

トリガ MRM データベースおよび ライブラリを用いた 食品抽出物中の農薬の定量と同定

アプリケーションノート

食品

著者

Thomas Glauner
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

Bettina Schuhn,
Justus-Liebig-Universität Giessen
Giessen, Germany

Günther Kempe
State Laboratory for Health and
Veterinary Affairs Saxony
Dresden, Germany

概要

このアプリケーションノートでは、300 を超える農薬のトリガ MRM データベースとライブラリの開発について説明します。ここでは、120 種類の特定の残留農薬用に開発された LC/MS メソッドを使用して幅広い食品を分析するための使用方法を示します。Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用い、Agilent Jet Stream 技術による正イオンモードエレクトロスプレーイオン化法で測定しました。トリガ MRM 測定モードは定量と同時に信頼性の高い確認が可能なることから、偽陽性を排除できるというメリットがあります。5 つの代表的なマトリックスを持つ 3 種類の商品グループについて簡単な社内検証を行い、開発されたトリガ MRM メソッドが、必要とされる定量下限 (LOQ)、直線性、再現性の点から、食品抽出物に含まれる農薬の分析に適切であることがわかりました。トリガ MRM 法を用いることで、妨害マトリックスピークを農薬と間違えて同定する危険性を排除できることをいくつかの例で示します。定量の結果とともに表示される自動リファレンスライブラリマッチングを使用すると、データを効率的に確認し、疑わしいケースに自動的にフラグを付けることができます。



Agilent Technologies

はじめに

食用に用いられる食品群に対して、残留農薬の分析が必要です。2008年9月に施行された委員会規則 (EC) 396/2005 とその付属書では、欧州連合で製造される、または欧州連合に輸入される食品および飼料製品の 170,000 を超えるマトリックスと農薬の組み合わせについて最大残留限界値 (MRL) を設定しています [1]。食品および飼料に含まれる残留農薬分析のメソッドの検証および品質管理手順の基準が SANCO/12495/2011 ガイドラインで設定されています [2]。

増え続ける農薬の同定、定量には LC/MS を用いた多成分一斉分析を使用しています。通常は、その選択性と感度により、トリプル四重極装置が、幅広い食品マトリックスに微量で含まれる数百種類の残留農薬の定量に最適な装置として認められています。ただし、複雑なマトリックスでは、マトリックス成分が、類似、または同一の保持時間を持つ農薬の MRM ピークと共溶出し、偽陽性を引き起こす複数のケースが報告されています [3]。一部の例では、一定の比率と同一保持時間を持った 2 つの MRM トランジションを必要とする SANCO/12495/2011 で定められた同定基準が明らかな同定を行うための十分な選択性を有していませんでした。したがって、追加のトランジションや化合物のフルスペクトルを測定することが望ましいとされています。しかし、結果としてそのメソッドで測定できる化合物の数が減少します。

トリガ MRM では、数百種類の化合物を含んだメソッドを実行できる高速のサイクルタイムと、フルスペクトルの測定の両方が提供されます。1 つまたは複数の主トランジション (定量、確認用) の強度があらかじめ設定したしきい値を越えると最大で 9 つの副トランジション (スペクトル構築用) を測定できるため、スペクトルライブラリとの比較が可能な化合物のフルス

ペクトルが得られます。この結果、対象化合物の確認は 2 つの主 MRM トランジションの面積比だけでなく、リファレンスライブラリのマッチスコアにも基づくものとなります。トリガ MRM での各フラグメントは最適なコリジョンエネルギーとともに測定し、また、フラグメントのデュエルタイムはフルスキャンサイクルよりもかなり長いいため、トリガ MRM でのスペクトルの質は、データ依存型プロダクトイオンスキャンよりも大幅に優れています [4]。さらに、トリガ MRM はアジレントのダイナミック MRM アルゴリズムにより管理されているため、主 (定量) トランジションに一定のサイクルタイムが確保されます。したがって、トリガ MRM でのスペクトルの収集が、データ収集速度や定量用クロマトグラムピークの面積に影響を与えることはありません。

このアプリケーションノートでは、欧州連合リファレンスラボラトリ (EURL) の残留農薬の "Check-your-Scope" リストに従い、LC/MS 分析に適した 300 を超える最も重要な農薬のトリガ MRM データベースとライブラリの開発について説明します。さまざまな食品 (レモン、トマト、緑茶、カモミール、生姜) に含まれる 120 種類の残留農薬の分析にトリガ MRM 測定モードを適用しました。選択したマトリックスの QuEChERS 抽出物を 1~100 µg/kg の複数のレベルで添加しました。代表的な作物としてトマト、レモン、緑茶を使用した 3 つの作物群に対して、SANCO/12495/2011 に従った社内検証を実施しました。イオン化抑制またはイオン化増長 (SSE) によるマトリックス効果の評価、直線性、S/N 比に基づく定量下限 (LOQ)、および異なる添加レベルでの 5 回の繰り返しから得られた再現性の確認など、トリガ MRM と対応するダイナミック MRM のメソッドの特性を確認しました。複雑なマトリックスについての複数の例を示します。これらの例は、主 MRM ピークのいずれかまたは両方にスペクトル的妨害を示したことから偽陽性を回避するための貴重な情報がトリガ MRM によって追加されることを示しています。

実験方法

試薬および薬品

すべての試薬と溶媒は、HPLC または LCMS グレードのものを使用しました。アセトニトリルおよびメタノールは Baker (Mallinckrodt Baker, オランダ、デーベンター) から購入しました。超純水は、0.22 μm ユースポイントメンブレンフィルタカートリッジを備えた Milli-Q Integral システム (EMD Millipore, 米国、マサチューセッツ州、ビレリカ) を使用して生成しました。ギ酸は Fluka (Fluka AG, スイス、ブッフス) から、ギ酸アンモニウム溶液 (5 M) はアジレント (p/n G1946-85021) から購入しました。ほとんどの農薬分析標準は、Dr. Ehrenstorfer (ドイツ、アウグスブルク) から購入しました。

溶液および標準

個々の農薬標準溶液を組み合わせて、物理化学的特性が類似した 30~40 種類の化合物を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でアセトニトリル溶液として調製することで、8 つのグループの混合液を調製し、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管しました。使用の直前にこの 8 つのサブ混合液を組み合わせて、300 を超える農薬が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の農薬混合アセトニトリル溶液を用意しました。この溶液は、QuEChERS 抽出物の添加用とキャリブレーションサンプルの調製に使用しました。濃度範囲 0.1~100 ng/mL の 8 つのキャリブレーションサンプルをアセトニトリルで調製しました。

サンプル前処理

果物および野菜、乾燥したカモミールの花、および緑茶は地元の青果店で購入しました。サンプル前処理は、Agilent BondElut QuEChERS キット (p/n 5982-5650) を使用し、クエン酸緩衝液を使用した公式の QuEChERS メソッド [5] に従って行いました。10 g のホモジナイズした果物および野菜サンプル、または 2 g のカモミールの花または緑茶を 50 mL のプラスチックチューブに計量しました。カモミールの花および緑茶を 10 mL の超純水で湿ら

せました。手で激しく振り混ぜ、すべてのサンプルを 10 mL のアセトニトリルで 1 分間抽出しました。レモンホモジネートだけは、後に 600 μL の 5 M 水酸化ナトリウム溶液を加えて中和しました。4 g の無水 MgSO_4 、1 g の NaCl 、1.5 g の緩衝液用クエン酸塩が含まれる抽出塩パッケージを相分離用に各チューブに加えしました。チューブを再度 1 分間手で振りまきました。サンプルチューブを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

150 mg の 1 級-2 級アミン (PSA) と 15 mg のグラファイトカーボンブラック (GCB) がサンプルのクリーンアップ用に、900 mg の MgSO_4 が水の除去用に含まれる Agilent BondElut QuEChERS EN 分散 SPE チューブ (p/n 5982-5256) に上澄みのアセトニトリル層 6 mL を移しました。チューブに蓋をして 1 分間攪拌しました。その後、チューブを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。透明な抽出物をガラスバイアルに移動し、抽出物 1 mL に対して 10 μL の 5% ギ酸アセトニトリル溶液を加え、対象農薬の安定性を向上させました。

再現性とマトリックス効果を評価するために、ブランクのトマト、生姜、レモン、緑茶、およびカモミールサンプルを抽出し、必要な量の最終農薬混合物を最終 QuEChERS 抽出物に加えることで、マトリックスマッチ標準を 3 つの濃度レベルで調製しました。マトリックスマッチ標準は注入直前に調製し、5 回のテクニカルレプリケートで測定しました。

実験装置

Agilent 1290 Infinity バイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)、Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C) で構成される Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用して分離を行いました。Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン源を備えた Agilent G6460A トリプル四重極 LC/MS システムに UHPLC システムを組み合わせた。データの取り込みおよび分析には MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。

メソッド

1290 Infinity UHPLC の条件を表 1 にまとめ、G6460A トリプル四重極のパラメータを表 2 および表 3 にまとめました。正イオンエレクトロスプレーイオン化を使用し、化合物ごとに 2 つの主トランジションを使用するダイナミック MRM モードと、2 つの主トランジションおよび最大 8 個の確認イオンを使用するトリガ MRM モードで分析を実施しました。トリガとして設定したしきい値を主トランジション (通常は定量イオン) が超えたときに、確認イオンを 5 回の取り込みサイクルで測定しました。しきい値は化合物に固有のもので、最も低い標準溶液濃度の 50 % に設定しました。妨害ピークが出現したときに複数のトリガが可能に

表 1. UHPLC のパラメータ

UHPLC カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、 2.1 × 150 mm、1.8 μm (p/n 959758-902)、30 °C	
移動相	A:0.1 % ギ酸 + 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 B:0.1 % ギ酸 + 5 mM ギ酸アンモニウム メタノール溶液	
グラジエント プログラム	分	%B
	0	5
	0.5	5
	3	40
	17	100
	19	100
	19.1	5
	ポストタイム 2 分間	
流量	0.4 mL/min	
注入量	3 μL	

なるように、トリガ幅を MRM クロマトピークのベース幅に設定しました。また、トリガエントランス及びトリガディレイは設定しませんでした。農薬 MRM データベースキット (p/n G1733AA) を使用して、このメソッドの 2 つの主トランジションと条件を設定しました [6]。Mass Hunter Optimizer ソフトウェアを使用し、トリガ MRM メソッドで確認イオンとして用いる追加のトランジションを農薬ごとに最適化しました。ダイナミック MRM メソッドは主トランジションから自動的に作成し、トリガ MRM モードをオン、オフで測定しました。調査した全農薬の主トランジションと追加の確認イオンの数を表 5 にまとめます。

表 2. ダイナミック MRM モードで動作させた Agilent G6460A トリプル四重極のパラメータ

イオン化モード	Agilent Jet Stream を使用した ポジティブ ESI
スキャンタイプ	ダイナミック MRM
ガス温度	300 °C
ガス流量	9 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	+4,000 V
ノズル電圧	0 V
サイクル時間	800 ms
MRM の総数	240
同時 MRM の最大数	36
最小デュエルタイム	18.72 ms
最大デュエルタイム	396.5 ms

表 3. トリガ MRM モードで動作させた Agilent G6460A トリプル四重極のパラメータ

イオン化モード	Agilent Jet Stream を使用した ESI ポジティブ
スキャンタイプ	トリガ MRM を 5 回繰り返し
ガス温度	300 °C
ガス流量	9 L/min
ネブライザ圧力	35 psi
シースガス温度	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリ電圧	+4,000 V
ノズル電圧	0 V
サイクル時間	800 ms
MRM の総数	818
同時 MRM の最大数	117
最小デュエルタイム	3.34 ms
最大デュエルタイム	196.5 ms

結果と考察

トリガ MRM データベースおよびライブラリの開発

ほとんどの市販 MRM データベースや、パブリックドメインの農薬に関する MRM 採取条件に含まれる主要トランジションは、通常は 2 つだけです。トリガ MRM の価値は、1 つの化合物に複数の MRM トランジションを使用できる点と、最適条件で測定したトランジションを含むスペクトルライブラリを使用できる点にあります。この実験の大部分は、300 を超える農薬が含まれるトリガ MRM データベースとライブラリの開発に当てられました。Mass Hunter Optimizer ソフトウェアを使用し、すべての MRM トランジションを化合物ごとに最適化しました。プリカーサおよびプロダクトイオンに加えて、フラグメンタ電圧およびコリジョンエネルギーも、1 つの対象化合物溶液を UHPLC-MS/MS システムにフローインジェクションすることにより最適化しました。標準構成では、Optimizer は、1 つの化合物あたり最も存在量の多い

フラグメントから上位 4 つを自動的に最適化します。プロダクトイオンスペクトルで、最も存在量の多いフラグメントに対して強度が 5 % 以上高いフラグメントがさらに観察された場合は、Optimizer の 2 回目の測定で追加のフラグメントを最適化しました。0、15、30、45、および 60 eV のコリジョンエネルギーで衝突誘起解離 (CID) により生成されたナプロパミドのスペクトル全体を図 1 に示します。円の印が付いたフラグメントは Optimizer アルゴリズムにより自動的に選択されたもので、三角の印が付いたフラグメントは Optimizer の 2 回目の実験で最適化されたものです。

最適化されたトランジションは、最終的に 300 を超える農薬の 2,000 を超えるトランジションと条件が含まれる Optimizer データベースに保存されました。各化合物のフラグメンテーションの動作に応じて、トリガ MRM データベースには、農薬 1 種類あたり 2~10 個のフラグメントのトランジションと条件が含まれます。

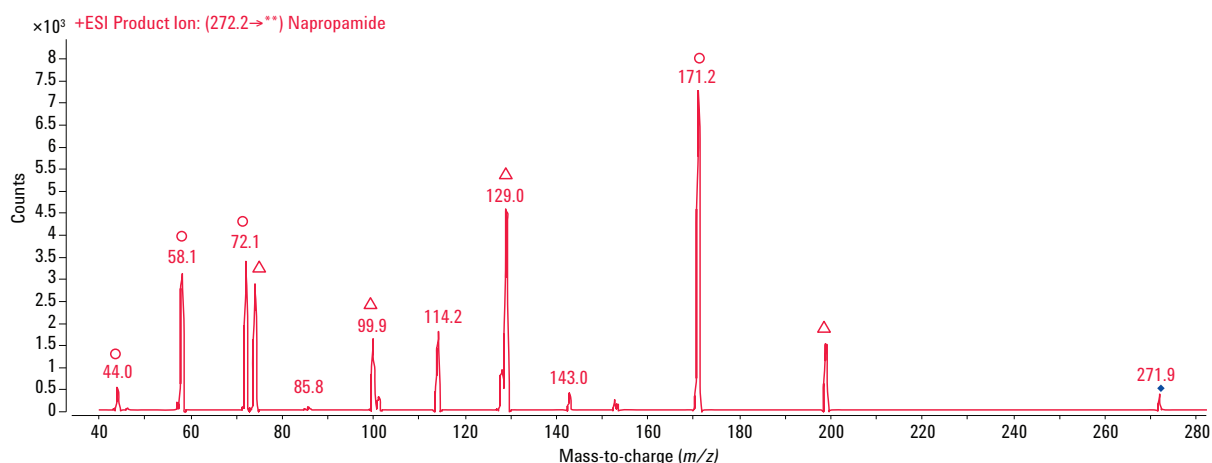


図 1. 0、15、30、45、および 60 eV のコリジョンエネルギーで測定したナプロパミドの CID スペクトル全体。円の印が付いたフラグメントは最初の最適化実験で最適化されたもので、三角の印が付いたフラグメントは 2 回目の実験で最適化されたものです。

これらの最適化された条件を、トリガ MRM スペクトルライブラリの作成に適用しました。スペクトルは、100 ng/mL の濃度まで希釈した 8 つの農薬サブ混合液について、表 1 および 3 で指定した UHPLC および Agilent Jet Stream 条件を使用して測定しました。Mass Hunter Quantitative Analysis ソフトウェアを使用することで、トリガ MRM ライブラリにスペクトルを容易に加えることができました。このライブラリは、スペクトルを名前、CAS 番号、分子式、分子量、および分子構造とともに表示する Library Editor で参照できます (例を図 2 に示す)。

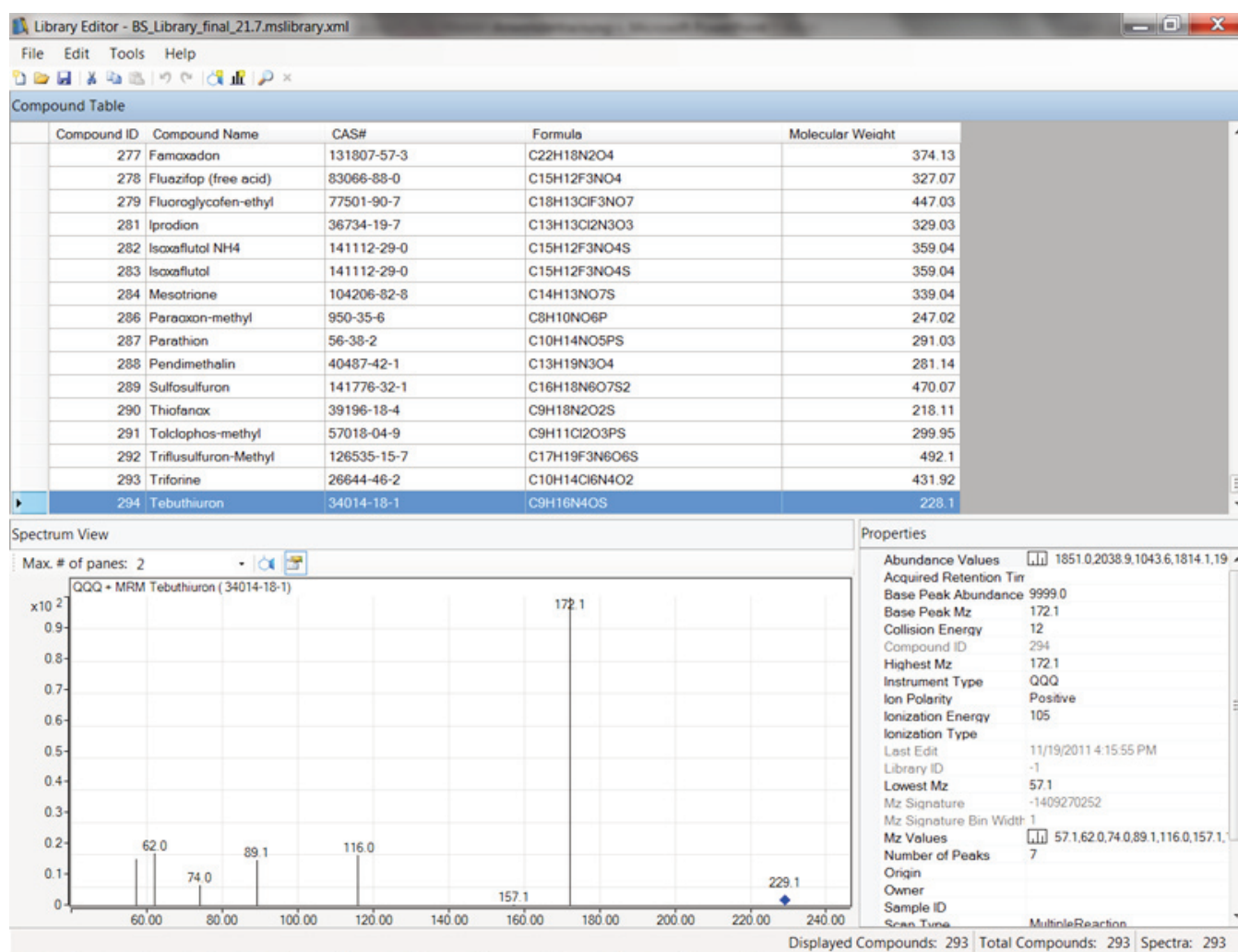


図 2. 正イオンモード ESI で測定したテブチウロンのトリガ MRM ライブラリの一部とトリガ MRM スペクトルを表示した Mass Hunter Quantitative Analysis Library Editor

トリガ MRM 測定メソッドの設定および最適化

EUにおいて重要性の高い120の関連農薬について、UHPLCおよびトリガMRM測定を用いた分析メソッドを設定しました。同一質量のトランジションを有する農薬を完全に分離するように分離条件を最適化し、対象化合物の強度が最大になるようにAgilent Jet Streamのパラメータを最適化しました。化合物に応じて[M+H]⁺または[M+NH₄]⁺イオンをプリカーサイオンとして用いました。最も強度の強い上位2つのフラグメントを主トランジションに設定し、定量イオンおよび確認イオンとして予め設定した保持時間幅全体で測定しました。定量用のトランジションは通常、トリガトランジションとして使用し、4~8個の追加のフラグメントイオンのデータ依存トリガのしきい値は、最も低いキャリブレーションサンプルの50%強度に相当する100~5,000カウントのしきい値として化合物毎に設定しました。このアプローチでは、最小限の添加レベルの場合でも、様々なマトリックスサンプルのほとんどの化合物についてプロダクトイオンスペクトルを測定することができます。

120を超える農薬を10 µg/kgの濃度で添加し、2つの主トランジションと最大で8つの追加の確認トランジション(図に示していない)を使用して測定したレモン抽出物のクロマトグラムを図3に示します。

主トランジションはモニターしている保持時間幅全体で測定し、定量に使用しましたが、追加のトランジションは、トリガトランジションの強度が指定のしきい値を超えたときに、指定された回数だけ繰り返して測定しました。トリガMRMはダイナミックMRMアルゴリズムの一部として管理されるため、主トランジションの一定のサイクルタイムが一貫して維持されます。したがって、追加のトランジションの測定によって定量イオンまたは確認イオンのピーク形状が劣化することも、イオン強度が影響を受けることもありません。

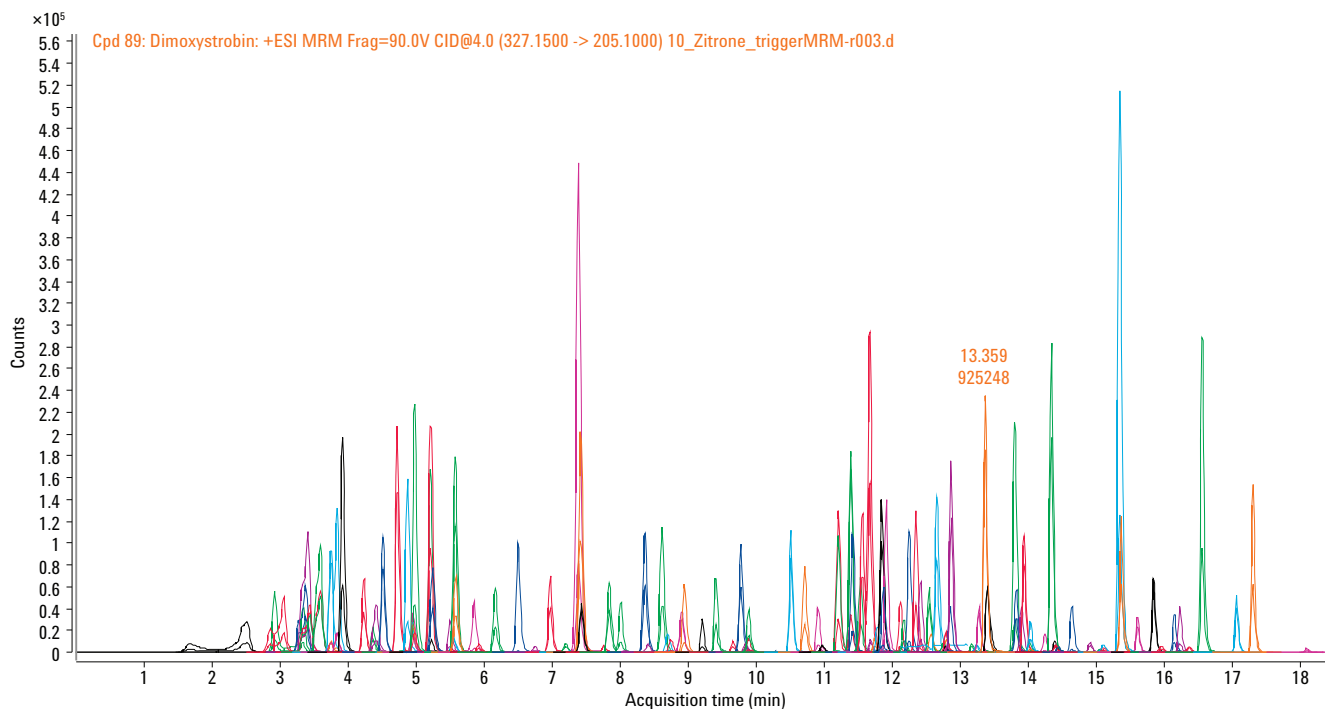


図3. 10 µg/kg に対応する濃度でレモン抽出物に添加し、トリガMRMで測定した120種類の農薬の1次トランジションのクロマトグラム。

1 µg/kg の濃度でレモン抽出物に添加し、トリガ MRM メソッドを使用して測定したナプロパミドのスムージングしていない MRM クロマトグラムを図 4A に示します。ナプロパミドは、34 個の主トランジションと、ピーク最上部で測定される 86 個の確認イオンとともにクロマトグラムの最も密集した領域で溶出しますが、定量イオンと最初の確認イオンのピーク形状は影響を受けません。レモンの最大残留限界値 (MRL) の 50 分の 1 の濃度においても、2 つの主トランジションについて観察された面積比は予想値と良好に一致していました。添加濃度 1、10、および 100 µg/kg でレモン抽出物に含まれるナプロパミドのトリガ MRM スペクトルを図 4B に示します。さまざまな濃度レベルを通じてフラグメントのスペクトル内比はきわめて再現性が高く、5 回の繰り返し注入で RSD は 5 % を大きく下回っていました。したがって、最も低い添加レベルについても、90 を超えるリファレンスライブラリのマッチスコアが観察されました。これは、今

回の測定に含まれる他のいくつかの農薬についても確認されました。トリガ MRM を用いて測定した結果、非常に低い濃度においても高い品質を維持したスペクトルは、各トランジションで最適化されたコリジョンエネルギーと十分に長いデュエルタイムを使用するためにイオンの取り込み量が向上した結果実現したものです。

標準的なダイナミック MRM では、トランジションの平均デュエルタイムはサンプルが異なっていても一定です。データ依存トリガをメソッドに追加すると、確認イオンをトリガしたときに主トランジションのデュエルタイムが短くなります。これは、さまざまなサンプルまたは標準溶液で異なることがあります。平均デュエルタイムのこのような違いがピーク面積に反映されないようにし、定量と再現性にマイナスの影響を与えないようにすることが非常に重要です。

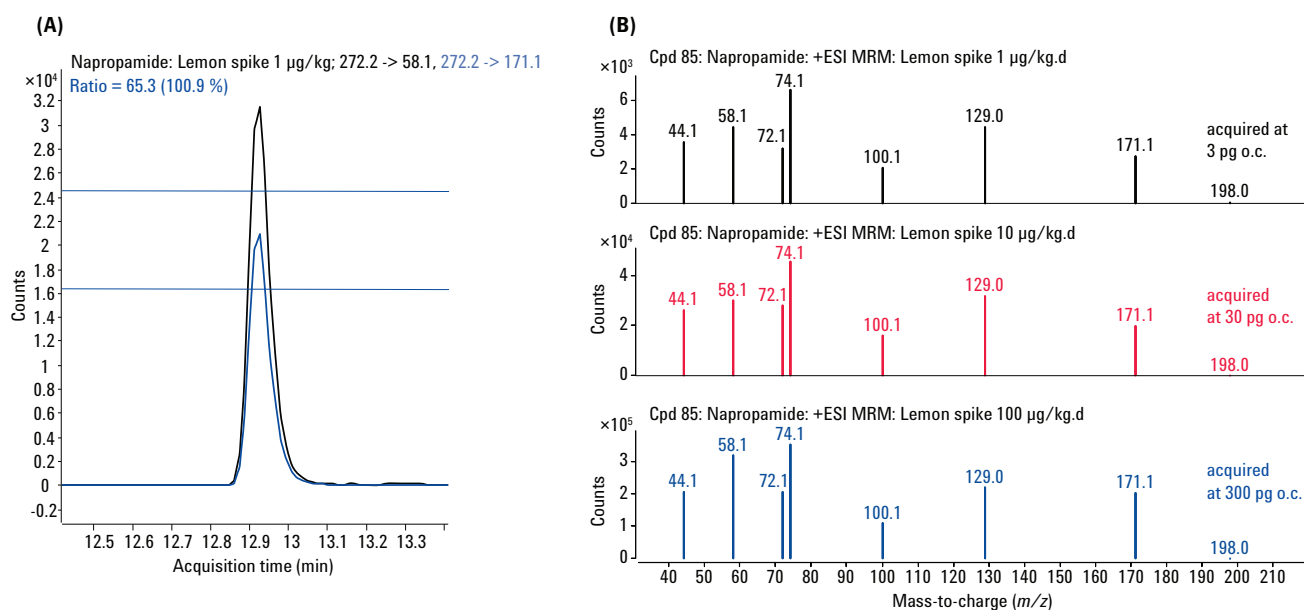


図 4. ナプロパミドを濃度 1 µg/kg でレモン抽出物に添加したときの 1 次トランジションの MRM クロマトグラム (A) と、ナプロパミドを濃度 1 (黒)、10 (赤)、および 100 µg/kg (青) で添加したときのトリガ MRM スペクトル (B)。

これを示すために、ダイナミック MRM メソッドを、複雑な標準溶液の系でトリガ MRM メソッドと比較しました (最も厳しい条件下の結果を表すため)。農業に関する EURL の "Check-your-Scope" リストのランキングで順位が高い農薬、オキサミルをダイナミック MRM (A) とトリガ MRM (B) で測定したときの検量線を図 5 に示します。ダイナミック MRM メソッドでのオキサミルのトランジションの平均デュエルタイムは 44 ms でした。これに対し、トリガ MRM メソッドでのオキサミルの主トランジションのデュエルタイムはわずか 12 ms でした。これは、共溶

出するすべての対象農薬のプロダクトイオンスペクトルがこのピークの間トリガされたからです。これにもかかわらず、検量線の相関係数は非常に近い値を示しました。

ダイナミック MRM とトリガ MRM で測定したすべての対象農薬の傾きを図 6 で比較します。いずれの測定モードでも、傾き 0.9987、相関係数 $R^2 = 0.9975$ と、検量線は高い相関関係を示しています。これは、両方の測定モードのピーク面積が、すべての濃度レベルで、また感度が異なる化合物で類似していることを示します。

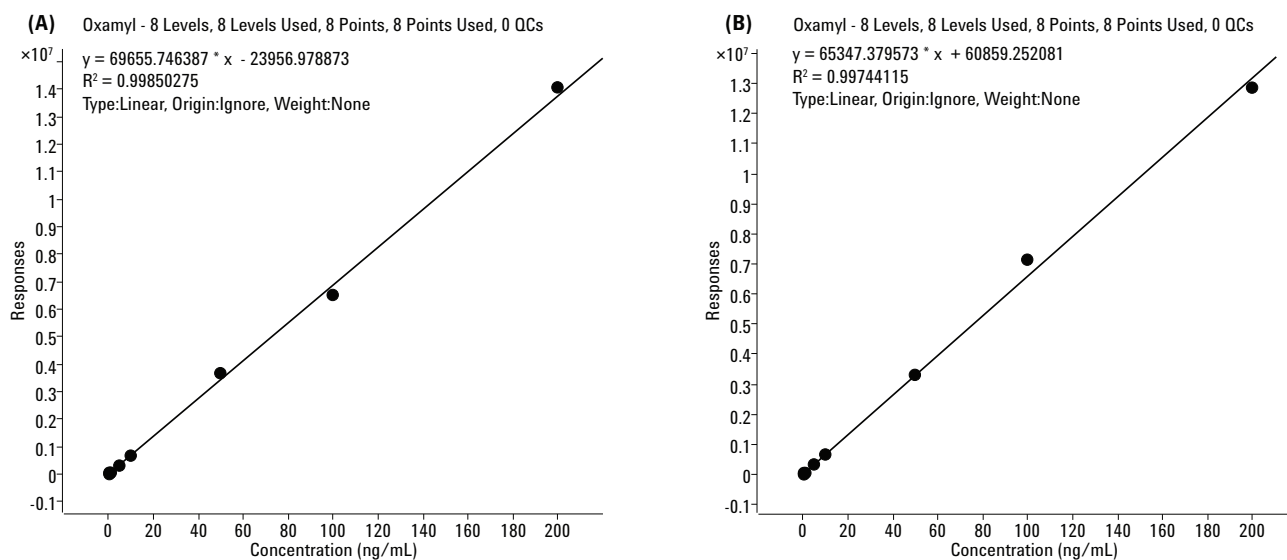


図 5. ダイナミック MRM (A) およびトリガ MRM (B) を使用して測定した農薬、オキサミルの検量線

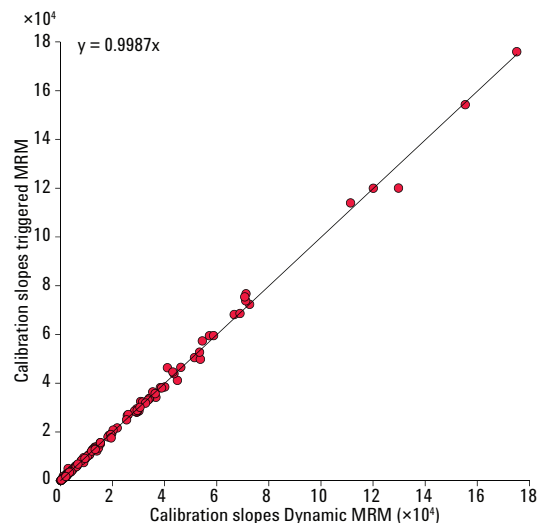


図 6. メソッドに含まれるすべての農薬のトリガ MRM とダイナミック MRM の検量線の傾きの比較。7 ポイント検量線の直線範囲を化合物ごとに選択し、両方の測定モードで等しいキャリブレーションポイントを比較しました。

全体の対象化合物の 97 % で傾きの偏差が 20 % を下回るため、トリガ MRM を使用して測定したサンプルを、ダイナミック MRM で得られたキャリブレーションに基づいて定量することができます。

さまざまなマトリックスに含まれる農薬の定量に使用するトリガ MRM の社内検証

直線範囲、定量下限、再現性の確認を行うことでメソッドの特性を評価しました。トマト、生姜、カモミール、緑茶、およびレモンを農薬で添加した QuEChERS 前処理 抽出物についてマトリックス効果を評価しました。ガイドライン SANCO/12495/2011 に基づいて検証実験を実施し、評価しました。

トリガ MRM メソッドの LOQ は、定量イオントランジションの 10:1 の S/N 比 (信号の高さに基づくピークツーピークノイズアルゴリズム) から得られたもので、すべての対象化合物で 5 µg/kg 未満でした。100 を超える化合物群においてはすべての作物マトリックスで 1 µg/kg を大きく下回る濃度で、定量が可能でした。図 7 に、標準溶液とレモン抽出物の LOQ のヒストグラムを示します。予想どおり、レモンマトリックスの LOQ は、マトリックス効果によりわずかに高くなりました。生姜、緑茶、およびカモミールマトリックスについても類似した分布が観察されました。

3 つの異なる濃度レベルですべてのマトリックスについて再現性を測定したところ (n = 5)、マトリックスにかかわらず、1 µg/kg に対応する添加レベルですべての化合物の 80 % の相対標準偏差が 5 % を下回りました。レモンマトリックスでも、この濃度において、すべての化合物の 95 % が 20 % 未満の相対標準偏差を示し、SANCO ガイドラインに従って正しく検証することができました。

マトリックスによる抑制および増長の評価は、標準溶液中の対象化合物のイオン強度を、標準液を添加したサンプル抽出物のイオン強度と比較することにより行いました。作物に応じて、最大で 90 % の対象化合物がマトリックス効果の影響を受けました。最初にイオン化抑制が観察されましたが、生姜マトリックスでは、10 % を超える対象化合物が、標準溶液のイオン強度に対して 120 % を超えるイオン化増長を示しました。マトリックススマッチキャリブレーションを使用すると、各マトリックスの対象化合物の正確な定量を実行できました。

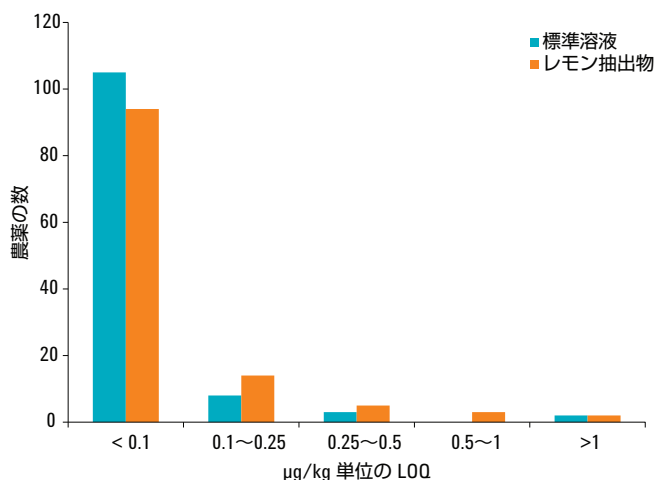


図 7. 標準溶液および添加したレモン抽出物に含まれる 120 種類の評価済み農薬の LOQ。結果を 5 つの対応する濃度範囲に分類し、ヒストグラムとして示します。

実際のサンプルの分析

同一のプリカーサとフラグメント、類似した保持時間など、天然化合物が対象農薬と非常に高い類似性を示す複数のマトリックスと農薬の組み合わせが検証時に観察されました。単一の確認/定量イオン比を使用する場合、特に LC を高速分析条件にした場合には、これが誤検出の原因となることがあります。トリガ MRM を使用することの主な利点は、化合物スペクトルをリファレンスライブラリに保存されたスペクトルと比較することにより、化合物の明確な検証が可能になることです。

カモミールの花の QuEChERS 抽出物に含まれる天然化合物のクロマトグラムとトリガ MRM スペクトルを図 8 に示します (A)。これは、標準溶液中の除草剤、テブチウロン (10 ng/mL) に類似した保持時間と確認イオン/定量イオン比を持っています (B)。トリガ MRM スペクトルをリファレンスライブラリスペクトルと比較して示します。キャリブレーションサンプル (B) のスペクトルは完全な一致を示し、その結果マッチスコアは 100.0 になりますが、カモミールの構成成分 (A) のフラグメントスペクトルは、定量トランジションと比べて、低質量フラグメント 57.1、62.0、74.0、89.1 では低い存在量 (赤い矢印) を示し、フラグメント 116.0 および 157.1 では高い存在量 (緑の矢印) を示します。

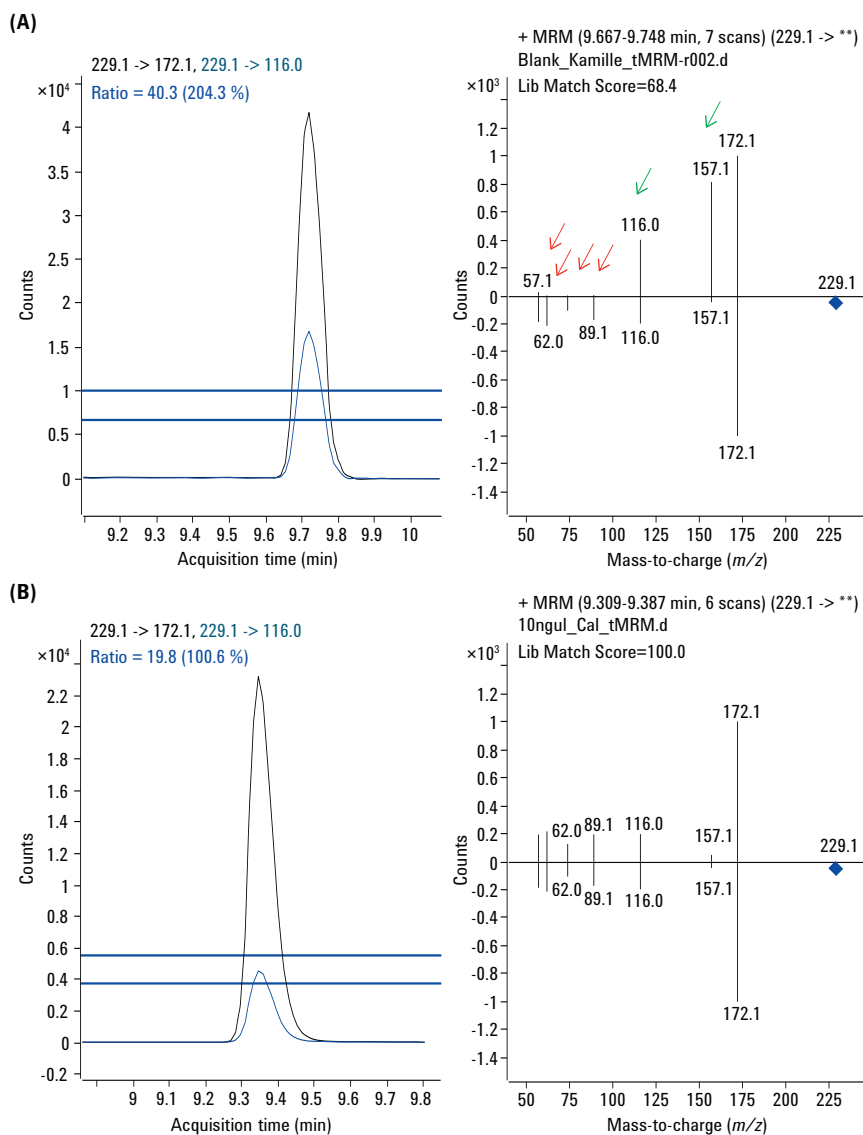


図 8. 天然のカモミールの構成成分 (A) と除草剤であるテブチウロン (B) のクロマトグラムおよびトリガ MRM スペクトル。スペクトルを、テブチウロンのリファレンスライブラリスペクトルと比較して示します。

得られたマッチスコアはわずか 68.4 でした。検証結果から、偽陽性を回避するには 75.0 (最大で 100.0) を超えるマッチスコアが必要であることがわかりました。

この追加の定性フィルタがないと、カモミール抽出物のこのようなピークがいつかはテブチウロンと誤認される危険があります。この例では、デフォルトの MRL、0.01 mg/kg を大きく上回る 0.67 mg/kg の結果が生じる可能性があります。

テスト対象となるマトリックスと農薬の組み合わせでは、カモミール抽出物中のテブチウロンを示すこの例は、共溶出マトリックスが農薬のように見えるいくつかのケースの 1 つにすぎません。これらの作物を、疑われる対象化合物や観察されるライブラリマッチスコアとともに表 4 にまとめました。LC の高速分析条件においては、これらの共溶出が偽陽性を引き起こすことがあります。偽陽性の検出を防ぐには、プロダクトイオンスペクトルや最小限必要なリファレンスライブラリマッチスコアなどの追加情報が役立ちます。

表 4. 対象農薬と高い類似性を示すマトリックス化合物のリファレンスライブラリマッチスコア

農薬	マトリックス	リファレンスライブラリマッチスコア	
		対象化合物	共溶出マトリックス
ジクロルボス	レモン	94.5 %	78.1 %
チフェンスルフロンメチル	緑茶	96.6 %	71.5 %
テブフェンピラド	生姜	99.8 %	55.9 %
テブチウロン	カモミール	97.8 %	58.0 %
イマザリル	カモミール	99.8 %	58.1 %
テルブチラジン	カモミール	99.6 %	82.1 %

表 5. トリガ MRM メソッドに含まれる主トランジションと追加の確認イオンの数

化合物名	CAS 番号	プリカーサ化学種	主トランジション	追加の確認イオン
アセフェート	30560-19-1	[M+H] ⁺	184.0 → 143.0; 184.0 → 49.1	6
アセタミプリド	135410-20-7	[M+H] ⁺	223.0 → 126.0; 223.0 → 90.1	4
アクロニフェン	74070-46-5	[M+H] ⁺	265.0 → 182.1; 265.0 → 218.0	5
アルジカルブ	116-06-3	[M+NH ₄] ⁺	208.1 → 116.2; 208.1 → 89.1	7
アルジカルブスルホン	1646-88-4	[M+H] ⁺	223.0 → 86.1; 223.0 → 76.1	7
アルジカルブスルホキシド	1646-87-3	[M+H] ⁺	207.1 → 131.9; 207.1 → 89.1	7
アロキシジム	55634-91-8	[M+H] ⁺	324.2 → 178.1; 324.2 → 234.1	6
アミドスルフロ	120923-37-7	[M+H] ⁺	370.0 → 261.1; 370.0 → 218.1	4
アミトラス	33089-61-1	[M+H] ⁺	294.2 → 163.1; 294.2 → 122.1	5
アジンホスエチル	2642-71-9	[M+H] ⁺	346.0 → 77.0; 346.0 → 132.2	6
ビフェナゼート	149877-41-8	[M+H] ⁺	301.1 → 198.2; 301.1 → 170.1	6
ビスピリバック	125401-75-4	[M+H] ⁺	431.1 → 275.1; 431.1 → 413.1	6
ビテルタノール	55179-31-2	[M+H] ⁺	338.2 → 99.1; 338.2 → 269.1	5
ブロマシル	314-40-9	[M+H] ⁺	261.0 → 205.0; 261.0 → 187.9	4
ブトカルボキシム	34681-10-2	[M+NH ₄] ⁺	208.1 → 116.1; 208.1 → 75.0	7
ブトカルボキシムスルホキシド	34681-24-8	[M+H] ⁺	207.1 → 132.0; 207.1 → 75.0	4
ブトキシカルボキシム	34681-23-7	[M+H] ⁺	223.0 → 106.1; 223.0 → 166.1	6
ブツロン	3766-60-7	[M+H] ⁺	237.1 → 84.1; 237.1 → 53.1	6
カズサホス	95465-99-9	[M+H] ⁺	271.1 → 159.0; 271.1 → 97.0	5
カルバリル	63-25-2	[M+H] ⁺	202.1 → 145.1; 202.1 → 127.1	6
カルベンダジム	10605-21-7	[M+H] ⁺	192.1 → 160.1; 192.1 → 105.0	5
カルボスルファン	55285-14-8	[M+H] ⁺	381.2 → 118.1; 381.2 → 76.0	5
クロルフルアズロン	71422-67-8	[M+H] ⁺	539.9 → 158.0; 539.9 → 383.0	4
クロリダゾン	1698-60-8	[M+H] ⁺	222.0 → 77.0; 222.0 → 87.9	6
クロルスルフロ	64902-72-3	[M+H] ⁺	358.0 → 141.1; 358.0 → 167.0	5
クロマゾン	81777-89-1	[M+H] ⁺	240.1 → 223.1; 240.1 → 44.1	6
シヘキサチン	13121-70-5	[M+H-H ₂ O] ⁺	369.2 → 205.0; 369.2 → 287.0	2
シモキサニル	57966-95-7	[M+H] ⁺	199.1 → 128.0; 199.1 → 110.9	2
DEET	134-62-3	[M+H] ⁺	192.1 → 91.1; 192.1 → 119.0	4
デスメディファム	13684-56-5	[M+NH ₄] ⁺	318.1 → 182.1; 318.1 → 108.0	8
ジクロルボス	62-73-7	[M+H] ⁺	221.0 → 109.0; 221.0 → 127.0	3
ジクロホップメチル	51338-27-3	[M+NH ₄] ⁺	358.1 → 281.0; 358.1 → 120.0	6
ジクロトホス	3735-78-3	[M+H] ⁺	238.1 → 72.1; 238.1 → 112.1	6
ジフルベンズロン	35367-38-5	[M+H] ⁺	311.0 → 158.0; 311.0 → 141.0	2
ジメトアート	60-51-5	[M+H] ⁺	230.0 → 125.0; 230.0 → 198.8	4
ジモキシストロビン	149961-52-4	[M+H] ⁺	327.2 → 205.1; 327.2 → 116.0	4
ジニコナゾール	83657-24-3	[M+H] ⁺	326.1 → 70.0; 326.1 → 159.0	7
N,N-ジメチル-N'-フェニルスルファミド (DMSA)	4710-17-2	[M+H] ⁺	201.0 → 92.1; 201.0 → 65.1	5
O-エチル O-(4-ニトロフェニル) P-フェニルホスホノチオエート (EPN)	2104-64-5	[M+H] ⁺	324.0 → 156.9; 324.0 → 296.1	5
エチオフェンカルブ	29973-13-5	[M+H] ⁺	226.1 → 107.0; 226.1 → 77.0	5
エチオフェンカルブスルホン	53380-23-7	[M+H] ⁺	258.0 → 201.0; 258.0 → 106.9	6
エチオフェンカルブスルホキシド	53380-22-6	[M+H] ⁺	242.1 → 185.0; 242.1 → 107.0	6

表 5. トリガ MRM メソッドに含まれる主トランジションと追加の確認イオンの数 (続き)

化合物名	CAS 番号	ブリーカー化学種	主トランジション	追加の確認イオン
エチオン	563-12-2	[M+H] ⁺	385.0 → 199.1; 385.0 → 142.8	6
エチリモール	23947-60-6	[M+H] ⁺	210.2 → 140.1; 210.2 → 43.1	6
エトフメサート	26225-79-6	[M+NH ₄] ⁺	304.1 → 121.1; 304.1 → 161.2	5
エトフェンブロックス	80844-07-1	[M+NH ₄] ⁺	394.2 → 177.3; 394.2 → 107.1	2
フェナザキン	120928-09-8	[M+H] ⁺	307.2 → 57.1; 307.2 → 161.1	5
酸化フェンブタスズ	13356-08-6	[M+H·C ₃₀ H ₄₀ SnO] ⁺	519.2 → 91.1; 519.2 → 196.9	6
フェンヘキサミド	126833-17-8	[M+H] ⁺	302.1 → 97.1; 302.1 → 55.1	4
フェノブカルブ	3766-81-2	[M+H] ⁺	208.1 → 95.0; 208.1 → 77.1	3
フェンピロキシメート	111812-58-9	[M+H] ⁺	422.2 → 366.2; 422.2 → 107.0	6
フルオピコリド	239110-15-7	[M+H] ⁺	382.9 → 172.9; 382.9 → 144.9	6
フルロキシピル	69377-81-7	[M+H] ⁺	255.0 → 209.1; 255.0 → 181.1	7
フルルタモン	96525-23-4	[M+H] ⁺	334.1 → 178.1; 334.1 → 247.1	6
ホルモチオン	2540-82-1	[M+H] ⁺	258.0 → 199.0; 258.0 → 125.0	5
フベリダゾール	3878-19-1	[M+H] ⁺	185.1 → 157.1; 185.1 → 156.0	6
ヘキサコナゾール	79983-71-4	[M+H] ⁺	314.1 → 70.1; 314.1 → 159.0	7
ヘキシチアゾックス	78587-05-0	[M+H] ⁺	353.1 → 168.1; 353.1 → 227.9	4
イマザリル	35554-44-0	[M+H] ⁺	297.1 → 159.0; 297.1 → 201.0	6
インドキサカルブ	144171-61-9	[M+H] ⁺	528.1 → 150.0; 528.1 → 203.0	6
イブコナゾール	125225-28-7	[M+H] ⁺	334.1 → 70.0; 334.1 → 125.0	4
イブロジオン	36734-19-7	[M+H] ⁺	330.0 → 245.0; 330.0 → 56.1	4
メパニピリム	110235-47-7	[M+H] ⁺	224.1 → 77.0; 224.1 → 42.1	5
メソトリオン	104206-82-8	[M+H] ⁺	340.0 → 228.0; 340.0 → 104.0	3
メタミトロン	41394-05-2	[M+H] ⁺	203.1 → 77.0; 203.1 → 175.1	4
メタミドホス	10265-92-6	[M+H] ⁺	142.0 → 94.0; 142.0 → 125.0	5
メチオカルブ	2032-65-7	[M+H] ⁺	226.1 → 121.1; 226.1 → 169.0	6
メチオカルブスルホン	2179-25-1	[M+H] ⁺	258.0 → 122.0; 258.0 → 201.1	7
メチオカルブスルホキシド	2635-10-1	[M+H] ⁺	242.1 → 185.1; 242.1 → 122.1	7
メソミル	16752-77-5	[M+H] ⁺	163.1 → 88.0; 163.1 → 106.0	3
メトキシフェノジド	161050-58-4	[M+H] ⁺	369.2 → 149.0; 369.2 → 313.1	6
メトキシロン	19937-59-8	[M+H] ⁺	229.0 → 72.1; 229.0 → 46.1	5
モノクロトホス	6923-22-4	[M+H] ⁺	224.1 → 127.0; 224.1 → 193.0	6
モニュロン	150-68-5	[M+H] ⁺	199.1 → 72.0; 199.1 → 46.1	2
ミクロブタニル	88671-89-0	[M+H] ⁺	289.1 → 70.1; 289.1 → 125.1	2
ナプロパミド	15299-99-7	[M+H] ⁺	272.2 → 58.1; 272.2 → 171.1	5
ネブロン	555-37-3	[M+H] ⁺	275.1 → 88.1; 275.1 → 57.1	5
オフレース	58810-48-3	[M+H] ⁺	282.0 → 160.1; 282.0 → 148.1	6
オメトエート	1113-02-6	[M+H] ⁺	214.0 → 125.0; 214.0 → 109.0	5
オキサミル	23135-22-0	[M+NH ₄] ⁺	237.1 → 72.0; 237.1 → 90.0	4
フェンメディファム	13684-63-4	[M+NH ₄] ⁺	318.1 → 136.0; 318.1 → 168.0	8
ホレート	298-02-2	[M+H] ⁺	261.0 → 75.1; 261.0 → 199.0	3
ホサロン	2310-17-0	[M+H] ⁺	368.0 → 182.0; 368.0 → 110.9	3
ホスメット	732-11-6	[M+H] ⁺	318.0 → 160.0; 318.0 → 133.0	8
ホスファミドン	13171-21-6	[M+H] ⁺	300.0 → 127.1; 300.0 → 174.1	6
ピペロニルブトキシド	51-03-6	[M+NH ₄] ⁺	356.2 → 177.1; 356.2 → 119.1	2

表 5. トリガ MRM メソッドに含まれる主トランジションと追加の確認イオンの数 (続き)

化合物名	CAS 番号	ブリーカーサ化学種	主トランジション	追加の確認イオン
ピリミカルブ	23103-98-2	[M+H] ⁺	239.2 → 72.1; 239.2 → 182.1	4
ピリミカルブ、デスメチル	30614-22-3	[M+H] ⁺	225.1 → 72.1; 225.1 → 168.1	5
ピリミフォスメチル	29232-93-7	[M+H] ⁺	306.2 → 108.1; 306.2 → 164.1	4
プロパモカルブ	24579-73-5	[M+H] ⁺	189.2 → 102.0; 189.2 → 144.0	2
プロパルギット	2312-35-8	[M+NH ₄] ⁺	368.1 → 231.2; 368.1 → 175.2	3
プロポスキル	114-26-1	[M+H] ⁺	210.1 → 168.1; 210.1 → 153.1	5
プロキナジド	189278-12-4	[M+H] ⁺	373.0 → 331.0; 373.0 → 289.0	6
ピメトロジン	123312-89-0	[M+H] ⁺	218.1 → 105.0; 218.1 → 51.0	2
ピリフェノックス	88283-41-4	[M+H] ⁺	295.0 → 93.0; 295.0 → 66.1	4
ピリメタニル	53112-28-0	[M+H] ⁺	200.1 → 82.0; 200.1 → 106.9	8
ピロックススラム	422556-08-9	[M+H] ⁺	435.1 → 195.1; 435.1 → 124.1	4
キザロホップエチル	76578-14-8	[M+H] ⁺	373.1 → 271.2; 373.1 → 255.1	6
リムスルフロソ	122931-48-0	[M+H] ⁺	432.1 → 182.0; 432.1 → 324.9	6
ロテノン	83-79-4	[M+H] ⁺	395.0 → 213.1; 395.0 → 192.1	6
スピノサド (スピノシン A)	131929-60-7	[M+H] ⁺	732.5 → 142.1; 732.5 → 98.1	4
スピロテトラマト	203313-25-1	[M+H] ⁺	374.2 → 216.1; 374.2 → 302.2	6
スピロキサミン	118134-30-8	[M+H] ⁺	298.3 → 144.1; 298.3 → 100.1	3
スルホスルフロソ	141776-32-1	[M+H] ⁺	471.0 → 211.0; 471.0 → 261.0	5
テブフェンピラド	119168-77-3	[M+H] ⁺	334.2 → 117.0; 334.2 → 145.0	7
テブチウロン	34014-18-1	[M+H] ⁺	229.1 → 172.1; 229.1 → 116.0	5
テルブチラジン	5915-41-3	[M+H] ⁺	230.1 → 174.1; 230.1 → 104.0	4
テトラコナゾール	112281-77-3	[M+H] ⁺	372.0 → 70.0; 372.0 → 159.0	5
チアベンダゾール	148-79-8	[M+H] ⁺	202.0 → 175.0; 202.0 → 131.0	6
チアクロプリド	111988-49-9	[M+H] ⁺	253.0 → 126.0; 253.0 → 186.0	3
チアメトキサム	153719-23-4	[M+H] ⁺	292.0 → 211.1; 292.0 → 181.1	4
チフェンスルフロソメチル	79277-27-3	[M+H] ⁺	388.0 → 167.0; 388.0 → 205.0	5
チオファノックススルホン	39184-59-3	[M+H] ⁺	251.1 → 57.0; 251.1 → 75.9	5
チオファノックススルホキシド	39184-27-5	[M+NH ₄] ⁺	252.1 → 104.0; 252.1 → 57.2	6
トブラメゾン	210631-68-8	[M+H] ⁺	364.1 → 334.1; 364.1 → 125.1	4
トラルコキシジム	87820-88-0	[M+H] ⁺	330.2 → 216.1; 330.2 → 244.1	7
トリクロルホン	52-68-6	[M+H] ⁺	256.9 → 109.0; 256.9 → 221.0	2
トリネキサバックエチル	95266-40-3	[M+H] ⁺	253.1 → 69.1; 253.1 → 207.1	3
トリチコナゾール	131983-72-7	[M+H] ⁺	318.1 → 70.2; 318.1 → 125.2	2
ゾキサミド	156052-68-5	[M+H] ⁺	336.0 → 187.0; 336.0 → 159.0	4

結論

食品製品中に含まれる農薬の同定で発生する偽陽性は、公的なコントロールラボの大きな問題です。2つのMRMトランジションだけを測定した場合には、いくつかの農薬とマトリックスの組み合わせで同定に偽陽性が発生することがあります。このアプリケーションノートでは、トリガMRMと、リファレンススペクトルライブラリでのライブラリ検索を組み合わせることで、偽陽性が発生する可能性を排除できることを示しました。各MRMで最適化されたコリジョンエネルギーを使用し、トランジションごとに十分に長いデュエルタイムを使用することで、非常に低濃度においても、また複雑なマトリックスにおいても、トリガMRMは確実な化合物スペクトルを生成しました。検量線の直線性とすぐれた再現性が、確認のために追加のトランジションを追加しても定量結果が犠牲にならなかったことを示しました。トリガMRMにより、1回の分析で多量の農薬を正確に定量し、確認できるようになりました。1つの主トランジショントリガMRMを使用するだけで、多成分残留分析メソッドの適用範囲を定量および確認トランジションの概念に基づく同定基準を利用した、現在分析可能な化合物数を2倍にまで拡張することができます。

開発したデータベースとライブラリは、トリガMRMライブラリおよびデータベースとしてアジレントから入手することができます。ここでは、600を超える農薬のトランジション、条件、およびスペクトルが含まれ、アジレント製品 p/n G1733CA または p/n G1733BA として提供されています。カラム、包括的な農薬標準、およびアプリケーションサポートも含まれます。

参考文献

- [1] Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009.
- [2] European Guideline SANCO/12495/2011: Method validation and quality control procedures for pesticides residue analysis in food and feed.
- [3] Identification and Quantification of Pesticides in Chamomile and Ginger Extracts Using an Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS system with Triggered MRM, Application Note, Publication number 5990-8460EN.
- [4] Triggered MRM: Simultaneous Quantification and Confirmation Using Agilent Triple Quadrupole LC/MS Systems, Agilent Technical Overview 2011, Publication number 5990-8461EN.
- [5] European Committee for Standardization, EN 15662:2008.
- [6] Agilent トリプル四重極 LC/MS システムを用いたスクリーニングと同定のための農薬用ダイナミック MRM 化合物データベース、技術概要、資料番号 5990-4255JAJP.

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。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 をご覧ください。

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., 2012

Printed in Japan

November 16, 2012

5991-1183JAJP



Agilent Technologies