- マトリックスによる活性点の増大をPEGのコーティングにより防ぐことができる。

実験方法

添加回収試験(ほうれん草:添加濃度 0.01ppm)を行い、同一の測定結果のピーク面積から次の各検量線を用いて定量し、それぞれの回収率を求めた。

- A. 絶対検量線法
- B. 絶対検量線法 (PEG有)
 - : Aで作成した検量線用標準溶液にPEG300を20ug/mLになるように添加し、再度検量線を作成。
- C. 内部標準法 (PEG有)
 - : Benfuresateを内部標準物質 (I.S.) として相対検量線を作成。
- D. マトリックス絶対検量線 (PEG有)
 - : 前処理後の検液に混合標準液を添加してマトリックス標準液を作成し、検量線を作成。
- E. マトリックス内部標準法 (PEG有)
 - : Benfuresateを内部標準物質 (I.S.) として相対検量線を作成。

添加回収試験(回収率分布)

検量線種類 溶液 PEG添加の有無 算出方法	検量線 A 標準液 PEG無 絶対検量線	検量線 B 標準液 PEG有 絶対検量線	検量線 C 標準液 PEG有 内部標準法	検量線 D マトリックス PEG有 絶対検量線	検量線 E マトリックス PEG有 内部標準法
50%未満	10	7	9	14	14
50-70%	3	6	3	11	15
70-120%	12	31	62	87	83
120-150%	29	41	24	1	2
150%以上	60	29	16	1	0
合計	114	114	114	114	114

試料;ほうれん草、 添加濃度 ;0.01ppm、 添加農薬成分数;114成分

結果と考察

標準液-絶対検量線のPEG無とPEG有を比較するとPEG有の方が異常回収率(120%以上)の分布が少ないことがわかった。また、標準液-絶対検量線法と標準液-内部標準法では内部標準法の方が異常回収率の分布がさらに少ないことがわかった。PEG有標準液とマトリックスではマトリックス検量線の方が良好な結果を得ることができた。マトリックス検量線において、絶対検量線と内部標準法の違いはあまり見られなかったが、分取などの前処理での操作や機器での感度変動を考慮すると、内部標準法を取り入れておく方が望ましいと考えられる。

今回の結果から、妥当性評価を行う場合、同じ分析手法でも検量線の種類が異なるとその評価まで大きく異なることがわかった。また、今回比較検討を行った検量線ではマトリックス検量線が最も良い評価を得ることがわかった。

今後の課題

しかし、マトリックス検量線は本当に最適なのだろうか？

□ マトリックス検量線の問題点

マトリックス検量線法はマトリックス標準液に測定対象農薬を含んでいないことが大前提となり、実際の定量分析で検出された時の定量方法が問題となる。

➤ 標準添加法で定量

✓ マトリックス検量線法での妥当性評価を行った意味が薄れてしまいかねない。

➤ 農薬を含んでいない測定対象検体と同じ種類の検体の抽出液でマトリックス検量線を作成

✓ その抽出液を常に準備しておかなければならない。

□ 今後の課題

極性PEG共注入検量線法のように農薬を含んでおらず、どのような測定対象物にも対応できるPEG共注入検量線も有効のように思われる。すなわち、このPEG共注入を改良して、PEGよりも効果があり、農薬に影響を与えないPEGに代わる添加物質を探求することが必要なのかもしれない。



今後の課題

検量線の役割とは？

真の値はどこに？