



# Agilent6495トリプル四重極型 LC/MS を用いた 農薬 161 種の一斉分析法



## 〈要旨〉

dMRM 法を用いたトリプル四重極 LC/MS による農薬 161 種の一斉分析法を開発しました。感度は今回対象とした全食品中において、161 種すべての農薬が 1 ng/mL 濃度で検出が可能でした。また tMRM 法を用いることで、0.1 ng/mL 濃度において 156 農薬の良好なプロダクトイオンスペクトルを取得でき、試料の定性分析に利用できました。

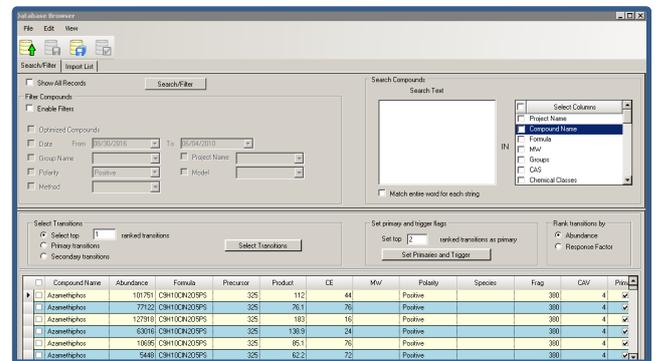
**Key Words:** 農薬、dMRM、tMRM、QuEChERS 法、トリプル四重極 LC/MS

\*\*\*\*\*

## 1. はじめに

平成 15 年の食品衛生法改正に基づき、食品中に残留する農薬、飼料添加物および動物用医薬品について一定の量を超えてこれらが残留する食品等の販売を原則禁止するという制度（ポジティブリスト制度）が施行されました。通知法においても Multiple Reaction Monitor (MRM) 法を用いたトリプル四重極 LC/MS による多成分一斉分析法が指定されています。このアプリケーションノートでは MRM 法を改良したダイナミック MRM (dMRM) 法を用い農薬 161 種の一斉分析をしますので報告いたします。また試料の定性分析にはトリガーMRM (tMRM)法を用いました。

メソッドの最適化だけでなく MRM トランジション、保持時間、組成式等をデータベースとして管理できるため、多成分一斉分析のメソッド開発に有用なソフトウェアです。(図 1 参照)



## 2. 実験条件

装置には Agilent Jet Stream (AJS) イオン源を装着した Agilent 6495 トリプル四重極型 LC/MS を使用しました。LC 分析用カラムには微小粒子径の逆相カラムであるアジレント・テクノロジー製 ZORBAX Eclipse plus C18 RRHD (100 mm, 3.0 mm, 1.8 μm) を使用し、移動相にはメタノール及び 0.5 mM 酢酸アンモニウム水溶液を使用しました。その他分析条件は表 1 に示した通りです。また、161 農薬の dMRM 条件は表 2 に示しました。dMRM および tMRM 条件の最適化には、アジレント・テクノロジー製 Optimizer ソフトウェアを使用しました。Optimizer ソフトウェアは、

農薬を選択

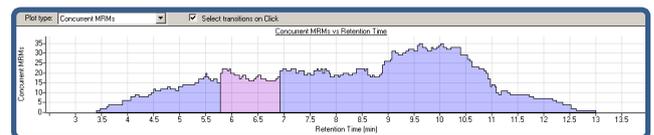


図 1. Optimizer ソフトウェアによる dMRM メソッド作成およびシミュレーション画面

試料にはキャベツ、ジャガイモ、玄米、オレンジ、大豆、リンゴ、ほうれん草を使用し、前処理には QuEChERS 法 (EN) を採用しました。前処理の詳細はア



Agilent Technologies

ジレント・テクノロジーのアプリケーションノート  
LCMS-201108TK-002 に詳細を記載しています。

表 1. トリプル四重極 LC/MS の分析条件

HPLC	: Agilent 1290 Infinity LC
カラム	: ZORBAX Eclipse plus C18 3.0×100mm、1.8 μm、(959758-302)
カラム温度	: 40℃
移動相	: A:0.5mM 酢酸アンモニウム水溶液 : B:メタノール 0%B--(10min)--100%B--(13min)--100%B
流速	: 0.4 mL/min
注入量	: 1 μL
MS	: Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS
イオン化	: Jet Stream (Positive/Negative)
ネプライザガス	: 50psi
ドライガス	: 14L/min at 280℃
シースガス	: 12L/min at 300℃
キャピラリ電圧	: 2500V
ノズル電圧	: 500V
フラグメンタ	: 380V
サンプル	: QuEChERS 法 (EN) で抽出・精製し、アセ トニトリルで 10 倍希釈して注入

表 2. 161 農薬の dMRM 条件

No	農薬名	Transition	CE	極性	RT
1	2,4-D	219.0 → 160.8	8	Negative	6.146
2	4-Chlorophenoxyacetic acid	185.0 → 127.0	16	Negative	4.910
3	Acibenzolar-S-methyl	211.0 → 136.0	32	Positive	8.965
4	Acifluorfen	360.0 → 315.9	8	Negative	7.841
5	Aldicarb	191.1 → 162.1	16	Positive	10.418
6	Aldoxycarb	223.1 → 76.1	4	Positive	3.868
7	Aminocarb	209.1 → 137.0	28	Positive	7.506
8	Amitraz	294.2 → 163.0	16	Positive	11.157
9	Anilofos	368.0 → 198.9	12	Positive	9.786
10	Aramite	335.1 → 291.2	16	Positive	8.165
11	Azamethiphos	325.0 → 183.0	16	Positive	7.206
12	Azimsulfuron	425.1 → 182.1	16	Positive	4.974
13	Azinphos methyl	318.0 → 289.9	24	Positive	6.089
14	Azoxystrobin	404.1 → 372.2	16	Positive	8.656
15	Bendiocarb	224.1 → 167.1	8	Positive	7.388
16	Benfuracarb	411.2 → 195.0	20	Positive	10.403
17	Bensulfuron methyl	411.1 → 149.0	20	Positive	7.833
18	Benzofenap	431.1 → 105.2	60	Positive	10.369
19	Boscalid	343.0 → 307.1	20	Positive	8.949
20	Bromoxynil	275.9 → 113.1	20	Positive	7.164
21	Butafenacil	492.0 → 331.1	32	Positive	9.270
22	Carbaryl	202.1 → 145.0	8	Positive	7.678
23	Carbofuran	222.1 → 165.1	8	Positive	8.210
24	Carpropamid	334.1 → 139.0	24	Positive	9.843
25	Chloridazon	222.1 → 77.2	40	Positive	5.867
26	Chlorimuron ethyl	415.1 → 185.9	20	Positive	6.865
27	Chloroxuron	291.1 → 72.0	32	Positive	9.241
28	Chlorsulfuron	358.0 → 141.0	20	Positive	5.059
29	Chromafenozide	393.2 → 149.1	24	Negative	9.300
30	Cinosulfuron	414.1 → 183.0	16	Positive	5.345
31	Clodinafop acid	312.1 → 267.2	24	Positive	4.957
32	Clofentezine	303.0 → 138.1	12	Positive	10.037
33	Clomeprop	322.0 → 174.9	24	Negative	10.531
34	Cloprop	199.0 → 127.1	16	Negative	5.572
35	Cloquintocet mexyl	336.1 → 238.0	12	Positive	10.603
36	Cloransulam-methyl	430.0 → 398.0	12	Positive	6.644
37	Clothianidin	250.0 → 169.0	12	Positive	5.340
38	Cumyluron	303.1 → 185.0	12	Positive	9.218

No	農薬名	Transition	CE	極性	RT
39	Cyazofamid	325.1 → 108.0	16	Positive	9.429
40	Cyclanilide	274.0 → 113.0	16	Positive	7.154
41	Cycloate	216.1 → 83.2	12	Positive	10.072
42	Cycloprothrin	499.0 → 257.0	12	Positive	10.811
43	Cyclosulfamuron	422.1 → 261.0	20	Positive	8.237
44	Cyflufenamid	411.1 → 391.2	8	Negative	9.916
45	Cyflumetofen	465.2 → 172.9	28	Positive	10.245
46	Cyprodinil	226.1 → 93.2	44	Positive	9.913
47	Diafenthiuron	385.2 → 329.2	20	Positive	10.878
48	Di-allate	270.1 → 86.0	10	Positive	10.384
49	Dichlorprop racemate	233.0 → 161.0	12	Negative	6.872
50	Diclomezine	255.0 → 80.0	32	Positive	9.119
51	Diclosulam	406.0 → 160.9	40	Positive	6.760
52	Diflubenzuron	311.0 → 158.0	12	Positive	9.542
53	Dimethirimol	210.2 → 71.1	40	Positive	8.180
54	Dimethomorph	388.1 → 301.1	24	Positive	9.048
55	Diuron	233.0 → 72.2	32	Positive	8.391
56	Dymuron	269.2 → 151.1	12	Positive	9.163
57	Epoxiconazole	330.1 → 121.0	24	Positive	9.451
58	Ethametsulfuron-methyl	411.1 → 196.1	16	Positive	6.141
59	Ethoxysulfuron	399.1 → 261.0	16	Positive	6.845
60	Fenamidone	312.1 → 92.1	28	Positive	8.886
61	Fenhexamid	300.1 → 264.1	24	Negative	9.334
62	Fenobucarb	208.1 → 95.3	16	Positive	8.770
63	Fenoxaprop-ethyl	362.1 → 288.1	20	Positive	10.405
64	Fenoxycarb	302.1 → 88.1	20	Positive	9.587
65	Fenpyroximate(E,Z)	422.2 → 366.1	12	Positive	10.632
66	Ferimzone(E,Z)	255.2 → 91.2	48	Positive	9.009
67	Flazasulfuron	408.1 → 182.0	24	Positive	5.682
68	Florasuram	360.0 → 129.1	24	Positive	5.017
69	Fluazifop	326.1 → 254.1	16	Negative	7.116
70	Flufenacet	364.1 → 194.2	8	Positive	9.382
71	Flufenoxuron	489.1 → 157.9	20	Positive	10.684
72	Flumetsulam	326.1 → 129.1	28	Positive	4.059
73	Fluridon	330.1 → 309.5	36	Positive	8.582
74	Fluroxypyr	255.0 → 208.9	16	Positive	4.362
75	Fomesafen	437.0 → 194.8	48	Negative	7.820
76	Foramsulfuron	453.1 → 182.0	28	Positive	5.777
77	Forchlorfenuron	248.1 → 129.0	16	Positive	8.347
78	Formetanate hydrochloride	222.1 → 165.0	16	Positive	8.210
79	Formothion	258.0 → 198.9	4	Positive	6.899
80	Furametpyr	334.1 → 157.0	36	Positive	8.155
81	Furathiocarb	383.2 → 195.0	24	Positive	10.492
82	Gibberellic acid	345.1 → 239.0	10	Negative	4.387
83	Halosulfuron methyl	435.1 → 182.0	28	Positive	6.172
84	Haloxyfop	362.0 → 316.0	20	Positive	8.100
85	Hexaflumuron	459.0 → 438.9	12	Negative	10.108
86	Hexythiazox	353.1 → 227.9	12	Positive	10.763
87	Imazalil	297.1 → 41.2	44	Positive	9.812
88	Imazaquin	312.1 → 267.1	24	Positive	4.957
89	Imazosulfuron	411.0 → 229.8	16	Negative	5.656
90	Imidacloprid	256.1 → 209.1	16	Positive	5.236
91	Indanofan	341.1 → 175.0	20	Positive	9.507
92	Indoxacarb MP	528.1 → 203.0	44	Positive	10.088
93	Iodosulfuron methyl	508.0 → 167.0	16	Positive	6.117
94	Ioxynil	369.8 → 126.7	32	Negative	6.103
95	Iprovalicarb	321.2 → 119.1	24	Positive	9.350
96	Isoxaflutole	360.1 → 251.1	16	Positive	8.260
97	Lactofen	479.1 → 344.0	12	Positive	10.402
98	Linuron	247.0 → 159.9	8	Negative	8.848
99	Lufenuron	509.0 → 325.8	20	Negative	10.442
100	MCPA	199.0 → 141.0	12	Negative	6.168
101	MCPB	227.1 → 140.9	8	Negative	7.778
102	Mecoprop	213.0 → 140.8	12	Negative	6.809

表 2. 161 農薬の dMRM 条件 (つづき)

No	農薬名	Transition	CE	極性	RT
103	Mepanipyrim	224.1 → 106.0	24	Positive	9.387
104	Mesosulfuron-methyl	504.1 → 182.0	24	Positive	6.278
105	Methabenzthiazuron	222.1 → 165.1	20	Positive	8.210
106	Methiocarb	226.1 → 169.0	8	Positive	8.909
107	Methomyl	163.1 → 88.0	4	Positive	4.364
108	Methoxyfenozide	369.2 → 313.2	4	Positive	9.070
109	Metosulam	418.0 → 177.1	12	Positive	5.937
110	Metsulfuron methyl	382.1 → 167.1	16	Positive	4.668
111	Monolinuron	215.1 → 126.1	20	Positive	7.870
112	Naproanilide	290.1 → 218.0	12	Negative	9.592
113	Naptalam	292.1 → 144.1	8	Positive	6.015
114	Novaluron	493.0 → 158.0	20	Positive	10.122
115	Oryzalin	345.1 → 281.0	16	Negative	9.379
116	Oxamyl	237.1 → 72.2	12	Positive	3.986
117	Oxaziclorfene	376.1 → 190.0	16	Positive	10.416
118	Oxycarboxine	268.1 → 175.0	12	Positive	6.132
119	Pencycuron	329.1 → 125.1	24	Positive	10.105
120	Penoxsulam	484.1 → 195.1	32	Positive	6.471
121	Pentoxazone	354.1 → 191.1	12	Positive	10.559
122	Phenmedipham	301.1 → 168.0	8	Positive	8.507
123	Pirimicarb	239.2 → 72.2	20	Positive	8.124
124	Primsulfuron methyl	467.0 → 225.8	16	Negative	7.285
125	Propaquizafop	444.1 → 100.1	20	Positive	10.556
126	Propoxycarbazone	399.1 → 367.2	6	Positive	5.39
127	Prosulfuron	418.1 → 138.9	24	Negative	6.89
128	Pyraclostrobin	388.1 → 194.2	12	Positive	9.93
129	Pyrazolynate	439.0 → 91.1	40	Positive	10.06
130	Pyrazosulfuron ethyl	415.1 → 182.2	32	Positive	6.30
131	Pyridalyl	490.0 → 108.9	36	Positive	11.67
132	Pyrifitalid	319.1 → 139.1	32	Positive	8.67
133	Quizalofop-ethyl	373.1 → 299.0	20	Positive	10.46
134	Silaflofen	426.0 → 287.1	4	Positive	11.93
135	Simeconazole	294.2 → 70.2	20	Positive	9.39
136	SpinetoramJ	748.5 → 142.2	32	Positive	11.85
137	SpinetoramL	760.5 → 141.9	32	Positive	12.08
138	Spinosyn A	732.5 → 142.2	32	Positive	11.63
139	Spinosyn D	746.5 → 142.0	32	Positive	11.84
140	Sulfentrazone	387.0 → 307.0	24	Positive	7.34
141	Sulfosulfuron	471.1 → 210.9	16	Positive	5.46
142	Tebufenozide	351.2 → 149.0	20	Negative	9.58
143	Teflubenzuron	381.0 → 158.0	16	Positive	10.55
144	Tetrachlorvinphos	364.9 → 127.1	16	Positive	9.66
145	Thiabendazole	202.1 → 175.0	28	Positive	6.93
146	Thiacloprid	253.0 → 126.1	28	Positive	6.15
147	Thiamethoxam	292.0 → 211.1	12	Positive	4.51
148	Thidiazuron	221.1 → 102.1	12	Positive	7.38
149	Thifensulfuron methyl	388.0 → 167.1	16	Positive	4.67
150	Thiodicarb	355.1 → 88.1	12	Positive	7.78
151	Thiophanate methyl	343.1 → 151.0	16	Positive	7.31
152	Thiophanate	371.1 → 151.0	20	Positive	8.38
153	Tralkoxydim(1,2)	328.2 → 254.0	20	Negative	7.65
154	Triasulfuron	402.1 → 167.0	16	Positive	5.71
155	Tribenuron methyl	396.1 → 155.0	16	Positive	5.94
156	Triclopyr	253.9 → 195.8	0	Negative	6.92
157	Tridemorph(1,2)	298.3 → 57.3	36	Positive	11.28
158	Trifloxysulfuron	460.1 → 178.0	20	Positive	6.73
159	Triflumuron	359.0 → 156.1	16	Positive	9.91
160	Triflusulfuron methyl	493.1 → 264.1	20	Positive	7.38
161	Triticonazole	318.1 → 70.3	20	Positive	9.42

※CE = Collision Energy

## 3. 結果および考察

dMRM 法では分析のサイクルタイムを指定するだけで、Dwell time (指定トランジションをモニターする時間)をソフトウェアが自動調整する測定方法です。そのため、単位時間当たりのポイント数が常に一定であり、各化合物の Dwell time が最大になるメソッドが容易に作成できます。図 1 には今回測定した 161 農薬の dMRM メソッド編集およびシミュレーション画面を示しました。編集画面ではフィルター機能が充実していますので、目的とする MRM トランジションを簡便且つスムーズに選択できます。また、シミュレーション画面は横軸が時間、縦軸がモニターする化合物数をプロットしていますので、全体を把握しやすくなっています。今回の分析ではサイクルタイムを 500 msec に指定しました。その結果、最小及び最大の Dwell time はそれぞれ 10.88 msec、499.20 msec でした。また、単位時間当たりの最大化合物数は 35 個でした。

図 2 には 1 ng/mL における 161 種農薬の MRM クロマトグラムを示しました。13 分の分析時間ですべての農薬が分離検出でき、Peak to Peak で計算した S/N 比は 20 以上であることが分かりました。例としてネガティブモードで測定した Triclopyr と Gibberellic acid の MRM クロマトグラムを図 2 に示しています。また、0.2 ng/mL の濃度において、158 農薬で S/N 比 10 以上の感度で検出できることが分かりました。0.2 ng/mL の濃度で S/N 比 10 以上の感度が出なかった農薬は Gibberellic acid、Triclopyr、Diclomezine の 3 種でしたが、今回測定した試料における基準値はどれも 20 ng/mL 以上であり、基準値 1/10 以上の感度が得られていることが分かりました。

アセトニトリルで 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 および 50 ng/mL の濃度に調整した標準品を使用して検量線データを取得しました。その結果、すべての農薬で決定係数が 0.999 以上の良好な結果が得られました。

標準溶液 1 ng/mL の繰り返し再現性 (n = 5) を検証しました。結果はすべての農薬において面積再現性が %RSD 評価で 10 %以内に収まる事が分かりました。

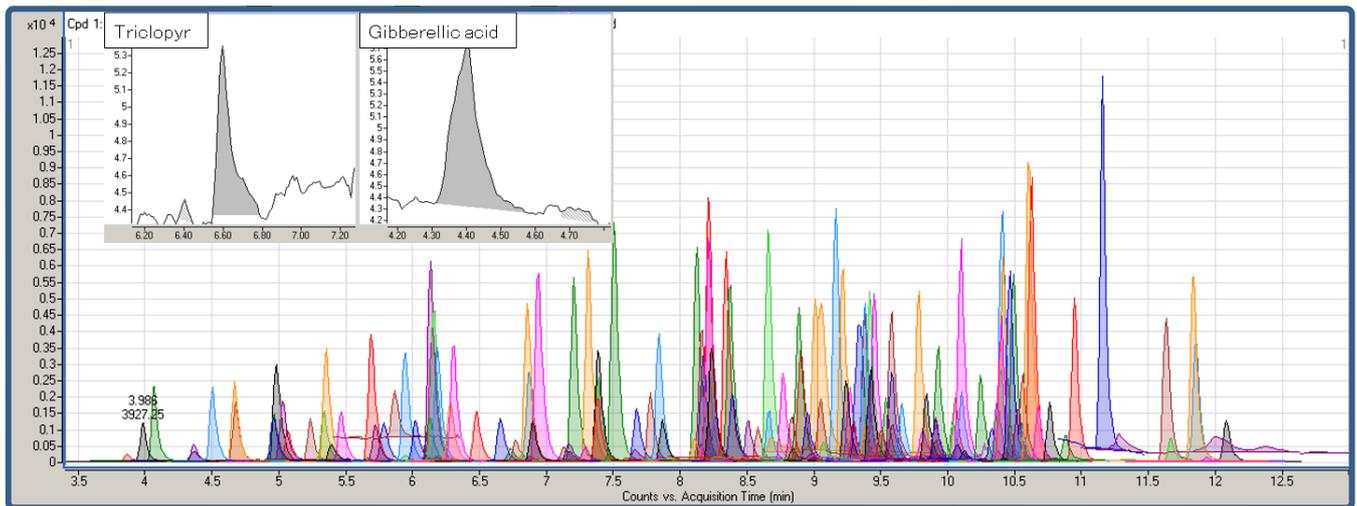


図 2. 1 ng/mL 濃度 161 種農薬の MRM クロマトグラム (重ね書き)

次に、0.1 および 1 ng/mL 濃度の農薬を試料に添加し、測定を行いました。図 3 にはオレンジおよび大豆試料に農薬を添加した 161 種農薬の MRM クロマトグラムを示しました。図 3a) に示すようにオレンジ試料中には防かび剤の Imazalil が高濃度 (995 ng/mL) で検出されました。図 3 に記載していない他の試料についても、1 ng/mL 濃度で添加した 161 種すべての農薬が検出できました。

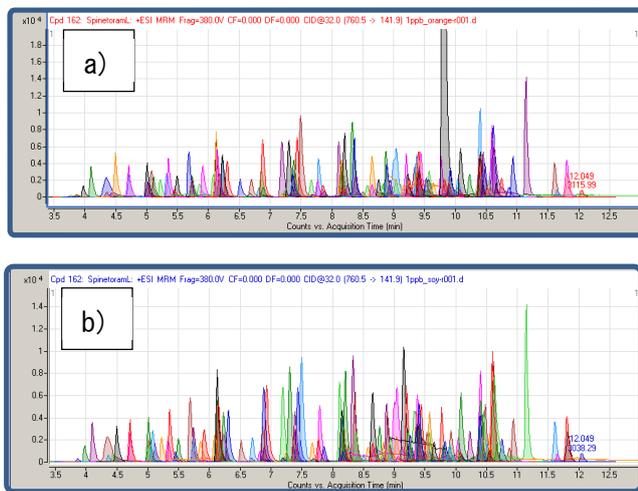


図 3. a)オレンジ b)大豆に添加した 161 種農薬の MRM クロマトグラム (重ね書き)。a)で観測されている一番強度の高いピークは Imazalil。添加した農薬濃度は 1ng/mL。

次に各試料に農薬を添加し、イオンサプレッションおよびエンハンスメントの有無を確認しました。標準品と試料中の農薬を測定し、その変化量を回収率 (%) として計算しました。結果は表 3 にまとめました。回収率の計算は、3 回繰り返し測定の実験値から算出し

ました。もともとの試料から 5 ng/mL 以上の濃度で検出された農薬と 0.1 ng/mL で検出できなかった農薬は計算の対象から外しています。その結果、すべての試料において回収率が 80-120 % に収まる農薬が 85-96 % となり、おおむね良好な結果が得られました。

表 3. 回収率が良好 (80-120%) であった農薬の割合 (%)

試料名	添加した農薬の濃度	
	0.1 ng/mL	1 ng/mL
キャベツ	93.5	93.2
ジャガイモ	96.1	94.4
玄米	93.6	96.3
オレンジ	90.8	85.5
大豆	96.1	92.5
リンゴ	92.2	93.0
ほうれん草	88.9	91.3

農薬の定性分析には tMRM 法を用いました。tMRM 法は、全てのアジレントのトリプル四重極 LC/MS システムで使用可能な分析メソッドです。tMRM 法は、MRM とプロダクトイオンスペクトルを組み合わせたもので、定量および定性分析を同時に行うことができます。図 4 はほうれん草に 0.1 ng/mL 濃度の農薬を添加し測定した例です。緑のピークから得られたスペクトルを上段に、下段にはライブラリスペクトルが表示されています。スペクトルがミラー表示されますので、違

いを容易に判別できます。

図4に示したように、トリプル四重極LC/MSを用いて実試料中の農薬定量分析をすると、夾雑ピークが多く観測されてしまい、MS/MSの高い選択性であっても、判定に困難をきたすことがあります。夾雑ピークが多く検出される場合は、プロダクトイオンスペクトルをピーク間で比較することで判別が容易になる場合があります。例えば図4a)、b)はほうれん草中の除草剤Pentoxazoneを測定した例です。a)のピークから得られたスペクトルはライブラリとのマッチスコアが98.8でしたが、b)は66.8であり、b)のピークは夾雑ピークであると判断できます。またMRMクロマトグラムの1ピークあたりのポイント数は、Pentoxazoneが29、Hexaflumuronが16であり、定量分析にも十分使用できることが分かりました。

tMRM法は定量用のMRMクロマトグラムを取得すると同時に定性用のプロダクトイオンスペクトルを取得でき、MRMによる高感度測定と偽陽性を減らすためのライブラリスペクトルの比較が行えますので、分析の効率化が期待できる手法であるといえます。tMRMの詳細については弊社アプリケーションノート5990-8461 JAJPをご参照ください。

#### 4. まとめ

dMRMおよびtMRM法を用いたトリプル四重極LC/MSによる161農薬の一斉分析を実施しました。今回測定したすべての農薬は基準値1/10濃度でS/N比 > 10以上の感度があり、添加回収率もおおむね良好であることが分かりました。またtMRM法を用いることで0.1 ng/mL濃度においてもプロダクトイオンスペクトルによる定性分析が可能であることが示されました。

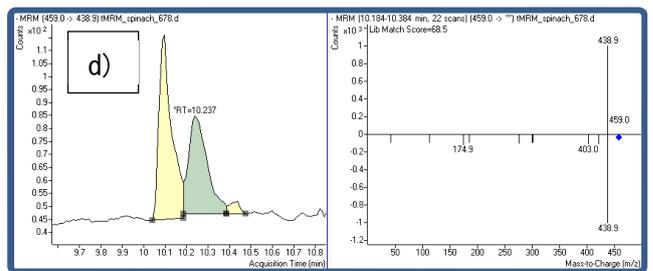
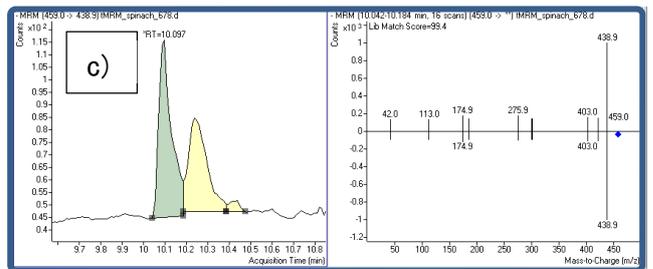
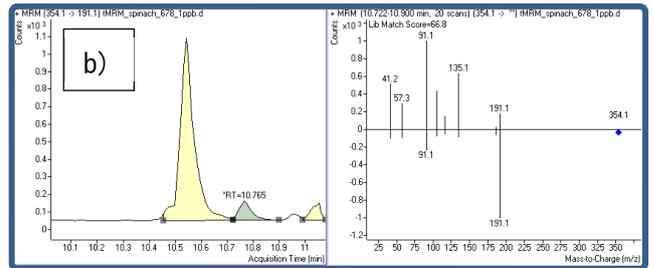
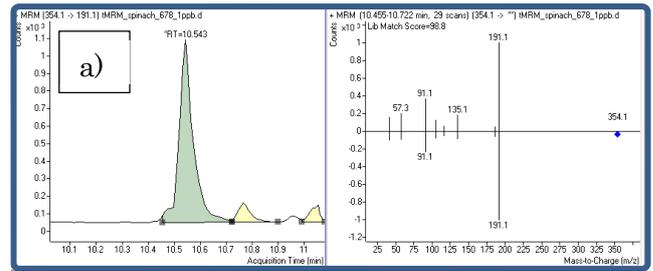


図4. ほうれん草に添加した農薬をtMRM法で測定した例。農薬濃度は0.1 ng/mL。a)およびb)はPentoxazone、c)およびd)はHexaflumuronのMRMクロマトグラムと得られたピークのプロダクトイオンスペクトル。緑でマークされているピークのプロダクトイオンスペクトルが表示されている。

#### 【LC-MS-201610YD-001】

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障害について一切免責とさせていただきます。また、本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更することがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

www.agilent.com/chem/jp



Agilent Technologies