

定量結果から推測する「うまくいかない」原因 ～数値からのメッセージ～

株式会社アイスティサイエンス

定量結果がおかしいと感じた時どうしていますか？

例えば

低回収率、高回収率、ピーク形状、ばらつきetc…

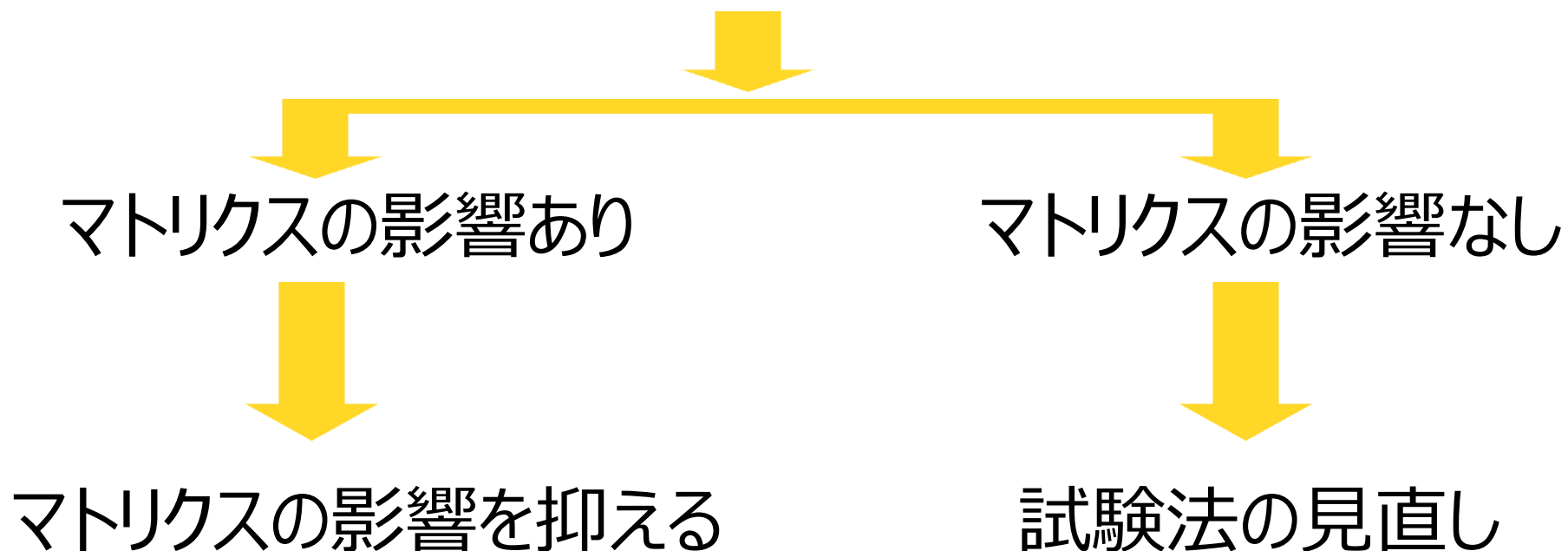
ミスがあったのだろうか・・・
初めての検体だったし・・・
試薬が古かったのかな・・・



よし、もう一回やってみよう！

その再検査ちょっと待った！

「おかしい」の例・・・異常回収率（低、高）



「おかしい」の例

例えば回収率異常

→まずは、マトリクス検量線による、マトリクスの影響の確認



マトリクスの影響あり → マトリクスを抑える

マトリクスの影響なし → 試験法の見直し

※「マトリクスの影響」は、低・高回収率、両方をさします。

マトリクスの影響を抑える

簡単



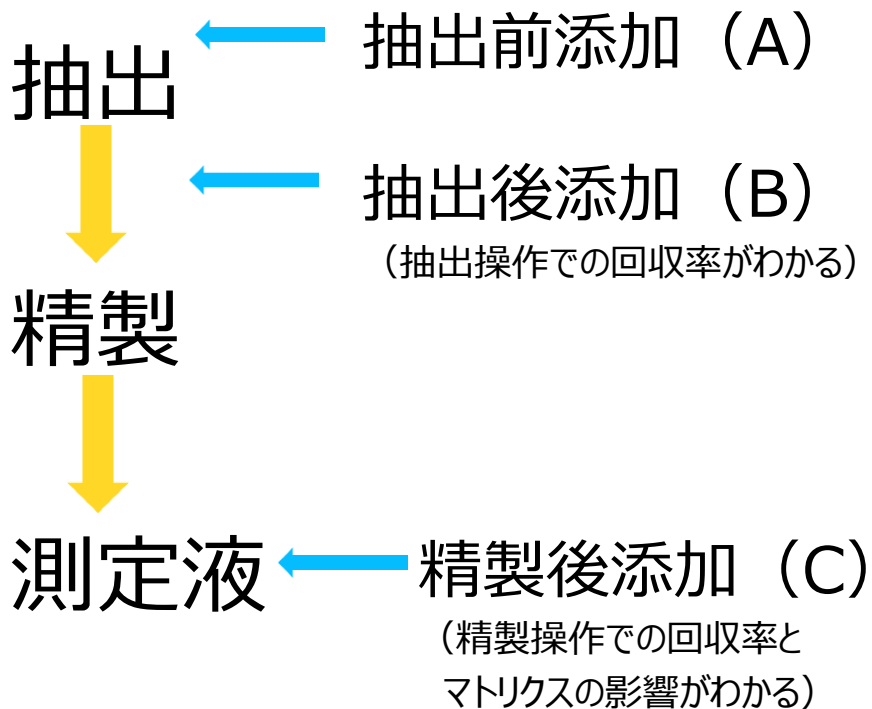
難しい

- ① 注入量を減らす (LC-MS/MS)
測定液を希釈する
- ② 擬似マトリクスを使う (GC-MS)
- ③ 精製で固相への負荷を減らす
(負荷量減量や抽出液希釈)
- ④ マトリクスを予想し精製アレンジ

試験法の見直し

原因は抽出？精製？分解？

多段標準添加



回収率からわかること

$A \div \text{添加濃度} = \text{添加回収試験}$

$C \div \text{添加濃度} = \text{マトリクスの影響}$

$A \div C = \text{抽出・精製工程の回収率}$
(マトリクスの影響相殺)

$B \div C = \text{精製工程の回収率}$

$A \div B = \text{抽出工程} //$

試験全体に共通

ガラス器具の精度と用途例

計量精度	器具例	使い勝手	用途例	農薬分析では
かなり高い	ホールピペット メスフラスコ	△	分取、定容	検量線作成
まずまず高い	メスピペット メスシリンダー ビューレット	△～○	添加、滴下	膨潤用の水添加 固相溶出液計量
低い	駒込ピペット ビーカー	○	大まかに 量る、溜める	固相コンディショニング 溶媒小分け

試薬の調整と保管

要事調製…定量値におよぼす影響が大きい

密閉保管…揮発性

冷蔵保管…常温で不具合

冷凍保管…常温・冷蔵で不具合

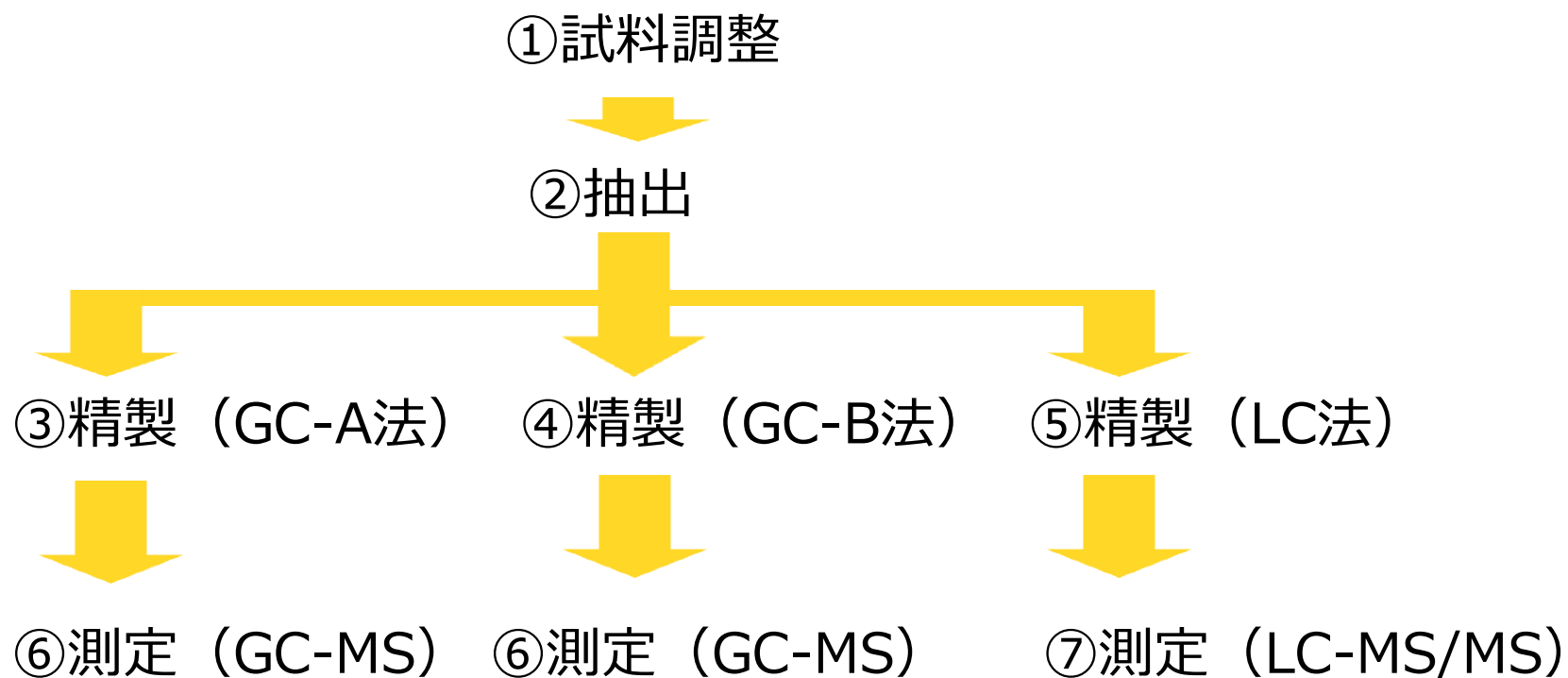
暗所保管…光により不具合

ガラス保管…有機溶媒

プラスチック瓶保管…酸、アルカリ

各工程がおよぼす結果への影響 ～STQ法を例に～

STQ法の工程



① 試料調整の影響

原因と要素

症状

対策例

均一不足

試料中の偏り

ばらつき

凍結粉碎、ミル、
超遠心粉碎、ふるいなど

凍結・解凍
の繰り返し

変性

ばらつき

凍結粉碎、複数凍結保管

分解

酵素
加水分解
熱分解

低回収率

酸・アルカリ添加、凍結粉碎、
発熱防止、温度調整など

吸着

物性特性

低回収率

吸着防止剤添加など

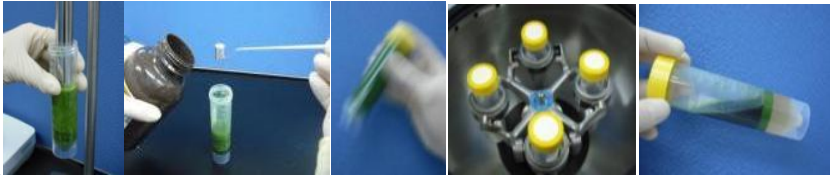


①抽出工程の影響

抽出・塩析フロー

試料 10g (穀類 5g + 水 10mL) ①
 — アセトニトリル 10mL ②
 ホモジナイズ ③
 — NaCl (食塩) 1g
 クエン酸3Na2水和物 1g
 クエン酸水素2Na1.5水和物 0.5g
 MgSO₄ (無水硫酸マグネシウム) 4g
 ④
 攪拌 (手で振とう 1分間) ⑤
 遠心分離 (3000rpm 5分間) ⑥

アセトニトリル層



留意点

- ①水が少なすぎると最適にpHが調整されない
→アセトニトリル層に分配されない可能性あり
- ②ある程度高精度の器具を推奨
共洗いとをすると抽出液が希釈され低回収率へ
(複数回抽出後、定容する場合は可)
- ③サンプル自体からの抽出
- ④試薬量を間違えると、pH調整、塩析が期待通りにならない可能性あり
- ⑤抽出、塩析を兼ねている。粘性が帯びるものはしっかり振とう。振とうスピードの影響は比較的低い。試薬を溶かす意味も。
- ⑥上澄みが取ればよい。
回転スピードは比較的影嚢は低い。

③精製工程 (GC-A法)

精製フロー

分取 1 mL (試料 1g相当) ①

Smart-SPE C18-50 mg : 精製

— 洗液 アセトニトリル 0.2mL
流出液

— 添加 トルエン 0.4mL
無水硫酸Mg 0.3g ②

Smart-SPE GCS-20mg/PSA-30mg : 精製③

流出液
溶出 アセトニトリル-トルエン(3/1) 0.6mL④

定容 (2 mL, アセトニトリル-トルエンで調製) ⑤

留意点

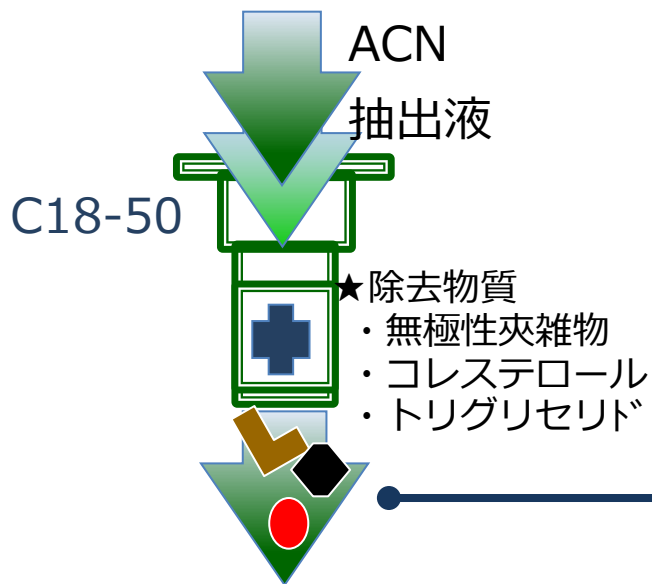
- ①ある程度高精度の器具を推奨
- ②少ないと脱水不十分となりPSAでの精製効果低下
- ③上グラファイトカーボン+下PSA
選択性の高い固相を後ろに。
順番を間違えると精製不足の可能性
- ④3:1がグラファイトカーボンの溶出・
精製のバランス。トルエン比が高いと
平面構造の夾雑が溶出低いと、低回収
率を起こす可能性
- ⑤ある程度精度の器具を推奨

※コンディショニングは駒込ピペットで
2mL以上程度の精度、通液スピード
は早くても問題ない。

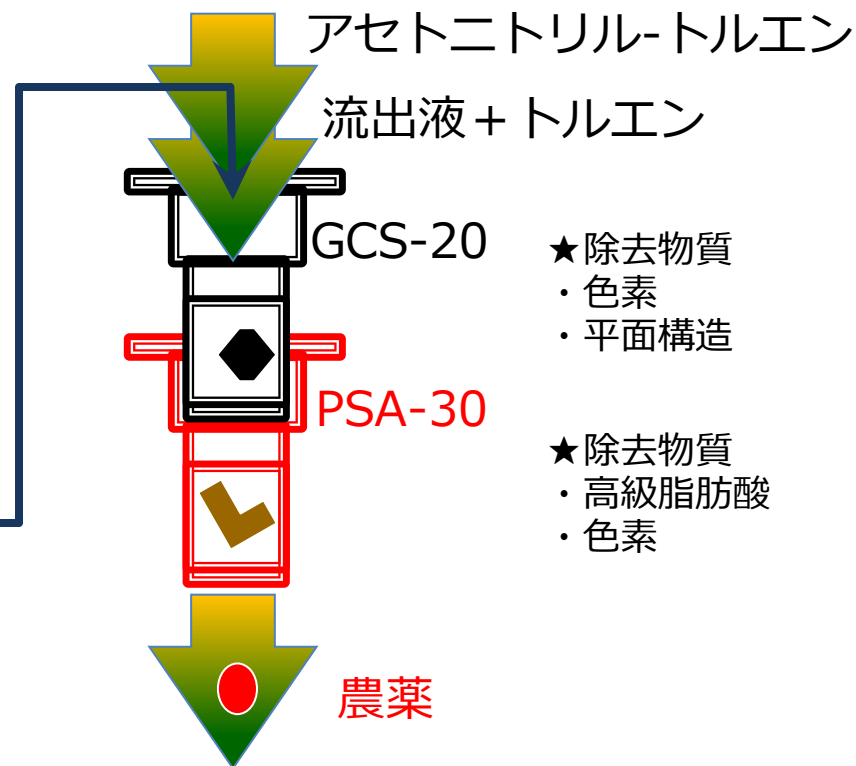
※溶出液は、メスピペットやマイクロ
ペット程度

③精製工程 (GC-A法)

① 精製



② 精製



④精製工程 (GC-B法)

精製フロー

- 分取 0.5 mL (試料0.5g相当) ①
- 添加 水 0.2mL (事前にリザーバー内に入れておく) ②
- Smart-SPE C18-30 mg : 精製
- 洗液 アセトニトリル-水(4/1) 1mL ③
- 流出液
- 添加 水 2mL ④
- Smart-SPE PLS3-10mg : 保持
- 15%食塩水 20mL ⑤
- Smart-SPE PLS3-10mg : 再保持
- 吸引乾燥 : 3分 ⑥
- 連結 Smart-SPE PSA-30 : 精製
- 溶出 アセトン-ヘキサン (15/85) 1mL ⑦
- 定容 (1 mL, アセトン/ヘキサンで調製) ⑧

留意点

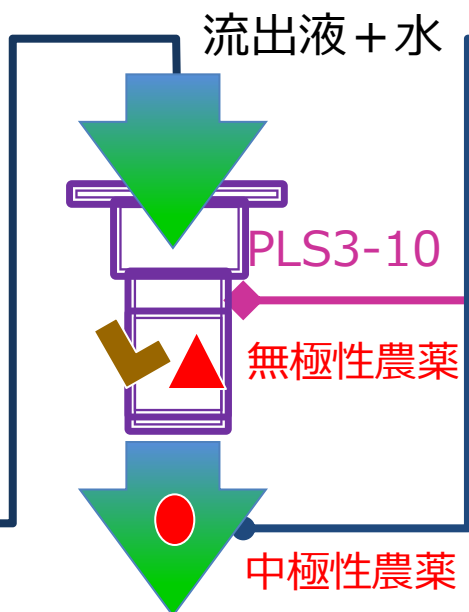
- ①ある程度高精度の器具を推奨
- ②水は予め混合するか、リザーバー内に入れておき、サンプルと混合
→抽出液 (アセトニトリル100%) のままC18に一部でも負荷されると無極性夾雑精製不足の可能性
- ③アセトニトリル比が低いと低極性溶出できず農薬回収率低下。(シラフルオフエン、エトフェンプロックス)
- ④水を忘れると急激に水分量が増えプラスチック器具に低極性の農薬が吸着、回収率低下
- ⑤食塩水が少ないと、中極性の農薬が溶出し廃液され回収率低下。(高極性はLC-MS/MS対象)
- ⑥水分、水滴が残ると、PSAでの精製効果低下
測定液に水が混入すると、測定に悪影響
- ⑦アセトン比が下がると溶出力低下、回収率低下。
(精製を高めるために比率を下げる場合あり)
ある程度フレッシュな混合溶媒を推奨
- ⑧ある程度高精度の器具を推奨
※コンディショニング、溶出溶媒添加器具についてはGC-A法と同じ

④ 精製工程 (STQ-B法)

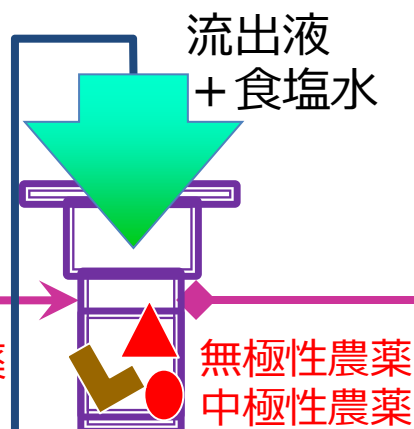
① 精製



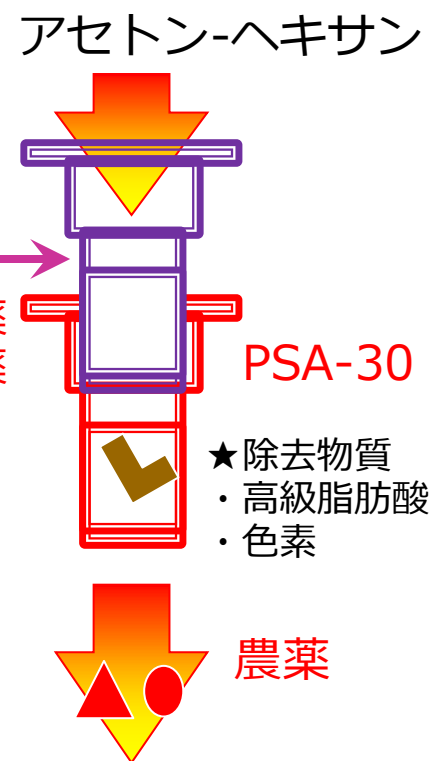
② 保持



③ 再保持



④ 溶出・精製



⑤ 精製工程 (LC法)

精製フロー

分取 1mL (試料 1 g 相当) ①

Smart SPE C18-30mg + PSA-30mg

— 溶出 0.4%ギ酸含有メタノール (pH2.5) 1mL ②
 * 酸性農薬が無い場合、メタノール 1mL

流出液

— 水 0.5mL ③

Smart SPE C18-50mg

— 洗液 メタノール-水 (4/1) 1mL ④

定容 (4 mL, 水で調製) ⑤

留意点

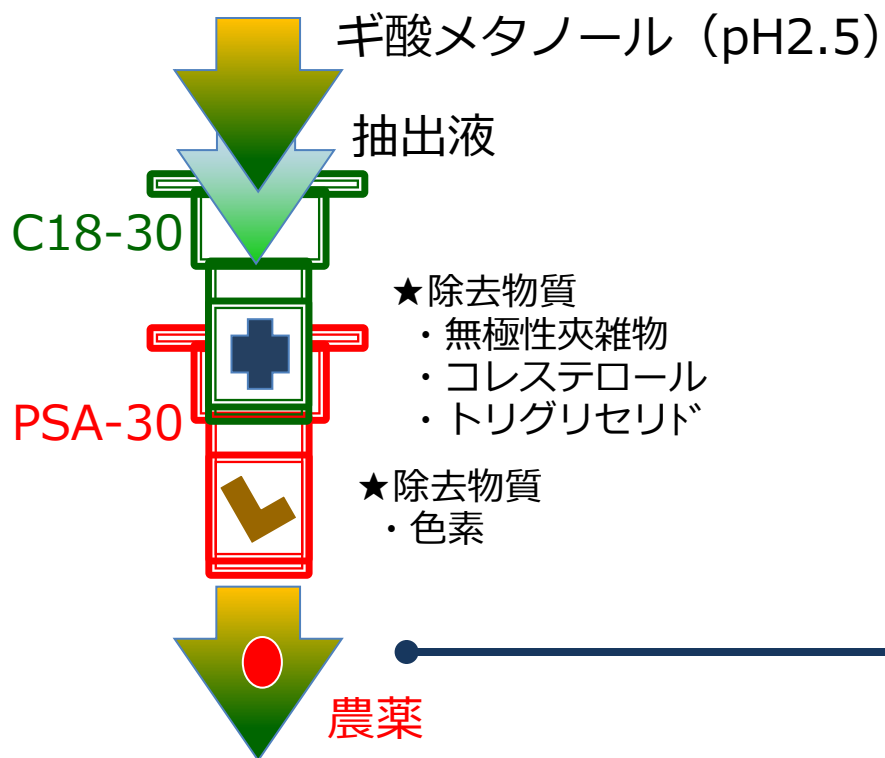
- ①ある程度高精度の器具を推奨
- ②ギ酸濃度が低下すると酸性農薬が溶出不足で回収率低下。フレッシュな調製試液を推奨。(酸性夾雑物除去を優先しギ酸を使用しない場合あり)
- ③水を入れることでC18で低極性夾雑を除去。入れ忘れると精製不足によりLC-MS/MS測定でサプレッションの可能性
- ④メタノール比が低下すると溶出不足により回収低下
- ⑤ある程度高精度な器具を推奨

※コンディショニング、溶出溶媒添加器具についてはGC-A法と同じ

※検量線もサンプルと同じ組成の溶媒で希釈。異なると感度変化、ピーク形状悪化の可能性

⑤ STQ-LC法による精製工程

① 精製



② 精製

