

GC/MS メソッドと LC/MS メソッドの 組み合わせによるジュース中の農薬の 包括的な分析

アプリケーションノート

食品安全性

著者

Fadwa Al-Taher、Rima Juskelis、
Yang Chen、Jack Cappozzo
Institute for Food Safety and Health
Illinois Institute of Technology
Bedford Park, IL, USA

Philip L. Wylie、Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd
Wilmington, DE 19808, USA

概要

食品マトリックスに含まれる農薬の包括的な検出を行うには、GC/MS と LC/MS の両方の手法を組み合わせる必要があります。野菜ジュースマトリックス中の 39 種の農薬を高い信頼性で検出し、定量するメソッドが、アジレントの GC/MS および LC/MS 機器で開発されました。GC/MS SIM のほとんどの定量下限値 (LOQ) 値が 5~50 ng/mL であるのに対し、GC/MS/MS では 0.25~10 ng/mL、LC/MS/MS では 0.1~10 ng/mL となります。MS/MS を使用すると感度と選択性の両方が向上し、スパイクしたほとんどの農薬の回収率は 70~120 % となります。

はじめに

食品業界のグローバル化に伴い、食品の安全性に関する監視が強化された結果、規制および監視の対象となる農薬の数の増加、食品に含まれるこれらの農薬の許容レベルも大きく変化しています。米国では 1,000 種を超える農薬が登録されており、およそ 400 種については環境保護庁 (EPA) によって許容値が確立され、食品医薬品局 (FDA) により施行されています。欧州連合 (EU) や日本でも、食品中の農薬に関する厳しい規制があり、食品および動物飼料の最大残留レベル (MRL) が設定されています。これらのレベルはさまざまですが、デフォルトの許容値は 10 ppb です。



Agilent Technologies

したがって、数多くの食品に含まれる数百もの農薬を非常に低い残留レベルで検出し、定量できる機能が食品テストラボに求められています。ただ1種類の分析アプローチだけでは、この要件を満たすことはできません。残留している農薬の化学的特性は多様であり、かつ、数多くの農薬を検出するため、幅広いクロマトグラフおよび質量分析システムのアプローチが必要になります。気化する農薬では、大規模な農薬スペクトルライブラリとデコンボリューションソフトウェアが利用できるGC/MS(ガスクロマトグラフ-シングル四重極質量分析)が理想的な分析ツールです。複雑な食品の場合、非常に多くのバックグラウンド化合物が含まれるマトリックス中で必要な選択性と感度を得るには、GC/MS/MS分析が必要になることがあります。極性が非常に高い、容易に気化しない、熱安定性が低い、そして容易に誘導体化できないなどの特性を持つカルバミン酸塩や有機リン酸塩などの農薬は、液体クロマトグラフィー(LC)メソッドを使用することで分析が可能になります。LC/MS/MSは、複雑な食品マトリックスで高い感度と選択性を提供するため、対象となる既知の農薬を分析する場合に特に有効です。

このアプリケーションノートでは、野菜ジュースに含まれる39種の残留農薬の包括的な分析にこれらの3種の質量スペクトルの手法を有効に使用する方法について説明します。農薬が検出された場合は、3種のすべての機器システムで39種の全農薬について検出下限と回収率を測定しました。アジレントの質量選択検出器(MSD)とデコンボリューションレポート作成ソフトウェア(DRS)およびリテンションタイムロック(RTL)農薬および内分泌攪乱物質ライブラリを使用して、スパイクしたサンプルをGC/MSのスクリーンモードで分析しました。GC/MSの確認と定量はSIMモードで行いました。アジレントのトリプル四重極GC/MS(GC/MS/MS)のマルチプルリアクションモニタリング(MRM)を使用することで、感度と選択性が向上しました。極性の高い農薬は、アジレントのトリプル四重極LC/MS(LC/MS/MS)を使用することにより最適に分析できました。3種のすべての機器システムのサンプル前処理はAOAC QuEChERSメソッドを使用しました[1]。GC/MSをSIMモードで使用すると、通常は検量線の直線範囲が25 ng/mL(ppb)~1 µg/mL(ppm)になりました。GC/MS/MSでは、ほとんどの農薬の直線範囲は2.5 ng/mL~1 µg/mLとなりました。一部の農薬では、LC/MS/MSでさらに広い直線範囲(0.5 ng/mL~1 µg/mL)が得られました。したがって、これらの3種の分析プラットフォームを使用することにより、国際規制の要件を満たすことを確認するための野菜ジュース中39種の全農薬のスクリーニングおよび同定することができます。

実験方法

試薬および標準

ほとんどの農薬標準はU.S. EPA Pesticide Repository(メリーランド州フォートミード)から、その他の試薬はFluka/Sigma Aldrichから入手しました。農薬標準は、食料雑貨製造業協会(GMA)-食品業界分析ケミスト委員会(FIACC)から入手した、スパイクしていないブランクの野菜ジュースサンプルで前処理しました。個別の原液は、それぞれ10 mgを計量し、10 mLのメタノールに溶解することにより前処理しました。39種のすべての農薬が混合された中間原液を混合し、100 mLの計量フラスコで濃度50 µg/mLになるようにアセトニトリルで前処理しました。マトリックス適合キャリブレーション標準(0.5 ng/mL~1 µg/mL)を、中間標準を野菜ジュースブレンドにスパイクしました。

農薬グレードのアセトニトリルおよびメタノール、OptimaまたはLC/MSグレードの水およびギ酸はFisher Scientificから購入しました。

装置

GC/MSの実験は、トリプルアクシスディテクタを備えたAgilent 5975CシリーズGC/MSイナートXL MSDにAgilent 7890AシリーズGCを結合して行い、電子イオン化(EI)モードで操作しました。リテンションタイムロッキング(RTL)およびデコンボリューションレポート作成ソフトウェア(DRS)を使用して、野菜ジュースマトリックスにスパイクした農薬をスクリーンモードでスクリーニングしました。NIST(National Institute of Standards and Technology)によって開発され、DRSに組み込まれた自動質量スペクトルデコンボリューションおよび同定システム(AMDIS)を使用して、野菜ジュース中の汚れたマトリックスのスペクトルから対象スペクトルを分離しました。次に、スクリーンモードで確認された対象イオンとクオリファイアイオンを使用して、サンプルをシングルイオンモニタリング(SIM)モードで分析しました。機器の条件を表1に示します。

表 1. GC/MS の実行条件

GC の実行条件

カラム	不活性化リストリクタ : Agilent 0.7 m x 0.15 mm (p/n 160-7625-5) 分析カラム : Agilent J&W HP-5ms カラム、15 m x 0.25 mm、0.25 µm (p/n 19091S-431)	
注入量	1 µL	
注入モード	コールドスプリットレス (マルチモード注入口)	
注入口温度プログラム	60 °C (0.35 分) 60~ 280°C (900 °C/min) 280 °C (15 分) 280~ 300 °C (900 °C/min)	
オープンプログラム	スキャンモード 70 °C (1 分) 70~150 °C (50 °C/min) 150~200 °C (6 °C/min) 200~280 °C (16 °C/min) 280 °C (5 分) 290 °C (4 分、バックフラッシュ)	SIM モード 60 °C (1.5 分) 60~150 °C (50 °C/min) 150~240 °C (8 °C/min) 240~280 °C (50 °C/min) 280 °C (2.5 分) 280~290 °C (100 °C/min) 290 °C (2.05 分) 290 °C (4 分、バックフラッシュ)
SIM の流量	1 mL/min 定流量モード	
スキャンの初期流量	2.7 mL/min (公称値、定圧モード)	
リテンションタイムロッキング	クロルピリホスメチルを 8.298 分にロック	
トランスファーライン温度	280 °C	
バックフラッシュ構成	マルチモード注入口とパージ付き Ultimate ユニオンの上に分析カラムを接続。パージ付き Ultimate ユニオンと MSD の間に 0.7 m のレストリクタを接続。パージ付き Ultimate ユニオンの圧力を、補助 EPC モジュールを使用して 4 psig に設定	
MSD の条件		
スキャンモード	スキャンと SIM は個別に実行	
モード	電子イオン化 (EI)	
イオン源温度	300 °C	
四重極温度	200 °C	

GC/MS/MS の実験は、EI モードで動作する Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS に結合した Agilent 7890A シリーズ GC で行いました。マルチブルリアクションモニタリング (MRM) を使用して分析しました。機器の条件を表 2 に示し、各農薬のリテンションタイム、クオンティファイアおよびクオリファイアトランジション、およびコリジョンエネルギーを表 4 に示します。

LC/MS/MS の実験は、Jet Stream テクノロジーを搭載した Agilent 6460 シリーズトリプル四重極 LC/MS システムに結合された Agilent 1200 シリーズ HPLC システムで行いました。機器の条件を表 3 に示し、各農薬のリテンションタイム、クオンティファイアおよびクオリファイアトランジション、およびコリジョンエネルギーを表 4 に示します。

表 2. GC/MS/MS の実行条件

GC の実行条件

カラム	2本の Agilent J&W HP-5ms、15 m x 0.25 mm、0.25 µm (p/n 19091S-431UI) カラムをパージ付き Ultimate ユニオンで結合
注入量	1 µL
注入モード	コールドスプリットレス (マルチモード注入口)
注入口温度プログラム	60 °C (0.35 分) 60 °C~270 °C (600 °C/min)
オープンプログラム	60 °C (1 分) 60~170 °C (40 °C/min) 170~310 °C (10 °C/min) 310 °C (1.25 分)
流量	1.224 mL/min (定流量)
溶媒待ち時間	2.3 分間
流量モード	定流量、クロルピリホスメチルのリテンションタイムを 9.143 分にロック
トランスファーライン温度	300 °C
分析時間	19 分間
バックフラッシュ構成	パージ付き Ultimate ユニオン (PUU) を 2本の 15 m 分析カラムの間に接続。 分析の最後に、GC オープンを 310 °C、注入口圧力を 1 psi、PUU の圧力を 60 psi に保持して、カラム 1 を 4 分間バックフラッシュ

トリプル四重極 MS の条件

モード	電子イオン化 (EI)、MRM
イオン源温度	300 °C
四重極温度	180 °C

表 3. LC/MS/MS の実行条件

LC の実行条件

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse-plus C18、2.1 x 100 mm、1.8 µm (p/n 959758-902)			
カラム温度	40 °C			
注入量	5 µL			
移動相	A = 0.1 % ギ酸 + ddH ₂ O B = 0.1 % ギ酸 + アセトニトリル			
分析時間	15 分間			
流量	0.3 mL/min			
グラジエント	時間 (分)	0	10	15
	B%	5	95	100

トリプル四重極 MS の条件

モード	ESI、ポジティブ、MRM
シースガス	350 °C、11 L/min
乾燥ガス流量	11 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
キャピラリ電圧	4,000 V
ノズル電圧	1,000 V

表 4. GC/MS/MS および LC/MS/MS により特定された 39 種の農薬の対象およびクオリファイアトランジション

化合物名	RT (分)	GC/MS/MS						LC/MS/MS						
		定量トランジション			定性トランジション			定量トランジション			定性トランジション			
		プリカーサ イオン	プロダクト イオン	CE (V)	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	CE (V)	RT (分)	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	CE (V)	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	CE (V)
アセフェート (acephate)	5.567	136	94	13	136	42	8	2.458	184	142.9	4	184	95	20
アセタミプリド (acetamiprid)								5.216	223.1	125.9	20	223.1	99	44
アゾキシストロビン (azoxystrobin)	18.189	344.1	172	46	344.1	156	46	8.518	404.1	372.1	8	404.1	344.1	24
ビフェントリン (bifenthrin)	13.721	181	166	15	181	165	35	12.447	440.2	181.2	5	440.2	166.2	40
ボスカリド (boscalid)	16.384	140	112	15	140	76	30	8.698	343	307	16	343	271.1	32
カルバaryl (carbaryl)	9.054	144	115	30	144	89	50	7.112	202.1	145	4	202.1	127	28
カルベンダジム (carbendazim)								3.272	192.1	160.1	20	192.1	132.1	25
クロロタロニル (chlorothalonil)	8.412	265.9	169.9	28	265.9	133	53							
クロルプロファミン (chlorpropham)	6.952	213	171.7	5	127	92	20	8.856	214.1	172	5	214.1	154	15
クロルピリホス (chlorpyrifos)	9.768	196.9	168.9	17	196.9	107	40	11.025	350	293.9	15	350	197.9	30
シフルトリン (cyfluthrin)	15.533	163	127	5	163	91	14							
シハロトリン, λ (cyhalothrin, λ)	14.687	181	152	30	181	127	30							
シベルメトリン (cypermethrin)	16.293	181.1	152.1	25	181.1	127.1	35							
シプロジニル (cyprodinil)	10.215	224.1	208.1	27	224.1	118.1	45	7.951	226.1	108	30	226.1	93	40
ジクロラン (dicloran)	7.638	206	176	13	206	124	30							
ディルドリン (dieldrin)	11.513	262.9	192.9	40	262.9	190.9	35							
ジメトエート (dimethoate)	7.63	125	93	15	125	79	5	5.098	230	199	5	230	171	10
フェンバレレート 1 (fenvalerate 1)	17.202	225	119	15	167.1	125	12							
フェンバレレート 2 (fenvalerate 2)	17.396	225	119	15	167.1	125	12							
フェンプロパトリン (fenpropathrin)	13.846	181.1	152	26	181.1	127.1	26	11.025	350.2	197.9	16	350.2	125.1	5
フルジオキシニル (fludioxonil)	11.358	248	154	25	248	127	30	8.268	266.1	158	15	266.1	229	20
ホルベット (folpet)	10.982	259.9	130	20	259.9	102	40							
イミダクロプリド (imidacloprid)								4.952	256.1	209	10	256.1	175.1	10
馬拉チオン (malathion)	9.549	173.1	117.1	10	173.1	99	15	9.049	331.1	127	5	331.1	99	15
メソミル (methomyl)								3.886	163.1	106	4	163.1	88	4
メトキシフェノジド (methoxyfenozide)								8.927	369.2	149.1	16	369.2	313.1	0
ミクロブタニル (myclobutanil)	11.538	179	152	6	179	125	14	8.47	289.1	125	20	289.1	89	50
オメトエート (omethoate)	6.755	156	110	7	156	79	27	2.832	214	124.9	20	214	109	28
オキサミル (oxamyl)								3.675	220.1	90.1	0	220.1	72.1	4
cis-ベルメトリン (cis-permethrin)	15.413	183.1	168.1	15	183.1	153	18							
trans-ベルメトリン (trans-permethrin)	15.534	183.1	165.1	10	183.1	115.1	30							
o-フェニルフェノール (o-phenylphenol)	6.113	170	141	30	170	115	45							
ホスメット (phosmet)	13.705	160	133	15	160	77	30	8.438	318	160	5	318	133	40
ピペロニルブトキシド (piperonyl butoxide)	13.181	176	131	16	176	103	30	10.762	356.2	177.1	10	356.2	119.1	35
プロピコナゾール (propiconazole)	12.738	259.1	191	5	259.1	173	20	9.223	342.1	159	20	342.1	69	20
スピノサド A (spinosad A)								7.847	732.5	142.1	35	732.5	98	55
スピノサド D (spinosad D)								8.137	746.5	142.1	35	746.5	98	55
テブフェノジド (tebufenozide)								9.394	353.2	297.2	5	353.2	133.1	15
チアベンダゾール (thiabendazole)	10.487	201	174	20	201	65	54	3.475	202	175	24	202	131.1	36
チアメトキサム (thiamethoxam)	10.112	246.9	212	10	246.9	182	20	4.277	292	211	4	292	181	20
チオベンカルブ (thiobencarb)	9.599	257	100	5	257	72	22	10.045	258.1	125.1	25	258.1	100.1	5
トリフロキシストロビン (trifloxystrobin)	12.758	222	130	14	116	63	30	10.322	409.2	186.1	10	409.2	145	40

CE = コリジョンエネルギー

サンプルの前処理

野菜ジュースにスパイクした 39 種の農薬の抽出とクリーンアップは、農業用 Agilent サンプリーク QuEChERS 抽出キット (p/n 5982-5755) と果物および野菜用 Agilent サンプリーク QuEChERS AOAC 分散 SPE キット (p/n 5982-5022) を、キットの手順に従って使用して行いました。使用したメソッドには、緩衝化された水溶液/アセトニトリル系での初期抽出、塩の添加後の抽出/分配ステップ、分散固相抽出 (分散 SPE) を使用したクリーンアップステップが含まれます [2]。抽出およびクリーンアップの後、GC/MS、GC/MS/MS、および LC/MS/MS 分析で使用できるように 200 μ L の各サンプルをオートサンブラバイアルに移しました。

データ解析

アジレントの質量選択検出器 (MSD) とアジレントのデコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS、p/n G1716AA) およびリテンションタイムロック (RTL) 農薬および内分泌攪乱物質ライブラリ (p/n G1672AA) を使用して、スパイクしたサンプルを GC/MS によりスキャンモードで分析しました。

各農薬のマトリックス適合検量線 (0.5~1,000 ng/mL) を、3 種のすべての機器で 39 種の全農薬について作成しました。これらの検量線は、GC/MS/MS および LC/MS/MS には Agilent MassHunter 定量分析ソフトウェアを、GC/MS データには Agilent ChemStation データ解析ソフトウェアを使用して、農薬濃度に対する信号強度 (面積) をプロットし、重み付き線形回帰 (1/x) を使用して R^2 を確認することにより作成しました。検出下限 (LOD) と LOQ は、同じソフトウェアを使用し、それぞれ 3:1 および 10:1 の S/N 比に基づいて計算しました。

結果と考察

農薬を包括的に網羅

果物や野菜で一般に見られる 39 種の農薬の分析用に 3 種のメソッドを開発しました。1 種類のメソッドのみで 39 種のすべての農薬を検出することはできませんが、GC/MS、GC/MS/MS、および LC/MS/MS を組み合わせることで、39 種のすべての検出および定量に必要な感度を達成できました。リテンションタイムロッキング (RTL) およびデコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) を使用して、野菜ジュースマトリックスにスパイクした農薬を GC/MS スキャンモードでスクリーニングしました。次に、スキャンモードで確認された対象イオンと

クオリファイアイオンを使用して、サンプルを GC/MS SIM で分析しました。GC/MS SIM メソッドでは、1 つの対象イオンと 3 つのクオリファイアイオンを農薬の同定に、GC/MS/MS MRM メソッドでは 2 つの トランジションを使用しました。Mass Hunter 取り込みソフトウェアの最適化ツールを使用して、39 種の農薬の LC/MS/MS MRM トランジション、フラグメント電圧、およびコリジョンエネルギーを測定しました。その後、各 MRM 分析で最大 3 つのトランジションを使用しました。GC/MS/MS または LC/MS/MS、あるいはその両方のメソッドにより同定された農薬を表 4 に示します。農薬を、リテンションタイム、定量および定性トランジションのプリカーサおよびプロダクトイオン、それぞれのコリジョンエネルギーとともにアルファベット順に示します。

直線性、LOD、LOQ

マトリックス適合標準を使用し (0.5~1 ng/mL)、3 種のすべての機器で 39 種の全農薬について検量線を作成しました。3 種のすべてのメソッドを使用したときの各農薬の直線範囲、重み付き線形回帰 (1/x) を使用した曲線近似、LOD および LOQ を表 5 にまとめます。ほとんどの農薬は、GC/MS/MS で分析した場合は、 $R^2 > 0.99$ で 2.5 ng/mL (ppb)~1 μ g/mL (ppm) の範囲、GC/MS SIM で分析した場合は $R^2 > 0.99$ で 25 ng/mL~1 μ g/mL の範囲で測定できました。一部の農薬では、LC-MS/MS でさらに広い直線範囲 (0.5 ng/mL~1 μ g/mL) が得られ、一般に $R^2 > 0.98$ でした。

GC/MS SIM、GC/MS/MS、および LC/MS/MS で分析した各農薬の LOD は、対象イオン (SIM) または定量 MS/MS トランジションのマトリックス適合標準で少なくとも 3/1 の S/N 比を生じさせる農薬の量であることが確認されました。GC/MS/MS のほとんどの LOD 値が 0.1~10 ng/mL であるのに対し、GC/MS SIM では 1~25 ng/mL、LC/MS/MS では 0.05~10 ng/mL となります。

GC/MS SIM、GC/MS/MS、および LC/MS/MS で分析した各農薬の LOQ は、対象イオン (SIM) または定量 MS/MS トランジションのマトリックス適合標準で少なくとも 10/1 の S/N 比を生じさせる農薬量であることが確認されました。GC/MS SIM のほとんどの LOQ 値が 5~50 ng/mL であるのに対し、GC/MS/MS では 0.25~10 ng/mL、LC/MS/MS では 0.1~10 ng/mL となります。

表 5. 直線性、LOD、LOQ

化合物名	GC/MS				GC/MS/MS				LC/MS/MS			
	直線性 (ng/mL)	R ²	LOD (S/N=3) (ng/mL)	LOQ (S/N=10) (ng/mL)	直線性 (ng/mL)	R ²	LOD (S/N=3) (ng/mL)	LOQ (S/N=10) (ng/mL)	直線性 (ng/mL)	R ²	LOD (S/N=3) (ng/mL)	LOQ (S/N=10) (ng/mL)
アセフェート (acephate)					10-1000	0.9983	5	10	5-1000	0.9996	2.5	5
アセタミプリド (acetamidiprid)									50-500	0.9951	0.1	0.25
アゾキシストロビン (azoxystrobin)	25-1000	0.9947	10	25	10-1000	0.9935	1	2.5	25-1000	0.9929	<0.01	<0.05
ビフェントリン (bifenthrin)	25-1000	0.9989	1	5	2.5-1000	0.9975	0.1	0.25	50-500	0.9981	25	50
ボスカリド (boscalid)	25-1000	0.9985	10	25	2.5-1000	0.9963	0.5	1	0.5-1000	0.9967	0.25	0.5
カルバリル (carbaryl)	25-1000	0.9976	10	25	2.5-500	0.9998	0.5	1	50-500	0.9952	0.05	0.1
カルベンダジム (carbendazim)									25-500	0.9926	0.25	0.5
クロルプロファム (chlorpropham)	50-1000	0.9966	25	50	1-1000	0.9971	0.1	0.25	10-1000	0.9986	5	10
クロロタロニル (chlorothalonil)	25-1000	0.9971	1	5	2.5-1000	0.9945	0.1	0.25				
クロルピリホス (chlorpyrifos)	25-1000	0.9992	10	25	10-1000	0.9999	0.5	1	5-1000	0.9962	0.05	0.1
シフルトリン (cyfluthrin)	50-1000	0.9950	25	50	10-500	0.9885	5	10				
シハロトリン, λ (cyhalothrin, λ)	50-1000	0.9907	25	50	2.5-500	0.9993	1	5				
シベルメトリン (cypermethrin)	50-1000	0.9957	25	50	2.5-500	0.9941	1	2.5				
シプロジニル (cyprodinil)	25-1000	0.9994	5	10	10-1000	0.9996	1	5	50-500	0.9979	0.25	0.5
ジクロラン (dicloran)	25-1000	0.9999	10	25	1-500	0.9797	0.5	1				
ディルドリン (dieldrin)	50-1000	0.9991	25	50	10-1000	0.9996	2.5	5				
ジメトエート (dimethoate)	25-1000	0.9989	10	25	10-1000	0.9999	0.5	1	50-500	0.9861	0.1	0.25
フェンプロパトリン (fenpropathrin)	5-1000	0.9999	25	50	2.5-1000	0.9952	1	2.5	5-1000	0.9965	0.25	0.5
フェンバレレート 1 (fenvalerate 1)	50-1000	0.9959	25	50	2.5-500	0.9930	1	2.5				
フェンバレレート 2 (fenvalerate 2)	50-1000	0.9928	25	50	2.5-500	0.9919	1	2.5				
フルジオキサニル (fludioxonil)	25-1000	0.9985	10	25	10-1000	0.9979	1	2.5	25-500	0.9963	10	25
ホルベット (folpet)					2.5-1000	0.9939	10	25				
イミダクロプリド (imidacloprid)									50-1000	0.9967	0.1	0.25
馬拉チオン (malathion)	50-1000	0.9993	25	50	10-1000	0.9992	1	2.5	50-1000	0.9917	0.05	0.1
メソミル (methomyl)									25- 500	0.9956	10	25
メトキシフェノジド (methoxyfenozide)									50-1000	0.9943	0.05	0.1
ミクロブタニル (myclobutanil)	25-1000	0.9990	10	25	1-1000	0.9975	0.25	1	0.5-1000	0.9981	0.25	0.5
オメトエート (omethoate)					10-500	0.9966	5	10	10-1000	0.9968	2.5	5
オキサミル (oxamyl)									25-500	0.9876	10	25
o-フェニルフェノール (o-phenyl phenol)	25-1000	0.9995	10	25	2.5-1000	0.9984	<0.5	1				
ホスメット (phosmet)					25-1000	0.9945	2.5	10	0.5-1000	0.9979	0.1	0.25
ピペロニルブトキシド (piperonyl butoxide)	25-1000	0.9979	10	25	10-1000	0.9995	0.5	2.5	50-500	0.9966	0.05	0.1
プロピコナゾール (propiconazole)					10-1000	0.9997	0.5	2.5	0.5-1000	0.9976	0.25	0.5
スピノサド A (spinosad A)									50-500	0.9895	0.25	0.5
スピノサド D (spinosad D)									25-1000	0.9954	0.25	0.5
テブフェノジド (tebufenozide)									50-500	0.9919	0.25	0.5
チアベンダゾール (thiabendazole)					10-500	0.9982	2.5	10	25-1000	0.9972	0.25	0.5
チアメトキサム (thiamethoxam)					2.5-500	0.9926	0.25	2.5	50-500	0.9921	0.25	0.5
トリフロキシストロビン (trifloxystrobin)					2.5-1000	0.9932	0.5	2.5	50-1000	0.9922	0.05	0.1
チオベンカルブ (thiobencarb)					10-1000	0.9996	1	2.5	0.5-1000	0.9979	0.25	0.5

3種のすべてのメソッドで、アゾキシストロビン、ピフェントリン、ボスカリド、カルバリル、クロルピリホス、シプロジニル、ジメトエート、フェンプロパトリン、フルジオキサニル、マラチオン、およびマイクロブタニルを同定することができました。25 ng/mL でスパイクした野菜ジュースブレンド抽出物中のアゾキシストロビンの GC/MS SIM 分析で得られた抽出イオンクロマトグラム (EIC) (m/z 344、388、345、372) を図 1A に示します。対象化合物の分析において GC/MS/MS が GC/MS SIM よりも優れている点を図 1B に示します。25 ng/mL でスパイクし

た野菜ジュースブレンド抽出物を GC/MS/MS に 1 μ L 注入すると、1 μ L の GC/MS SIM 分析 ($S/N = 9.1:1$ 、図 1A) よりも優れた S/N 比を持つ (38:1)、アゾキシストロビンのクリーンな MRM クロマトグラフィーピークが得られました。同じサンプル抽出物の分析では、アゾキシストロビンに LC/MS/MS 分析を使用した場合の方が GC/MS/MS よりも優れた S/N 比 (327:1) が得られました。これは、アゾキシストロビンが極性を持つため、LC/MS/MS による分析の方が適しているからです。

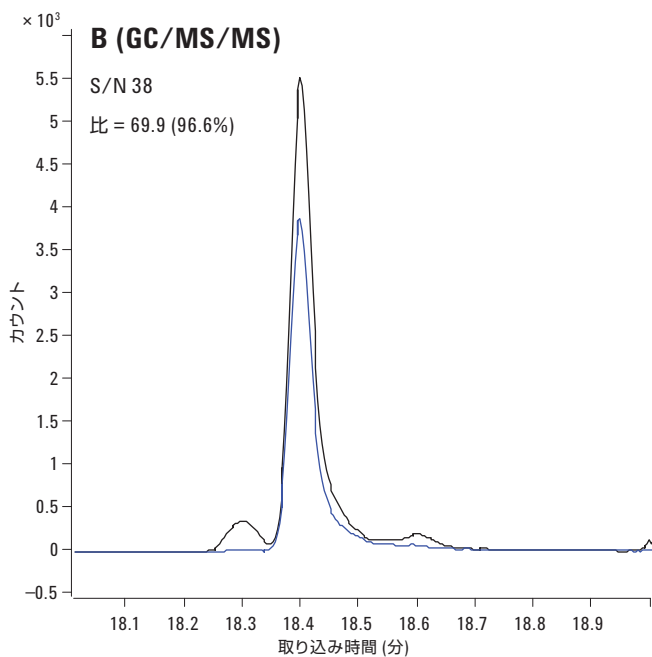
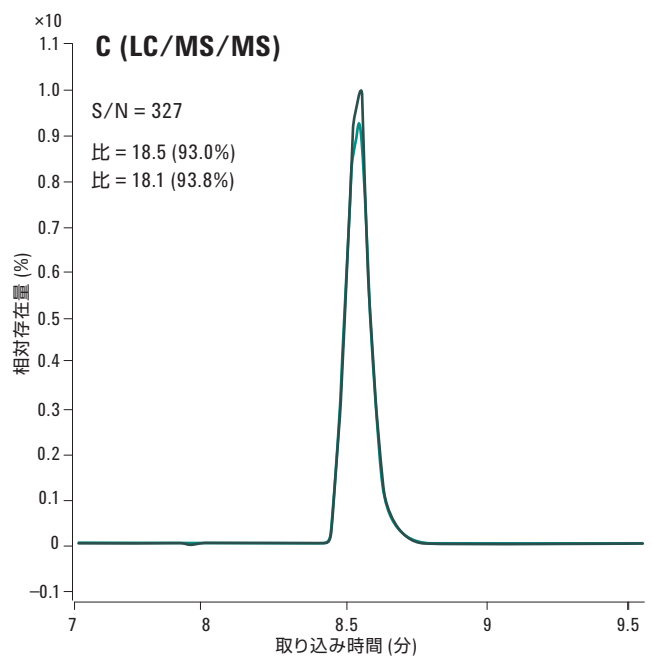
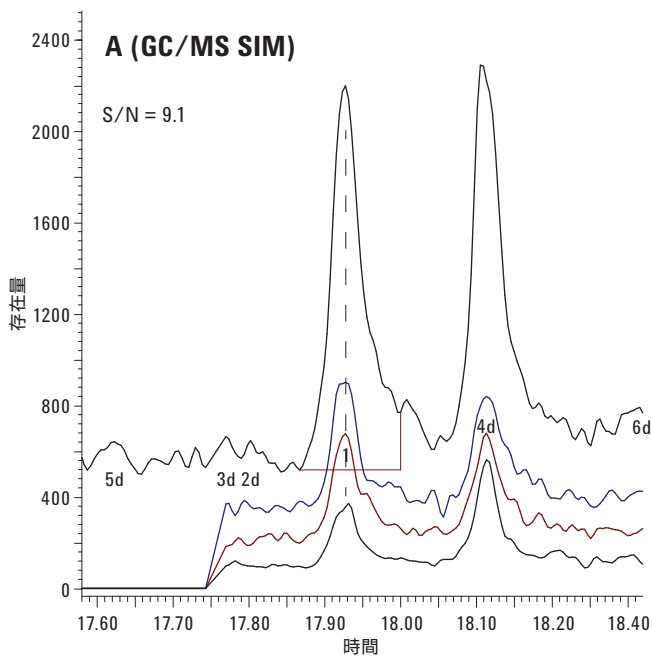


図 1. 25 ng/ml でスパイクした野菜ジュースブレンド抽出物の 3種のすべてのメソッドを使用した分析。
 A) GC/MS SIM クロマトグラムから抽出したアゾキシストロビンのクオンティファイアイオン (m/z 344) と 3つのクオリファイアイオン (m/z 388、345、372)、
 B) GC/MS/MS 分析用のクオンティファイアおよびクオリファイアトランジション (344.1 \rightarrow 172.0、344.1 \rightarrow 156.0)、
 C) LC/MS/MS 分析用のクオンティファイアおよびクオリファイアトランジション (404.1 \rightarrow 372.1、404.1 \rightarrow 344.1、401.1 \rightarrow 329.1)。
 B と C のクオリファイアイオンとクオンティファイアイオンの比を示すことで、それぞれの場合のアゾキシストロビンの存在を確認できます

これとは逆に、無極性のピレトroidピフェントリンは、LC/MS/MS (LOD 25 ng/mL) よりもいずれかの GC メソッドを使用した場合の方が優れた検出結果が得られました (GC/MS では LOD 1 ng/mL、GC/MS/MS では LOD 0.1 ng/mL)。カルバミン酸塩であるカルバリルは、LC/MS/MS を使用して分析すると高い感度で検出できますが (LOD 0.05 ng/mL)、直線性は GC/MS/MS の方が優れていました (2.5~500 ng/mL)。同じくカルバミン酸塩であるクロルプロファミンは、LC/MS/MS よりも GC/MS/MS の方が優れた感度 (LOD 0.1 ng/mL) と直線性 (1~1000 ng/mL) が得られました。フェンプロパトリンとクロルピリホスは、LC/MS/MS で分析すると非常に近い時間に溶出し、リテンションタイムとプロダクトイオンが類似しているために同定が困難になります。両方の化合物はトランジションが同じです (350 → 198)。フェンプロパトリンは、GC/MS/MS でも同様の感度で検出し、確認することができます (2.5~1,000 ng/mL)。クロルピリホスは極性を持つ有機リン酸塩であるため、LC/MS/MS では直線範囲が広がり (5~1,000 ng/mL)、感度が向上します (LOD 0.05 ng/mL)。クロルピリホスは、 $C_9H_{11}^{35}Cl_2^{37}ClNO_3PS$ 同位体をプリカーサイオン (m/z 349.9) として使用し、LC/MS/MS で分析することができます。このプリカーサイオンから生じたプロダクトイオンは、GC/MS/MS では分離の際のリテンションタイムの違いが3分のフェンプロパトリンとは干渉しません。したがって、これらのトランジションと LC/MS/MS を使用してクロルピリホスを分析し、GC/MS/MS でフェンプロパトリンを分析すると、いずれの化合物についても優れた感度が得られ、干渉も発生しません。マラチオンは、LC/MS/MS で分析した場合の方が優れた感度が得られます (LOD 0.05 ng/mL) が、直線範囲は GC/MS/MS の方が広くなります (10~1,000 ng/mL)。したがって、1 種のメソッドでは検出感度が低い対象化合物も、別の 1 種または複数のメソッドを使用することで検出感度が向上するため、3 種のすべてのメソッドを使用すると、39 種の農薬について最高品質のデータを確実に得ることができます。

GC/MS/MS (図 2A) および LC/MS/MS (図 2B) により野菜ジュースブレンドマトリックスで検出できる、10 ppb でスパイクした農薬の MRM トランジション (重ね表示) を図 2 に示します。

回収率の調査

野菜ジュース抽出物に 2 つの異なる添加レベル (50 および 250 ng/mL) で 39 種の農薬をスパイクし、QuEChERS キットを使用して抽出しました。各レベルで分析を 4 回繰り返して行いました (n = 4)。3 種のそれぞれの機器における各農薬の回収率と標準偏差を表 6 に示します。

すべてではありませんが、ほとんどのスパイクの回収率は 70~120 % でした。GC/MS だけで分析できた化合物 (クロロタロニル、シフルトリン、シハロトリン、ス、シベルメトリン、ジクロ

ラン、ディルドリン、および *o*-フェニルフェノール) は優れた回収率を示しました。ホルベットは唯一の例外で、高スパイクの回収率は 53.6 % でした。また、この化合物は GC/MS/MS に対して低い応答を示しました。同様に、LC/MS/MS だけに応答を示した化合物 (アセタミプリド、カルベンダジム、イミダクロプリド、メソミル、オキサミル、スピノサド A、スピノサド D、およびテブフェノジド) も、許容できる回収率を示しました。GC/MS SIM が MS/MS よりもマトリックス干渉の影響を受けやすい点に注意してください。チアベンダゾールは、GC/MS では低スパイクで高い回収率を示しましたが、GC/MS/MS での回収率は許容可能なレベルでした。この化合物では、LC/MS/MS による一貫した高い回収率はキャリブレーションの偏りを示す可能性があります。

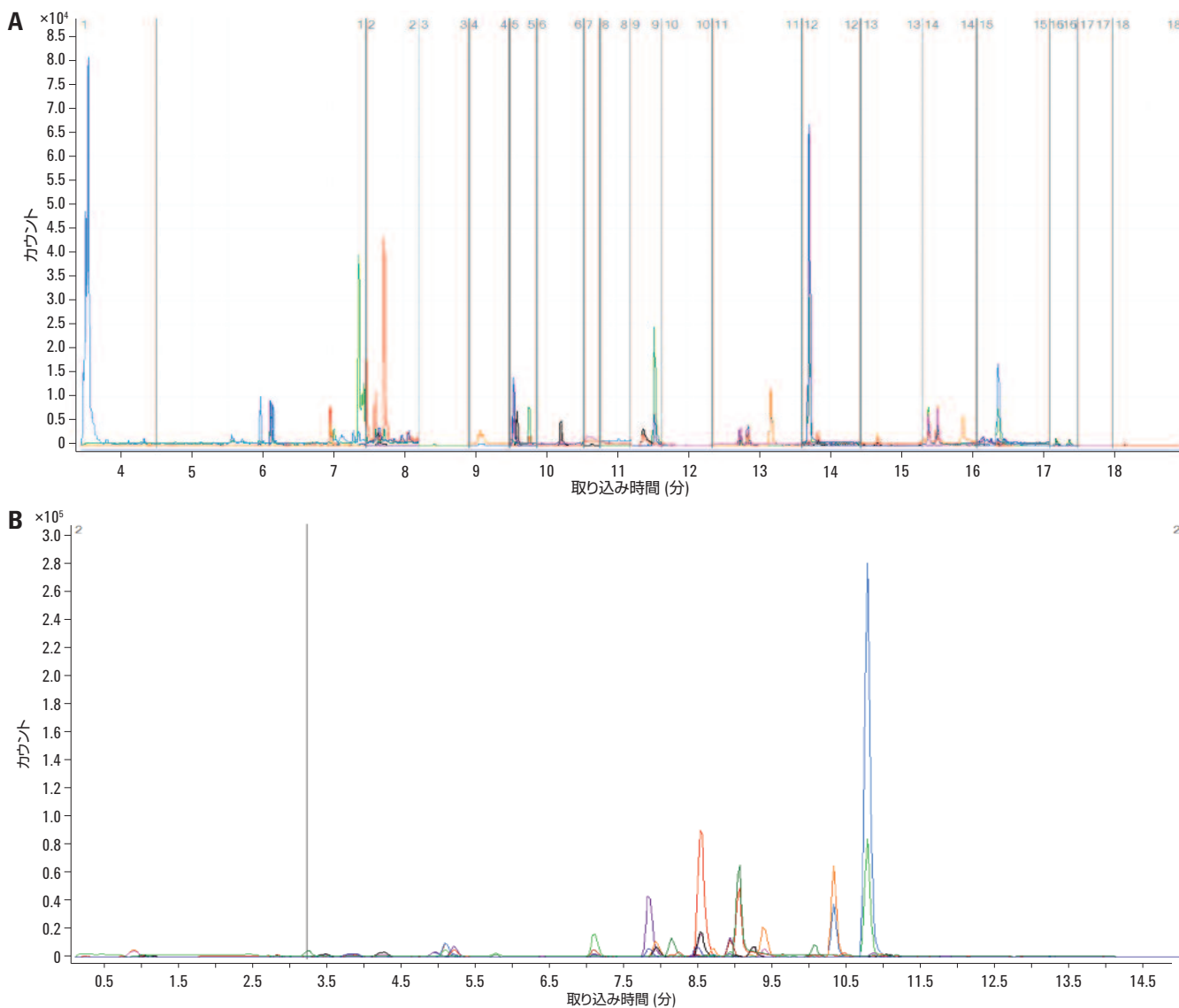


図 2. 10 ppb (ng/mL) でスパイクし、GC/MS/MS (図 2A) および LC/MS/MS (図 2B) を使用して野菜ジュースブレンドマトリックスで検出された農薬の MRM トランジション (重ね表示)

表 6. スパイクした野菜ジュースサンプルに含まれる 39 種の農薬の回収率 (n=4)

化合物名	GC-MS		GC-MS/MS		LC-MS/MS	
	50 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差	250 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差	50 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差	250 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差	50 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差	250 ng/mL 平均回収率 ± 標準偏差
アセフェート (acephate)			90.8 ± 8.1	81.8 ± 6.6	106.4 ± 1.7	102.9 ± 4.6
アセタミプリド (acetamiprid)					114.8 ± 11.7	121.4 ± 3.5
アゾキシストロビン (azoxystrobin)	116.3 ± 3.6	87.9 ± 2.2	85.5 ± 1.7	81.12 ± 4.0	128.4 ± 4.8	115.1 ± 4.3
ビフェントリン (bifenthrin)	114.9 ± 2.7	93.7 ± 0.8	100.7 ± 2.6	90.7 ± 2.5	110.2 ± 5.4	94.8 ± 5.9
ボスカリド (boscalid)	117.5 ± 3.3	93.6 ± 1.3	90.8 ± 3.3	87.3 ± 3.0	128.4 ± 9.7	120.6 ± 3.9
カルバリル (carbaryl)	118.6 ± 4.3	80.3 ± 3.5	78.8 ± 5.8	64.1 ± 5.7	111.7 ± 6.1	115.6 ± 2.9
カルベンダジム (carbendazim)					115.6 ± 7.2	112.2 ± 1.6
クロルプロファム (chlorpropham)	96.9 ± 12.0	95.61 ± 4.0	100.3 ± 6.4	99.7 ± 2.5	107.0 ± 6.9	106.2 ± 2.7
クロロタロニル (chlorothalonil)	115.08 ± 5.0	73.8 ± 2.4	53.4 ± 3.8	50.1 ± 4.3		
クロルピリホス * (chlorpyrifos)	121.49 ± 4.2	98.0 ± 0.8	99.1 ± 5.2	95.1 ± 1.9	125.5 ± 7.5	102.4 ± 10.0
シフルトリン (cyfluthrin)	120.4 ± 5.5	81.8 ± 1.8	93.5 ± 2.7	90.4 ± 2.5		
シハロトリン, λ (cyhalothrin, λ)	121.2 ± 5.9	83.7 ± 12.7	93.3 ± 2.5	94.6 ± 3.6		
シベルメトリン (cypermethrin)	118.8 ± 3.4	80.2 ± 5.1	84.9 ± 5.2	80.2 ± 3.6		
シプロジニル (cyprodinil)	114.4 ± 4.49	98.7 ± 1.4	103.3 ± 5.6	98.9 ± 1.2	98.6 ± 6.0	115.6 ± 4.1
ジクロラン (dicloran)	113.7 ± 10.1	92.3 ± 2.8	166.1 ± 4.0	98.6 ± 2.6		
ディルドリン (dieldrin)	101 ± 2.8	113.1 ± 1.8	103.6 ± 4.9	95.9 ± 4.0		
ジメトエート (dimethoate)	103.1 ± 10.2	84.02 ± 7.0	91.1 ± 5.8	82.2 ± 4.3	89.4 ± 8.1	115.2 ± 9.8
フェンプロパトリン * (fenpropathrin)	98.5 ± 8.3	88.7 ± 5.9	87.2 ± 2.8	90.1 ± 2.5	139.4 ± 7.9	105.9 ± 8.8
フェンバレレート 1 (fenvalerate 1)	136.5 ± 5.7	90.8 ± 3.9	80.6 ± 5.0	71.9 ± 5.2		
フェンバレレート 2 (fenvalerate 2)	148.8 ± 3.1	87.9 ± 2.1	78.5 ± 5.3	70.2 ± 4.7		
フルジオクソニル (fludioxonil)	124.9 ± 3.2	97.6 ± 1.3	109.5 ± 6.4	100.3 ± 1.8	145.8 ± 12.7	120.6 ± 8.3
ホルベット (folpet)			72.4 ± 11.1	53.6 ± 9.4		
イミダクロプリド (imidacloprid)					103.7 ± 6.1	117.1 ± 5.1
馬拉チオン (malathion)	112.0 ± 12.4	96.7 ± 11.7	92.4 ± 3.3	88.4 ± 1.6	95.6 ± 11.0	114.4 ± 8.0
メソミル (methomyl)					121.2 ± 10.0	112.5 ± 6.1
メトキシフェノジド (methoxyfenozide)					95.10 ± 0.40	123.4 ± 6.8
ミクロブタニル (myclobutanil)	118.2 ± 5.5	102.3 ± 1.7	108.1 ± 5.4	101.2 ± 1.5	120.0 ± 8.3	109.3 ± 2.7
オメトエート (omethoate)			144.10 ± 27.5	73.8 ± 10.0	114.3 ± 4.6	110.3 ± 2.2
オキサミル (oxamyl)					110.5 ± 12.3	119.9 ± 4.8
o-フェニルフェノール (o-phenyl phenol)	106.3 ± 3.6	104.49 ± 0.7	103.8 ± 5.5	102.96 ± 2.0		
ホスメット (phosmet)	136.4 ± 6.0	70.0 ± 3.5	64.4 ± 4.8	50.3 ± 6.3	121.7 ± 5.0	107.3 ± 3.2
ピペロニルブトキシド (piperonyl butoxide)	123.7 ± 6.0	93.9 ± 2.2	103.1 ± 5.0	96.9 ± 0.7	94.7 ± 7.1	119.2 ± 1.5
プロピコナゾール (propiconazole)			104.0 ± 4.3	99.0 ± 2.4	124.3 ± 4.5	114.4 ± 1.7
スピノサド A (spinosad A)					122.1 ± 5.8	114.6 ± 4.0
スピノサド D (spinosad D)					114.7 ± 4.9	113.6 ± 1.5
テブフェノジド (tebufenozide)					109.6 ± 9.5	102.2 ± 18.3
チアベンダゾール (thiabendazole)	126.8 ± 7.9	81.6 ± 5.3	85.0 ± 6.5	84.5 ± 3.6	120.7 ± 4.6	123.5 ± 6.1
チアメトキサム (thiamethoxam)			76.0 ± 7.5	69.3 ± 5.3	110.3 ± 7.1	122.2 ± 5.6
トリフロキシストロビン (trifloxystrobin)	123.9 ± 2.0	95.0 ± 1.0	96.5 ± 2.5	94.7 ± 1.8	133.7 ± 8.2	144.3 ± 4.0
チオベンカルブ (thiobencarb)	109.8 ± 6.4	96.0 ± 2.9	104.2 ± 5.4	99.0 ± 1.3	123.1 ± 3.5	108.8 ± 3.3

* 表 4 に示した定量トランジションを使用して LC/MS/MS による回収率を得るために、フェンプロパトリンおよびクロルピリホスは個別にスパイクしました。

結論

食品安全のテストラボでは、特定のマトリックス中の対象となるすべての農薬を、規制要件を満たす検出および定量レベルで分析できるメソッドを必要としています。農薬化合物には、GC/MS を使用すると最適に分析できるものも、LC/MS を使用すると最適に測定できるものもあります。数多くの農薬の包括的な検出を確実にするための最適なアプローチは、GC と LC/MS の両方の手法を使用することです。したがって、野菜ジュース中の農薬を分析するための最も一般的な農薬分析手法を使用して、アジレントの GC/MS と LC/MS の両方の機器プラットフォームでメソッドを開発しました。これらを同時に使用すると、確立された MRL よりも大幅に低いレベルで野菜ジュースに含まれる 39 種の農薬のスクリーニングと確認を行うためのラボのニーズをすべて満たすことができます。個別に使用すると、これらのほとんどの農薬のスクリーニングまたは確認が可能です。

表 5 から、ほとんどのラボが GC シングル四重極の農薬メソッドを GC/MS/MS に移行しつつある理由がわかります。Agilent 7000B トリプル四重極 GC/MS は選択性が非常に優れており、LOD および LOQ 値を大きく向上します。ただし、Agilent 5975C シリーズ GC/MS シングル四重極装置は、DRS と農薬および内分泌攪乱物質ライブラリをあわせて使用することで、900 を超える農薬のスクリーニングに使用できます。目的がスクリーニングの場合は、このアプローチによっても良好な値が得られます [3]。

参考文献

1. SampliQ QuEChERS Standard Operating Procedure, <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/columns-supplies/samplepreparation/sampliqspe/sampliquechers/Pages/background.aspx>
2. Highly Sensitive and Rugged GC/MS/MS Tool for Pesticide Multiresidue Analysis in Food Samples, Agilent Technologies Publication 5990-5044EN.
3. 「926 種類の農薬物質と外因性内分泌攪乱物質のスクリーニング — デコンポリューションレポート作成ソフトウェアと新農薬物質ライブラリによる GC/MS 分析」、アジレント・テクノロジー、資料番号 5989-5076JAJP

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2012
Printed in Japan
February 15, 2012
5990-9924JAJP



Agilent Technologies