

All Ions MS/MS 法を用いた Agilent 6230 LC/TOF による農薬サスペクトスクリーニング及び半定量法



Authors

滝埜昌彦

澤田浩和

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、All Ions MS/MS 法を用いた飛行時間型 LC/MS (LC/TOF)による農薬分析について紹介します。All Ions MS/MS 法とは従来のデータ依存型 MS/MS 法と異なりデータ非依存型 MS/MS 法を使用したサスペクトスクリーニング手法です。更に、この手法は LC/Q-TOF だけでなく LC/TOF においてもインソース CID (Collision-Induced Dissociation；衝突誘起解離)を使用することで網羅的に化合物のフラグメントイオン情報を得られるので、より信頼性の高い LC/TOF によるサスペクトスクリーニングが可能となります。そこで、作物中の農薬分析に All Ions MS/MS 法を用いた Agilent 6230 LC/TOF による農薬サスペクトスクリーニング法を検討しました。更に半定量法にもついても紹介します。

Key words : All Ions MS/MS 法, LC/TOF, 農薬分析, PCDL, 半定量法

分析条件

システム

1260 Infinity II Prime LC system
 1260 Infinity II Flexible pump (G7104C)
 1260 Infinity II Vial Sampler (G7129A)
 6230 LC/TOF system (G6230B)
 ソフトウェア
 MassHunter Data Acquisition B.10.0
 MassHunter Quantitative analysis B.10.0
 MassHunter Quantitative analysis B.10.1

LC/MS条件

今回の分析は高分解能LC/TOF法を使用しました。条件は表1及び2に示した通りです。

表1 分析条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System
移動相	A:5 mM酢酸アンモニウム水溶液 B:メタノール
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD(1.8 μm, 2.1 mm x 100 mm) (P/N:959758-902)
流速	0.2 mL/min
カラム温度	40 °C
注入量	2 μL
グラジェント	右図
MS	Agilent 6230B LC/TOF System
イオン源	Agilent Jet Stream(AJS) ESI
測定モード	All Ions MS/MS
乾燥ガス	300 °C 10L/min
シースガス	300 °C 12 L/min
ネブライザ圧	50 psi
フラグメンター電圧	120 V, 240 V
キャビラリ電圧	4000 V
ノズル電圧	0 V

試料調製

農薬混合標準液は林純薬製農薬混合標準溶液(PL2005 LC/MS農薬 Mix 4~12)を混合した後、適宜アセトニトリルで希釈調製しました。予め粉碎した試料(パセリ)はQuEChERS抽出キット(P/N:5982-5650)及び QuEChERS 分散キット(P/N:5982-5056)を用いて処理しました。その後、抽出精製液は0.45 μmのフィルターでろ過しました。All Ions MS/MS法の検証には上記試料に既知農薬を添加した試料を用いました。

農薬スクリーニング法

スクリーニングに使用したPCDL (Personal Compound Database Library)は表2に示した通り186農薬の化合物名、組成式、モノアイソトピック質量及びプロダクトイオンスペクトルを含みます。All Ions MS/MS法をLC/TOFで使用する場合、PCDLのプロダクトイオン情報を利用するにはインソースCIDの手法を用いる必要があります。そこで表1の分析条件で示した通りフラグメンター電圧を120及び240 Vで切り替え測定することで、分子関連イオンが主イオンのマススペクトル(120 V)とフラグメントイオンが主イオンのマススペクトル(240 V)を得ました。農薬サスペクトスクリーニングにはMassHunter Quantitative Analysis B.10.0を使用し、表3に示した解析条件及び基準値を設定しました。

表2 農薬のPCDL

農薬	組成式	モアイトピック質量	農薬	組成式	モアイトピック質量	農薬	組成式	モアイトピック質量	農薬	組成式	モアイトピック質量
Abamectin B1a	C48H75NO14	889.51876	Diclofemazine	C11H8Cl2N2O	254.00137	Imidacloprid	C9H10ClN5O2	255.05230	Propetamphos	C10H20NO4PS	281.08507
Acibenzolar-S-methyl	C8H6N2O5S2	209.99215	Diclosulamid	C13H11ClO2FN5O3S	404.98654	Indanofan	C20H17ClO3	340.08662	Propoxyflorfen	C15H18NO4S	398.08962
Aldicarb	C5H9NS	115.04557	Diffenbutazuron	C14H9ClF2N2O2	310.03206	Indoxacarb MP	C22H17ClF3N3O7	527.07071	Proflumuron	C15H16F3N5O4S	419.08751
Aldicarb sulfoxide	C7H11AN2O3S	206.07251	Dimethirimol	C11H19N3O	209.15281	Iprovalicarb	C13H21O3PS	288.09490	Pyraclonil	C15H15ClN6	314.10467
Aldoxy carb	C7H11AN2O4S	222.06743	Dimethomorph(E)	C21H22ClNO4	387.12374	Isothiolanone	C18H28N2O3	320.20999	Pyraclostrobin	C19H18ClN3O4	387.09858
Ametryn	C9H17N5S	227.12047	Dimethomorph(Z)	C21H22ClNO4	387.12374	Lactofen	C12H18O4S2	290.06465	Pyrazolynate	C19H16Cl2N2O4S	438.02078
Anilofos	C13H19ClNO3PS2	367.02325	Dinuron	C7H11AN4O3	202.10659	Linuron	C9H10Cl2F2N2O2	478.07546	Pyrazosulfuron-ethyl	C14H18N6O7S	414.09577
Aramite	C15H26ClNO4S	351.12711	Duron	C9H10Cl2N2O2	232.01702	Lufenuron	C9H10Cl2F2N2O2	248.01193	Pyrazoxifen	C20H16Cl2N2O3	402.05380
Azafenidin	C15H13Cl2NO3O2	337.03848	Dymuron	C17H20N2O	268.15756	Mandipropamide	C17H8Cl2F8N2O3	509.97842	Pyributicarb	C18H22N2O2S	330.14020
Azamectinphos	C9H10ClN2O5PS	323.97366	Emamectin B1a	C49H75NO13	885.52384	Mefenacet	C23H22ClNO4	411.12374	Pyridaben	C19H25Cl2N2O5	364.13761
Azimsulfuron	C13H16N10O5S	424.10258	Ethametsulfuron-methyl	C17H13ClFN3O	329.07312	Mepanipyrim	C16H14N2O2S	298.07760	Pyrifalid	C15H14N2O4S	318.06743
Azinphos methyl	C10H12N3O3PS2	317.00577	Ethiofencarb	C15H18N6O6S	410.10085	Mesosalufuron-methyl	C14H13N3	223.11095	Pyrimethanil	C12H13N3	199.11095
Azoxystrobin	C22H17N3O5	403.11682	Ethiprole	C11H15NO2S	225.08235	Metalaxyl	C17H21N5O9S2	503.07807	Qinalphos	C12H15N2O3PS	298.05410
Bendicarb	C11H13NO4	223.08446	Ethoxysulfuron	C13H9Cl2F3N4O5S	395.98262	Methalaxyl	C15H21NO4	279.14706	Quisalofop-ethyl	C17H24Cl2NO4	412.08768
Bensulfuron methyl	C16H18N4O7S	410.08962	Ethoxysulfuron	C15H18N4O7S	398.08962	Methabenzthiazuron	C10H11N3O5	221.06228	Sethoxydim	C17H29N3O3S	327.18681
Benzofenap	C22H20Cl2N2O3	430.08510	Etobenzanid	C16H15Cl2NO3	339.04290	Methidathion	O6H11N2O4PS3	301.96186	Simeconazole	C14H20FN3OSi	293.13597
Boscalid	C18H12Cl2N2O	342.03267	Etioazole	C21H23F2NO2	359.16969	Methidathion	C11H15NO2S	225.08235	Spinosyn A	C41H65NO10	731.46085
Butafenacil	C20H21ClF3N3O6	491.10710	Fenamidone	C17H17N3O3	311.10923	Methomyl	C5H10N2O2S	162.04630	Spinosyn D	C42H67NO10	745.47650
Butamifos	C13H21N2O4PS	332.09596	Fenhexamid	C14H17Cl2NO2	301.06363	Methoxyfenozide	C22H28N2O3	368.20999	Spirodiclofen	C12H24Cl2NO4	410.10516
Cafenstrole	C16H22N4O3S	350.14126	Fenobucarb	C12H17NO2	207.12593	Metconazole	C17H22ClNO	319.14514	Sulfentrazuron	C11H10Cl2F2N4O3S2	385.98187
Carbaryl	C12H11NO2	201.07898	Fenoxaprop-ethyl	C18H16ClNO5	361.07170	Metosulam	C14H13Cl2N5O4S	417.06653	Sulfosulfuron	C16H18N6O7S2	470.06784
Carbendazim(MBC)	C9H9N3O2	191.06948	Fenoxycarb	C17H19NO4	301.13141	Metsulfuron methyl	C14H15N5O6S	381.07430	Tebuconazole	C18H22ClNO	307.14514
Carbofuran	C12H11NO2	221.10519	Fenpyroximate(E type)	C24H27N3O4	421.20016	Monolinuron	C9H11ClN2O2	214.05091	Tebufenozide	C18H20N2O2	296.15248
Carpopamid	C15H18Cl3NO	333.04540	Fenpyroximate(Z type)	C24H27N3O4	421.20016	Napronilide	C19H17NO2	291.12593	Tebuthiuron	C9H16N4O5	228.10448
Chlorantranilprole	C18H14BrCl2N5O2	480.97079	Ferimzone(E)	C15H18N4	254.15315	Napropamide	C17H21NO2	271.15723	Tetrachlorvinphos	C10H9Cl4O4P	363.89926
Chlorfluzazuron	C20H9Cl3F5N3O3	538.96297	Ferimzone(Z)	C15H18N4	254.15315	Naptalal	C18H13NO3	291.08954	Thiafenozide	C10H7N3S	201.03607
Chloridazon	C10H8ClN3O	221.03559	Flazasulfuron	C13H11F3NO5S	407.05112	Nitenpyram	C11H15ClN4O2	270.08835	Thiabendazole	C10H9ClN4S	252.02364
Chlorimuron ethyl	C15H15ClNO6S	414.04008	Flonicamid	C9H6F3N3O	229.04630	Novaluron	C17H9ClF8N2O4	492.01231	Thiamethoxam	C8H10ClNO5O3S	291.01929
Chloroxuron	C15H15ClNO2O2	290.08221	Florasulam	C12H8F3N3O3S	359.02999	Oxamyl	C7H16NO4S	236.09431	Thienclozuron	C9H8N4O5	220.04188
Chlorisulfuron	C12H12ClNO5O4S	357.02985	Fluacrypyrim	C20H21F3NO2S	426.14026	Oxazicarbomefone	C20H19Cl2NO2	375.07928	Thifensulfuron methyl	C12H13N5O6S2	387.03072
Chromafenozide	C24H30N2O3	394.22564	Fluazifop	C15H17F3NO4	327.07184	Oxycarboxine	C12H13NO4S	267.05653	Thiobencarb	C12H13NO5S	257.06411
Cinosulfuron	C15H19NO5O7S	413.10052	Fluazifop-butyl	C19H20F3NO4	383.13444	Oxydemeton-methyl	C6H15O4PS2	246.01494	Thiodicarb	C10H18NO4O4S3	354.04902
Clodinafop acid	C14H11ClFN4O4	311.03606	Flufenacet	C14H13F4NO2S	363.06646	Paclitubutazuron	C15H20ClNO3	293.12949	Tiadimil	C11H10ClNO3S	267.02331
Clofencet	C13H11ClN2O3	278.04582	Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O3S	488.03624	Penconazole	C13H15Cl2N3	283.06430	Traloxymid	C20H27NO3	329.19909
Clofentazine	C14H8Cl2N4	302.01260	Flumetsulam	C12H9F3N3O2S	325.04450	Pencycuron	C19H21ClN2O	328.13424	Triadimefon	C14H16ClNO3O2	293.09310
Clomeprop	C16H15Cl2NO2	323.04798	Fluridion	C19H14F3NO	329.10275	Penoxsulam	C16H14F5N5O5S	483.06358	Triasulfuron	C14H16ClNO5O5S	401.05607
Cloquintocet methyl	C18H22ClNO3	335.12882	Flutolanil	C17H16F3NO2	323.11331	Phenmedipham	C16H19N3O4	317.13756	Triazophos	C12H16N3O3PS	313.06500
Clorasulam-methyl	C15H13ClF5N5O5S	429.03100	Florasulfuron	C17H20NO6O7S	452.11142	Phoximetryn	C12H15N2O3PS	298.05410	Trichlorfon	C4H8Cl3O4P	255.92258
Clothianidin	C6H8ClNO5O2S	249.00872	Forchlorfenuron	C12H10ClNO3	247.05124	Pirimicarb	C11H18N4O2	238.14298	Trifloxystrobin	C20H19F9N3O4	408.12969
Coumaphos	C14H16ClNO5PS	362.01446	Forametryn	C17H26ClNO3	333.12440	Prinlaclor	C17H26ClNO2	311.16521	Trifloxysulfuron	C14H14F3N5O6S	437.06169
Cumyluron	C17H19ClNO2O	302.11859	Furathioicarb	C18H26ClNO2S	382.15624	Primsulfuron methyl	C15H12F4N4O7S	468.03628	Triflumizole	C15H15ClF3N3O	345.08557
Cyazofamid	C13H13ClNO4O2S	324.04715	Halosulfuron methyl	C13H15ClN6O7S	434.04115	Prochloraz	C15H16Cl3N3O2	375.03081	Triflumuron	C12H14ClF3N3O2	494.07468
Cyloate	C11H21NO5	215.13439	Haloxypol	C15H11ClF3NO2S	361.03287	Profenofos	C11H15BrClO3PS	371.93514	Trifluralin	C15H10ClF3N2O3	338.03320
Cyclosulfuron	C17H19NO5O6S	421.10560	Hexythiazox	C17H21ClNO2S	352.10123	Prometryn	C10H19N5S	241.13612	Triflurosulfuron methyl	C17H19F3N6O6S	492.10389
Cyflufenamid	C20H17F5N2O2	412.12102	Imazalil	C14H14Cl2N2O	296.04832	Propamocarb	C9H20N2O2	188.15248	Triticonazole	C17H20ClNO3	317.12949
Cyprodinil	C14H15N3	225.12660	Imazazquin	C17H17N3O3	311.12699	Propaquizafop	C22H22ClNO3O5	443.12480	Vamidothion	C8H18NO4PS2	287.04149
Diflathate	C10H17Cl2NO5	269.04079	Imazosulfuron	C14H13ClN6O5S	412.03567						

表3 農薬スクリーニング条件及び基準値

条件	設定値
抽出質量幅	±30 ppm
抽出時間	±2 分
抽出イオン数	4
基準項目	
ターゲットイオン	
相対質量誤差	±3 ppm以下
同位体スコア	90以上
フラグメントイオン	
相対質量誤差	±3 ppm以下
共溶出スコア	90以上
S/N	5以上
保持時間	±5 %以下
全基準値を満たすプロダクトイオン数	2以上

100 ppbと10 ppb農薬標準液をサスペクトスクリーニングした結果を図2に示しました。ターゲットイオンとフラグメントイオンで基準を満たした農薬数は163及び123でした。フラグメントイオンが基準を満たさなかった農薬はフラグメントイオンの感度が低いことが原因でした。

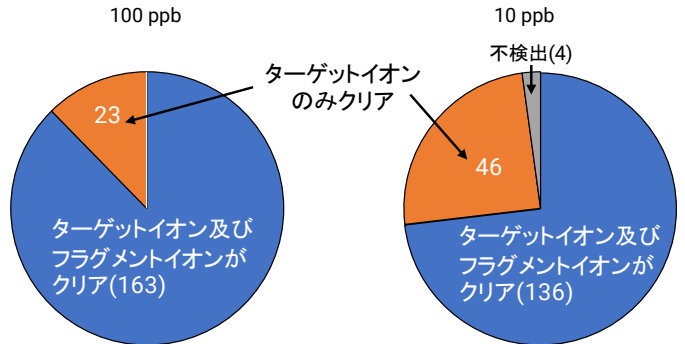


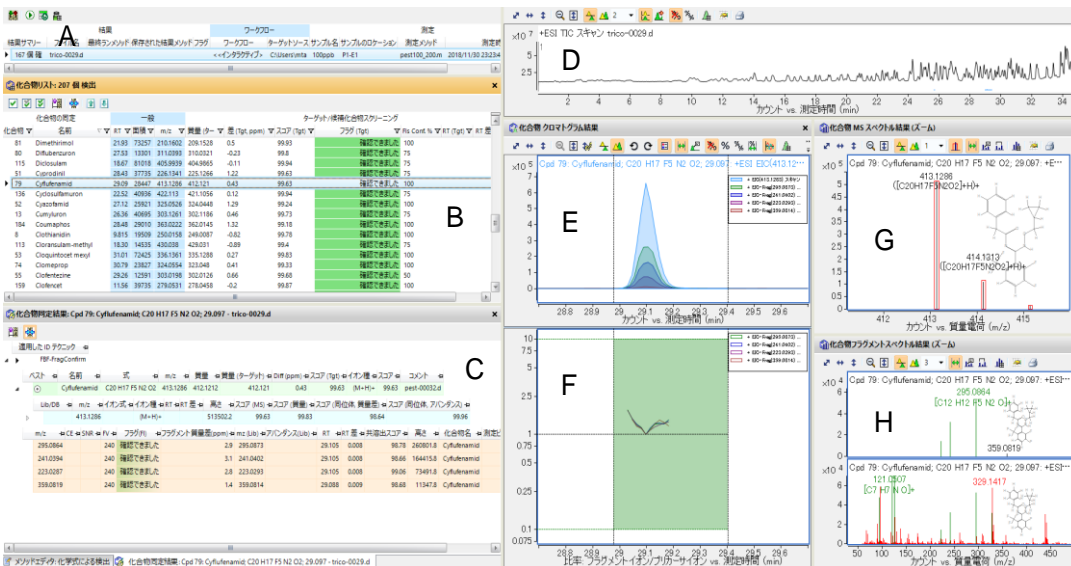
図2 農薬標準液のサスペクトスクリーニング結果

結果 標準化

All Ions MS/MS法は表1に示した通り、イオン源のフラグメンター電圧を120 Vと240 Vで測定する必要があり、クロマトグラムのピークあたりのデータポイント数を下げない様にTOF-MSの測定速度を通常のTOF測定時の2倍にする必要があります。一方、測定速度を上げるとイオン強度が低下するため、測定対象農薬が想定される濃度範囲で十分な感度が得られるかを確認しました。そこで農薬標準液(100-10 ppb)をAll Ions MS/MS法で測定し、表3のスクリーニング条件で解析した結果を図1に示します。この結果はシフルフェナミド(100 ppb)の結果ですが、相対質量誤差: 0.43ppm, 同位体スコア: 99, 共溶出スコア: 99, S/N>100でターゲットイオン及び全フラグメントイオンが検出されています。この様にMassHunter Qualitative Analysisの1画面で同定された化合物の一覧、化合物詳細情報、各イオンのEIC、共溶出係数、分子関連イオンの同位体パターン及びフラグメントイオンを含んだフルマススペクトルを確認することが可能です。

パセリ抽出液

7種類の農薬標準液を添加したパセリ抽出液(10 ppb)をAll Ions MS/MS法で測定したサスペクトスクリーニング結果を図3に示しました。その結果、全ての農薬が基準を満たして検出されました。これら検出された農薬はMassHunter Quantitative Analysis B.10.1を使用して、予め検量線が登録された定量メソッドを用いることで半定量も可能です。186農薬の定量メソッド中検出された農薬の化合物グループに特定の名前(例えば試料名)を入力することで検出された農薬のみの定量結果を表示させることが可能です。図4は検出された7農薬の化合物グループにパセリと入力することでパセリ抽出液において検出された7農薬のみを結果表示させたものです。



A: データファイル B: 化合物リスト C: 化合物同定結果 D: TIC E: 化合物のEIC F: EICの共溶出係数 G: 化合物の分子関連イオンの同位体(120 V) H: 化合物のフラグメントイオン(240 V)

図1 農薬標準液(100 ppb)のスクリーニング結果(シフルフェナミド)

まとめ

Agilent 6230 LC/TOF の All Ions MS/MS法を用いた農薬サスペクトスクリーニング法を検証しました。All Ions MS/MS法によるフラグメントイオンの確認によりLC/TOFによるサスペクトスクリーニング法の信頼性が向上しました。また、検出された農薬について予め検量線を登録した定量メソッドを使用することで検出された農薬のみ選択的に半定量が可能でした。

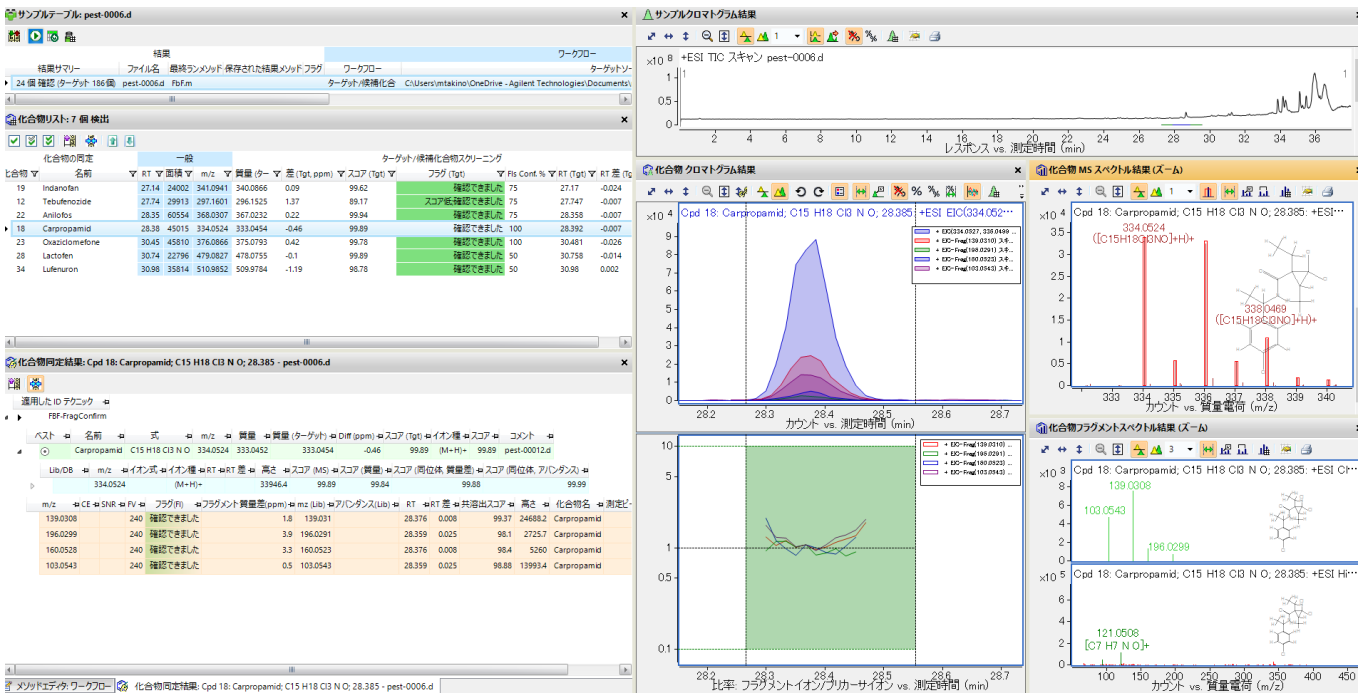


図3 農薬添加パセリ抽出液のサスペクトスクリーニング結果

化合物リスト

化合物グループ	化合物名	TIS	トランジション	測定モード	タイプ
パセリ	Indanofan	1	941.0939	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Tebufluencide	1	297.1598	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Anilofos	1	968.0305	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Carpropamid	1	334.0527	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Oxazicloimefone	1	379.0066	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Lactofen	1	479.0827	MSIスキャン	ターゲット
パセリ	Lufenuron	1	510.9857	MSIスキャン	ターゲット
	Aldicarb sulfoxide	1	207.0798	MSIスキャン	ターゲット
	Dinotefurin	1	202.1129	MSIスキャン	ターゲット
	Oxamsyl	1	237.1016	MSIスキャン	ターゲット
	Nitenpyram	1	271.0956	MSIスキャン	ターゲット
	Flumetsulam	1	326.0519	MSIスキャン	ターゲット
	Oxipiclotam-et...	1	247.0222	MSIスキャン	ターゲット
	Thiamethoxam...	1	292.0266	MSIスキャン	ターゲット
	Thifensulfuron...	1	388.0380	MSIスキャン	ターゲット
	Metasulfuron me...	1	382.0916	MSIスキャン	ターゲット
	Imaziquin	1	312.1343	MSIスキャン	ターゲット
	Ethamsulfuron...	1	411.1081	MSIスキャン	ターゲット
	Mesosulfuron...	1	504.0853	MSIスキャン	ターゲット
	Naphtalam	1	292.0968	MSIスキャン	ターゲット
	Aldicarb	1	116.0528	MSIスキャン	ターゲット
	Pyraoxasulfuron...	1	419.1030	MSIスキャン	ターゲット
	Triflurosulfuron	1	438.0690	MSIスキャン	ターゲット
	Halosulfuron...	1	425.0484	MSIスキャン	ターゲット
	Thiabendazole	1	202.0433	MSIスキャン	ターゲット
	Metasulam	1	418.0126	MSIスキャン	ターゲット
	Penoxsulam	1	484.0709	MSIスキャン	ターゲット
	Chlorantranilip...	1	415.0474	MSIスキャン	ターゲット
	Clorasulfam-et...	1	430.0383	MSIスキャン	ターゲット

バッチテーブル

化合物名	RT	面積	最終濃度	精度
Indanofan	27.15	331895	9.81	
Tebufluencide	27.74	350485	10.59	
Anilofos	28.35	809759	10.98	
Carpropamid	28.37	519369	10.76	
Oxazicloimefone	30.47	713780	7.22	
Lactofen	30.76	448054	9.16	
Lufenuron	30.96	74833	12.97	

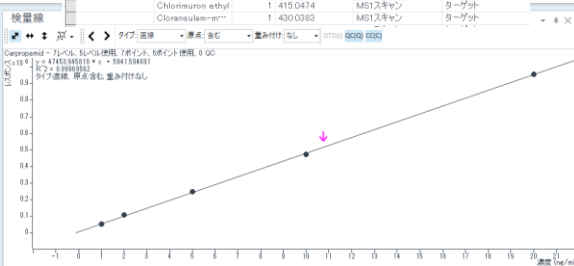
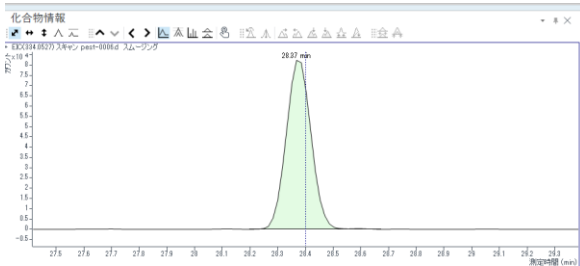


図4 パセリ抽出液中農薬の半定量結果

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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いません。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. 2020

Printed in Japan, June 15, 2020

DE44223.7626157407

LC-MS-202006TK-003

