

# 果実および野菜中農薬の精密質量 スクリーニングと定量のための 精密質量 LC/MS/MS ライブラリの 開発と応用

## アプリケーションノート

食品および農薬分析

### 著者

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

Franziska Spitzbarth,  
Hochschule Fresenius, Zwickau,  
Germany

Thomas Glauner  
Agilent Technologies GmbH, Waldbronn,  
Germany

### 概要

このアプリケーションノートでは、果実および野菜中の残留農薬のスクリーニング、定量、確認に用いる農薬用精密質量ライブラリの開発と応用について説明します。Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6540 Ultra High Definition QTOF LC/MS システムを組み合わせ、デュアルスプレー Agilent Jet Stream テクノロジーを用いて、ポジティブおよびネガティブエレクトロスプレーモードで測定しました。残留農薬の定量と確認には、ターゲット MS/MS モードを用いました。3 種類の農作物グループについて、高速 UHPLC-QTOF-MS/MS メソッドの有効性を実証する結果を示しています。このメソッドは、定量下限 (LOQ)、直線性、再現性という点で、食品抽出物中の農薬の分析に適しています。実際のサンプルを用いたルーチンモニタリングプログラムに応用したところ、トリプル四重極 LC/MS および GC/MS メソッドで検出されたすべての農薬が、この UHPLC-QTOF/MS メソッドにより同定されました。定量結果も良好に一致しました。



Agilent Technologies

## はじめに

農薬の種類は増加の一途をたどっています。農薬の中には使用を禁止されたものもありますが、現在でも食品中の汚染物質として検出されることがあります。精密質量 LC/MS は、多数の汚染物質候補を分析できることから、食品中農薬のスクリーニング手法として注目されるようになってきました。多数の物質を分析できるという特徴は、分析範囲の拡大、サンプルスループットの向上、分析コストの削減などを実現できるため、民間試験ラボではとりわけ大きな利点となります。この技術への関心が高まっている背景としては、最近導入されたガイドライン SANCO/12495/2011 [1] により、食品および種子中の残留農薬の分析に関するメソッドバリデーションおよび品質管理手順が規定されたことが挙げられます。各サンプルバッチに含まれる農薬について、高価な標準物質を用いずに定性的スクリーニングをおこなうための基準が規定されたのは、これが初めてのことであります。

EU では、欧州委員会規則 (EC) 396/2005 およびその修正条項 [2] により、農薬の残留基準値 (MRL) が定められています。付属条項 II および III では、さまざまなマトリックスと農薬の組み合わせについて、17 万件を超える MRL が規定されています。米国でそれに相当する規則は 40 CFR パート 180 で、食品中農薬の許容値と免除条件が定められています。また、分析に用いる手法も規定されています。

最先端の LC/QTOF/MS 機器を使えば、LC/MS で分析できるほとんどの農薬を、EU および米国の定める MRL を大きく下回る値で分析することができます。一般的なワークフローでは、該当国で危険と見なされているすべての規制対象残留農薬について、MS ドメインデータを用いて定量がおこなわれます。飛行時間型分析装置で得られたフルスキャン精密質量データの補足情報を用いて、包括的なデータベース検索を適用すれば、あまり一般的でない汚染物質も検出および同定することができます [3]。QuEChERS 抽出物などの複雑なサンプルの場合 [4]、偽陽性の可能性を排除するのは困難です。精密質量 LC/TOF/MS では、リテンションタイム、精密質量、同位体分布、付加パターンを用いて陽性結果を確認します。正確な MS/MS 情報を利用できれば、特に精密質量フラグメント情報が利用できる場合には、同定の信頼性が高まります。

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」リストの上位に

記載された、LC/MS で分析できる 300 を超える農薬に関して、3 種類のコリジョンエネルギーの CID スペクトルを含む精密質量 LC/MS/MS ライブラリの作成について説明しています。その後、この精密質量 MS/MS ライブラリを LC/QTOF/MS/MS ワークフローの一環として用いて、果実および野菜抽出物中の農薬のスクリーニングと同定をおこないました。また、MS/MS スペクトル比較で確認された農薬を、MS ドメインデータを用いて定量しました。50 種類を超える農薬と、異なる農作物グループに属する 3 種類の代表的な果実および野菜について [5]、SANCO/12495/2011 に従って、このワークフローの有効性を示す結果を紹介しています。ルーチン農薬モニタリングの一環として、このワークフローを実際のサンプルに応用したところ、トリプル四重極 LC/MS および GC/MS 分析で検出されたすべての農薬が同定され、定量結果も一致しました。

## 実験手法

### サンプル前処理

地元の食料品店で果実と野菜を購入しました。Agilent BondElut QuEChERS キットを用いて、クエン酸バッファを用いた公式な QuEChERS プロトコルに従ってサンプルを抽出しました。ホモジナイズした果実および野菜 (キュウリ、レモン、ルッコラ) 10 g を 50 mL ポリプロピレンチューブで計量し、手でよく振りながら、アセトニトリル 10 mL で 1 分間抽出しました。その後、レモンホモジネートについては、5 M 水酸化ナトリウム溶液 600  $\mu$ L を加えて中性化しました。無水  $MgSO_4$  4 g、NaCl 1 g、バッファ用クエン酸塩 1.5 g を含む抽出塩バケツを加えたのち、混合物を再度 1 分間よく振り、3,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。

層分離後、上澄みのアセトニトリル層 6 mL のアリコートに、Agilent BondElut QuEChERS EN 分散 SPE チューブ (p/n 5982-5256) に移しました。このチューブには、1 級-2 級アミン (PSA) 150 mg、サンプル精製のためのグラファイトカーボンブラック 15 mg、水分除去のための無水  $MgSO_4$  900 mg が含まれています。チューブの蓋を閉め、さらに 1 分間よく振りました。その後、チューブを 3,000 rpm で 5 分間遠心分離しました。最終抽出液 4 mL のアリコートを清潔なポリプロピレンバイアルに移しました。ターゲット農薬の安定性を高めるために、最終抽出液にギ酸 40  $\mu$ L を加えました。メソッドバリデーションで使用するために、55 種類のターゲット化合物を含む農薬混合物を、5、10、50、100  $\mu$ g/kg に相当する 4 段階の濃度で最終抽出液のアリコートに添加しました。

## LC/MS/MS 分析

分離にあたっては、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) を搭載する Agilent 1290 Infinity UHPLC システムを使用しました。この UHPLC システムを、デュアルスプレー Agilent Jet Stream エレクトロスプレーイオン源を搭載する Agilent G6540A UHD 四重極飛行時間型 LC/MS システムに接続し、2 GHz 拡張ダイナミックレンジモードで使用しました。

参照質量イオンの送液には、流速 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  の Agilent Infinity 1260 アイソクラティックポンプ (G1310B) と 100:1 フロースプリッタ (G1607-60000) を使用しました。信頼性の高い参照質量送液の重要性は、参考文献 [6] で詳細に解説されています。データ採取には Agilent MassHunter Workstation B.05.00 ソフトウェアを、データ解析には MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 および Quantitative Analysis B.05.02 を使用しました。表 1 に UHPLC パラメータを、表 2 に Agilent Jet Stream パラメータを示しています。

フローインジェクション分析 (FIA) において、濃度 1  $\text{ng}/\mu\text{l}$  の各標準のアセトニトリル溶液をターゲット MS/MS モードの LC/QTOF/MS/MS システムに注入し、10、20、40 eV のコリジョンエネルギーで、300 種類以上の農薬の精密質量 LC/MS/MS ライブラリスpekトルを採取しました。[M+H]<sup>+</sup> および [M-H]<sup>-</sup> イオンをターゲット質量としました。正確なフラグメント質量について採取した MS/MS spekトルを整理したのち、spekトルを農薬 PCDL に算入し、農薬検出および確認に適用しました。

この手順で、QuEChERS 最終抽出液を Q-TOF システムに注入しました。MS ドメインの採取レートは 5 スキャン/秒、MS/MS ドメインの採取レートは 3 スキャン/秒です。2 回連続の分析において、ポジティブおよびネガティブイオンモードでデータを採取しました。TOF モード (MS ドメイン) では、 $m/z$  100~1,100 amu の質量範囲を採取しました。ターゲット MS/MS モードでは、EURL の残留農薬の「Check-your-Scope」リストの上位に記載された 200 種類以上のターゲット質量について、 $m/z$  50~1,000 amu の質量範囲を採取しました。採取時間枠は 0.6 分としました。オフセット 4 eV、傾き 6 eV/100 amu を用いて、コリジョンエネルギーランプをターゲット質量に適用しました。

表 1. UHPLC メソッドパラメータ

UHPLC カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD 2.1 × 150 mm、1.8 $\mu\text{m}$ 、30 °C	
移動相	A: 5 mM $\text{NH}_4$ ギ酸塩 + 0.1 % ギ酸 B: 5 mM $\text{NH}_4$ ギ酸塩 + 0.1 % ギ酸を含む メタノール	
グラジエントプログラム	分	% B
	0	10
	0.5	10
	3.5	50
	17.0	100
	20.0	100
	20.1	10
ストップタイム:	22 分	
流速	0.40 mL/min	
注入量	3 $\mu\text{L}$	

表 2. Agilent Jet Stream パラメータ

パラメータ	値	
ガス温度	200 °C	
ガス流速	8.0 L/min	
ネブライザ	35 psi	
シースガス温度	350 °C	
シースガス流速	11.0 L/min	
	<b>ポジティブ値 (V)</b>	<b>ネガティブ値 (V)</b>
Vcap :	4,000	3,000
ノズル電圧	300	0
フラグメンタ	120	120
スキマ 1	65.0	65.0
オクタポール RF ピーク	750	750
参照質量補正	有効化	
	検出枠	50 ppm
	最小高さ	500 カウント
参照質量イオン	ポジティブ	ネガティブ
	121.050873	119.03632
	922.009798	966.000725

農薬検出には、Find by Formula (FBF) データマイニングアルゴリズムを使用しました。Find by Formula ワークフローでは、パーソナル化合物データベースライブラリ (PDCL) の分子式情報とユーザーの規定したイオン種定義を用いて、MS ドメインで化合物を検索します。表 3 は、FBF アルゴリズムで用いたパラメータを示しています。このパラメータは、化学的バックグラウンドの大きいサンプルに含まれる残留農薬や汚染物質のスクリーニングに適した一般的な値です。

リテンションタイム、精密質量、同位体パターンマッチングをもとに、結果にスコアをつけました。MS ドメインで化合物が同定された場合は、CID スペクトルが自動的に抽出され、PCDL に含まれる精密質量 MS/MS ライブラリで検索されます。MS/MS ライブラリ検索で化合物候補が確認されると、該当する農薬が定量に含められ、効率的なバッチレビューがおこなわれ、濃度値が割り当てられます。

図 1 は、果実および野菜抽出物中の農薬のスクリーニング、同定、定量に用いたワークフローを示しています。このアプローチを実際のサンプルにも使用しました。同定された農薬と定量結果を、トリプル四重極 LC/MS および GC/MS システムで以前に採取した結果と比較しました。

## 結果と考察

### 精密質量 MS/MS ライブラリの作成

SANCO/12495/2011 ガイドラインに従った定性的スクリーニングメソッドにより検出されたサンプル中の農薬の存在は、精密質量 MS/MS スペクトルを精密質量参照ライブラリスペクトルと比較することで確認できます。ユーザーの定義した精密質量ライブラリを作成するために、10、20、40 eV のコリジョンエネルギーで、300 種類以上の農薬の精密質量スペクトルを採取しました。ポジティブまたはネガティブイオン化モードのいずれかを用いて、ほとんどの分析対象農薬について、有意な MS/MS スペクトルを採取しました。いくつかの化合物については、両方のイオン化モードで MS/MS ライブラリスペクトルを採取しました。質量割り当てエラーを回避するために、採取したスペクトルのフラグメント質量を理論上のフラグメント式と比較し、実際の (実験的) 質量を補正しました。この補正したスペクトルを Agilent 農薬パーソナル化合物データベースライブラリ (p/n G3878CA) に算入し、果実および野菜サンプルに含まれる残留農薬のスクリーニングおよび確認に使用しました。適切な UHPLC メソッドを用いて包括的な農薬標準を分析し、リテンションタイム情報をライブラリに加えました。図 2 は、パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) ソフトウェアと、10 eV のコリジョンエネルギーで採取したオメトエートの精密質量スペクトルを示しています。

表 3. FBF データマイニングアルゴリズムのパラメータ設定

パラメータ	値
抽出データフォーマット	クロマトグラフィおよびスペクトル抽出、いずれもセントロイド
インテグレーター	Agile、ピーク閾値なし
含めるスペクトル	ピーク高さ > 10 % 飽和 < 20 % (クロマトグラムで用いる m/z 範囲内) ピークの開始および終了時に平均スペクトルのバックグラウンド除去 ピーク閾値なし
電荷状態	# 1 に限定
同位体モデル	一般的な有機分子、 ただしフェンブタチンオキシドを除く (個別に不偏評価)
PCDL	G3878CA 農薬 PCDL、741 種類の化合物、 両極性の精密質量スペクトルおよび最大 3 種類の コリジョンエネルギーを含む
ポジティブイオン	[M+H] <sup>+</sup> 、[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 、[M+Na] <sup>+</sup>
ネガティブイオン	[M-H] <sup>-</sup> 、[M+HC00] <sup>-</sup>
分子式マッチング	マッチ許容範囲 (スペクトル) ±6 ppm 認識範囲 ±0.35 分 EIC 抽出 ±10 ppm 抽出範囲 ±1.0 分 ピーク閾値なし プレカーサ許容範囲 ±20 ppm で利用できる場合は MS/MS スペクトルを抽出
マッチング基準	警告閾値 スコア < 80 化合物マッチング スコア > 50
ライブラリ検索基準	プレカーサイオン拡張 ±10 ppm プロダクトイオン拡張 ±20 ppm コリジョンエネルギーブレッド ±20 eV 最低リバースコア > 50 ピーク閾値なし

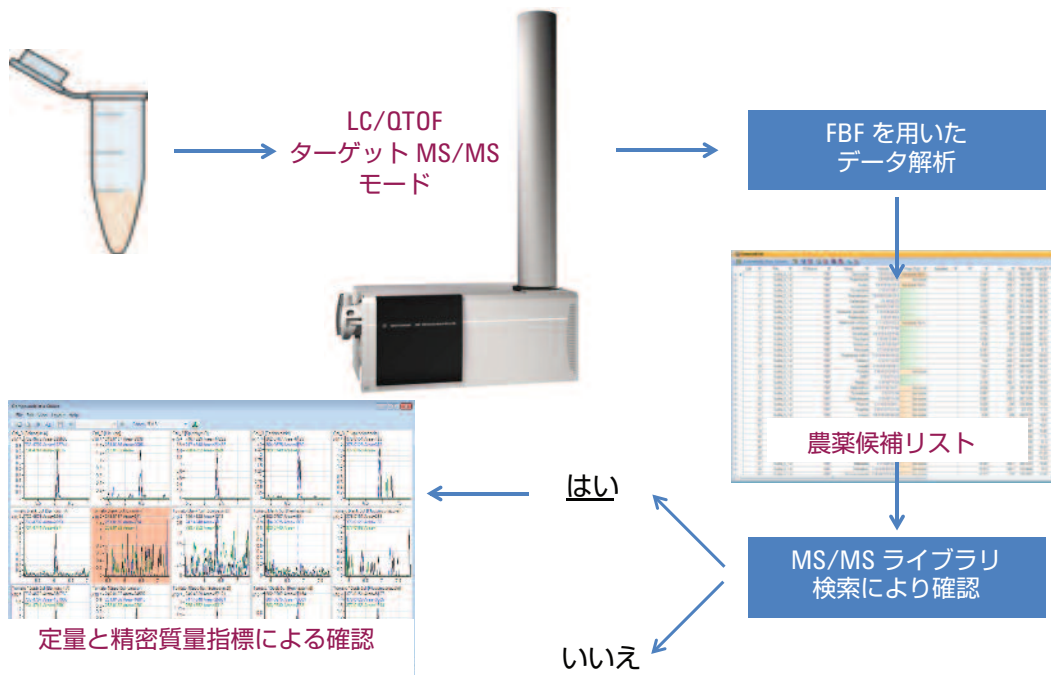


図1. 食品抽出物中農薬の検出、確認、定量に用いる UHPLC-QTOF/MS/MS ワークフロー

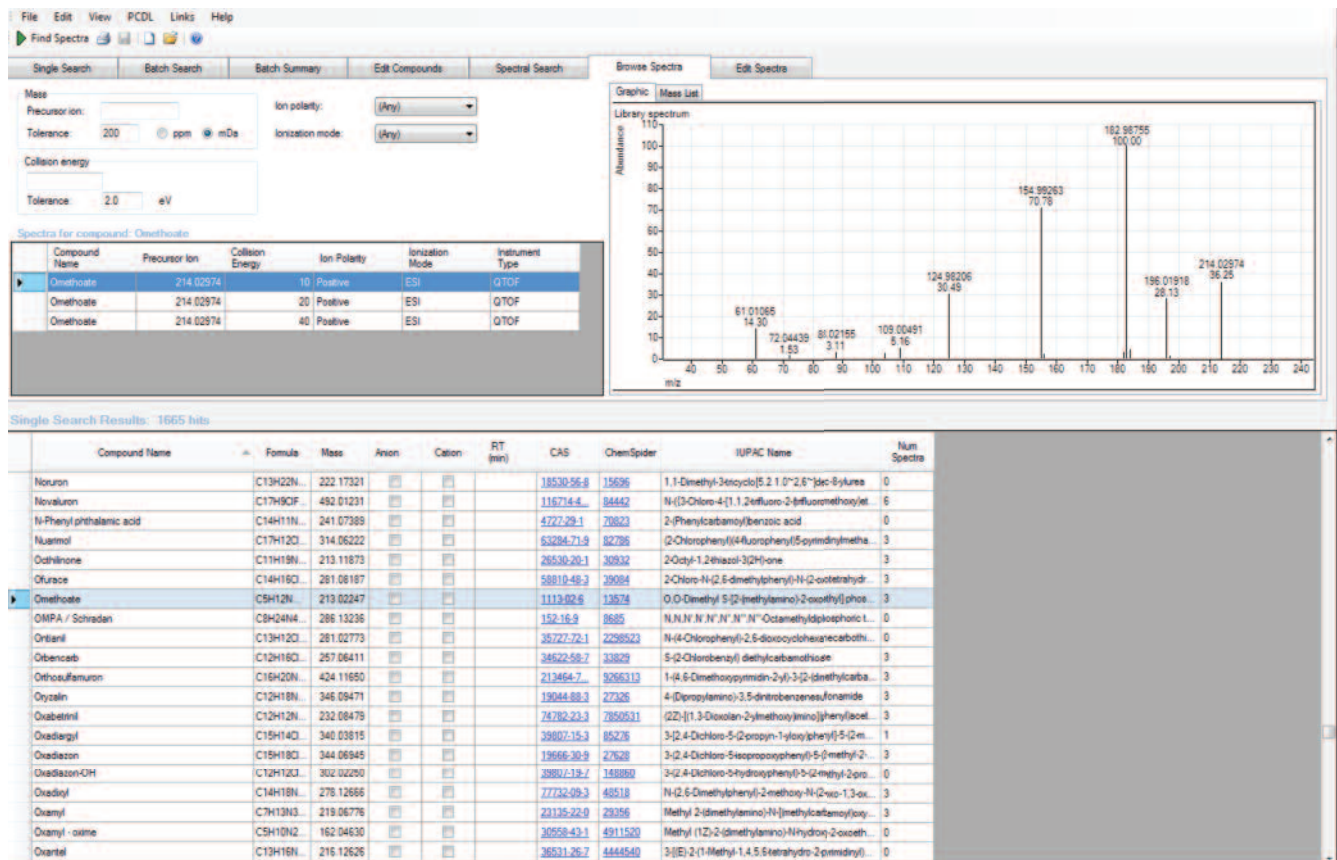


図2. 農薬ライブラリとオメトエートの精密質量スペクトルを示す PCDL ソフトウェア

## 果実および野菜マトリックス中農薬の同定に用いるスクリーニングおよび確認ワークフローのバリデーション

UHPLC 分離およびターゲット MS/MS モードを用いて、55 種類の関連農薬を添加したキュウリ、レモン、ルッコラの抽出液を分析しました。添加農薬のプレカーサイオン ( $[M+H]^+$ ) の質量を、その他の 150 種類の関連農薬のプレカーサ質量とともに、ターゲットリストに加えしました。FBF アルゴリズムを用いて化合物を検索しました。このアルゴリズムでは、精密質量データベースに含まれるすべてのターゲット化合物について、予想されるイオン種の抽出イオンクロマトグラムが自動的に生成されます。ピークスペクトルが抽出され、実験により測定された結果がデータベースエントリの算出値と比較されます。精密モノアイソトピック質量、同位体比、同位体間隔、リテンションタイムの一致度をもとに、結果にスコアがつけられます。図 3 では、ルッコラの QuEChERS 抽出物に添加したメチダチオンについて、FBF アルゴリズムで得られた化合物クロマトグラムとピークスペクトルを示しています。

自動的に生成された抽出イオンクロマトグラム (EIC) では、選択したすべてのメチダチオンの付加種のシグナルがまとめられています (A)。添加量が 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  に相当する低濃度で、マトリックスがきわめて複雑な場合でも、238.2 (ピーク間ノイズアルゴリズム) というきわめて良好なシグナル/ノイズ比 (S/N) が得られています。図 3B では、検出されたすべての付加種について、理論上の同位体パターン (赤いボックス) と比較したメチダチオンの化合物スペクトル (緑の中心線シグナル) を示しています。図 3C では、主要な  $[M+H]^+$  種を拡大した同じ図を示しています。このソフトウェアでは、11 のイオンを、同位体シグナルを含むメチダチオンの付加種に割り当てることができました。また、マトリックスのバックグラウンドシグナルが最大  $3 \times 10^6$  カウントの強度で共溶出する場合でも、シグナル強度は予想される同位体比と良好に一致しました。その結果、メチダチオンについて、全体的に 95.7 (100 点満点中) というハイスコアが得られました。このスコアは、質量精度スコア (100 中 97.6)、同位体アバンドランススコア (100 中 93.5)、同位体間隔スコア (100 中 97.8) の組み合わせを反映しています。

表 4 は、キュウリ抽出物に添加し、ポジティブモードで測定した 53 種類の農薬の化合物表を示しています。

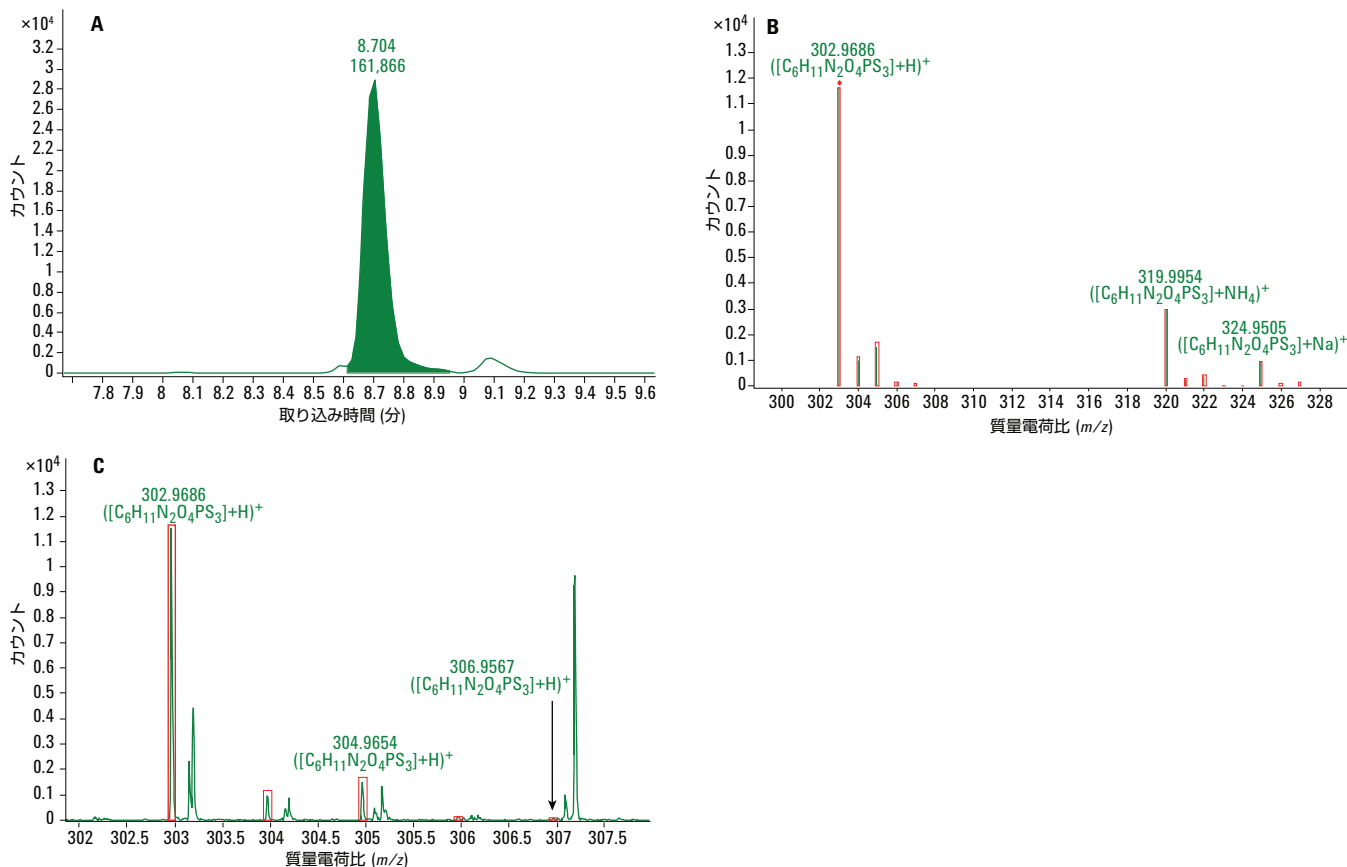


図 3. Find by Formula アルゴリズムにより得られたメチダチオンの化合物クロマトグラムとピークスペクトル。濃度 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ルッコラの MRL の 50 %) でルッコラの QuEChERS 抽出物に添加。

表 4. 濃度 10 µg/kg でキュウリの QuEChERS 抽出物に添加し、ポジティブモードで測定した農薬 53 種類の化合物表

化合物名	RT	質量	分子式	質量誤差 (ppm)	トータルスコア	質量スコア	同位体アバundanceスコア	同位体間隔スコア
アセタミプリド	4.704	222.0672	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>	-0.12	97.88	99.94	97.37	98.85
アゾキシストロビン	9.384	403.1171	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	0.77	97.48	99.38	99.33	99.92
ビフェナゼート	10.48	300.1474	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-2.89	81.58	94.96	76.84	48.77
ボスカリド	9.85	342.0323	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	-1.15	95.49	98.18	82.18	97.04
ブプロフェジン	13.956	305.1563	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O S	0.37	98.44	99.92	92.61	99.37
カルバリル	7.012	201.0785	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>2</sub>	-1.58	98.63	98.92	97.08	99.72
カルベンダジム	4.047	191.0694	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	-0.4	93.35	99.94	88.37	73.67
クロロピリホス	14.529	348.9259	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> N O <sub>3</sub> P S	-0.97	95.03	99.27	76.61	98.7
クロロピリホスメチル	12.905	320.895	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> N O <sub>3</sub> P S	-0.82	83.91	95.55	78.24	67.44
シヘキサチン	14.711	360.1564	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> Sn	-0.66	79.62	99.67	n.a.	94.31
シプロジニル	11.385	225.1267	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub>	0.4	99.52	99.92	99.44	97.83
DEET (ジエチルトルアミド)	7.989	191.1304	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N O	-0.46	87.17	99.92	97.26	49.5
ジクロロボス	6.272	219.9448	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	-2.83	94.04	96.36	79.63	95.54
ジフェンコナゾール (I)	12.935	405.0648	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	0.35	94.31	99.73	88.64	92.25
ジフロベンズロン	11.404	310.0321	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.17	95.61	99.03	87.03	99.0
ジメトアート	4.734	228.9993	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N O <sub>3</sub> P S <sub>2</sub>	-1.49	98.18	99.01	99.56	91.78
ジメトモルフ	10.122	387.1236	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> Cl N O <sub>4</sub>	-0.29	97.73	99.86	96.81	90.05
ファモキサドン	12.282	374.1288	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-0.89	79.47	99.4	75.86	41.24
フェンヘキサミド	10.798	301.0641	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N O <sub>2</sub>	-1.46	95.37	99	84.52	91.85
フルアジホップ	9.353	327.071	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> N O <sub>4</sub>	-2.56	86.13	95.34	87.34	52.34
フルジオキソニル	9.771	248.0392	C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-2.01	84.76	97.95	58.57	48.92
フルキンコナゾール	10.738	375.0095	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> F N <sub>5</sub> O	-1.36	93.7	98.5	84.06	96.44
フルトリアホル	7.915	301.1025	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O	0.64	93.15	99.71	76.03	96.21
イマザリル	7.5	296.0481	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	0.77	98.46	99.66	95.78	98.73
イミダクロプリド	4.377	255.0522	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0.41	97.53	99.99	91.34	97.02
イプロジオン	11.29	329.0335	C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	0.95	94.0	99.06	84.76	88.52
クレソキシムメチル	11.721	313.1312	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N O <sub>4</sub>	0.64	99.13	99.94	98.53	96.47
リニューロン	9.414	248.0117	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.02	94.33	99.41	75.86	95
マンジプロバミド	9.881	411.1236	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> Cl N O <sub>4</sub>	0.26	98.21	100	91.13	99.52
メタラキシル	8.162	279.1471	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N O <sub>4</sub>	-0.17	98.03	99.89	99.21	98.3
メチダチオン	8.64	301.9614	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P S <sub>3</sub>	1.54	97.46	98.34	98.73	99.92
ミクロブタニル	10.313	288.1147	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl N <sub>4</sub>	-1.9	89.78	97.46	79.86	90.79
ペンコナゾール	11.825	283.064	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	1.15	97.95	99.22	91.67	98.87
ベンジメタリン	14.675	281.1376	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-2.19	75.62	97.09	26.23	50.0
ホスメット	9.032	316.9943	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N O <sub>4</sub> P S <sub>2</sub>	0.72	98.79	98.83	96.57	98.95
ホキシム	12.39	298.0544	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P S	-0.86	99.23	99.95	98.95	96.6
ピペロニルブトキシド	14.252	338.2097	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	-1.06	97.33	99.44	99.55	98.41
ピリミカルブ	6.346	238.1429	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0.36	96.46	99.96	99.04	79.31
ピリミカルブ、デスメチル-	4.529	224.128	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-2.13	81.3	96.34	89.45	13.11
プロパモカルブ	2.885	188.1521	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.89	98.72	98.46	99.66	97.59
プロバルギット	14.94	350.1553	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S	-0.47	98.41	99.52	93.17	99.3
プロビコナゾール (I)	12.132	341.0688	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	3.02	94.19	99.2	95.45	95.38
プロスルホカルブ	13.45	251.1343	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N O S	0.43	97.6	99.99	95.94	92.63
ピラクrostロビン	12.451	387.0987	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	-0.28	97.65	99.92	99.8	98.95
ピリダベン	15.757	364.1379	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> Cl N <sub>2</sub> O S	-0.74	96.98	99.46	88.62	98.56
テフロベンズロン	14.216	379.9735	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.9	83.77	97.16	25.64	94.31
チアベンダゾール	4.565	201.0359	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S	1.01	97.01	99.58	96.38	95.7
チアクロプリド	5.114	252.0235	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> Cl N <sub>4</sub> S	0.49	98.67	99.77	97.28	97.94
チアメトキサム	3.818	291.0191	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> Cl N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	0.76	98.79	99.35	97.35	97.87
チオファネートメチル	6.519	342.0452	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	1.18	95.87	99.09	89.6	97.49
トリアジメホン	10.199	293.093	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.52	93.03	99.78	68.44	95.1
トリアゾホス	10.522	313.0649	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P S	0.33	94.09	99.94	94.34	94.62
トリフロキシストロビン	13.148	408.1298	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-0.16	99.43	99.98	98.57	98.19

主要イオン種の質量エラーと、すべての化合物で得られたスコアを示しています。10 µg/kg に相当する濃度では、規定の設定を用いた FBF アルゴリズムにより、すべての化合物が検出されました。理論値と比較した測定質量の質量誤差は、おおむね 1 ppm 未満でした。低いピーク強度で検出された 7 種類の化合物についてのみ、質量誤差が 2~3 ppm となりました。ほとんどの農薬で、90 (100 点満点中) 以上のスコアが得られました。このデータ処理メソッドで用いた品質フィルターでは、各化合物について 2 つ以上の個別のイオンが必要となります。リテンションタイムと組み合わせれば、通常はこの要件で充分に同定に対応できます。

3 種類の化合物については、全体のスコアが 80 未満で、要検査とフラグgingされました。いずれのケースでも、規定された付加種のアバンダンスが低いために、質量誤差の拡大や同位体シグナルの見落としにつながりました。

分析対象ピーク枠について MS/MS スペクトルを自動的に抽出し、Agilent 農薬パーソナル化合物データベースライブラリに含まれるライブラリスペクトルと照らし合わせました。MS/MS 分析では、プレカーサ質量に依存するコリジョンエネルギーランプを用いているため、同様のコリジョンエネルギー下降パターンをもつライブラリエントリーとライブラリスペクトルの比較に重点を置くために、± 20 eV のコリジョンエネルギーの検索フィルターを適用しました。図 4 では、10 µg/kg に相当する濃度で添加したルッコラ抽出物中のメチダチオンの MS/MS スペクトルと Agilent 農薬 PCDL のライブラリスペクトルを比較しています。メチダチオンのライブラリスペクトルにあるすべての主要フラグメントイオンが、20 eV のコリジョンエネルギーの参照スペクトルと同様の比率で、狭い質量抽出枠内の測定スペクトルにおいても検出されました。精密質量農薬ライブラリの順方向検索により、100 点中 95.9 というスコアが得られ、サンプル中のメチダチオンの存在が確認されました。採取した質量スペクトルのその他のシグナルは、同様のプレカーサ質量をもつマトリックス成分に由来しています。

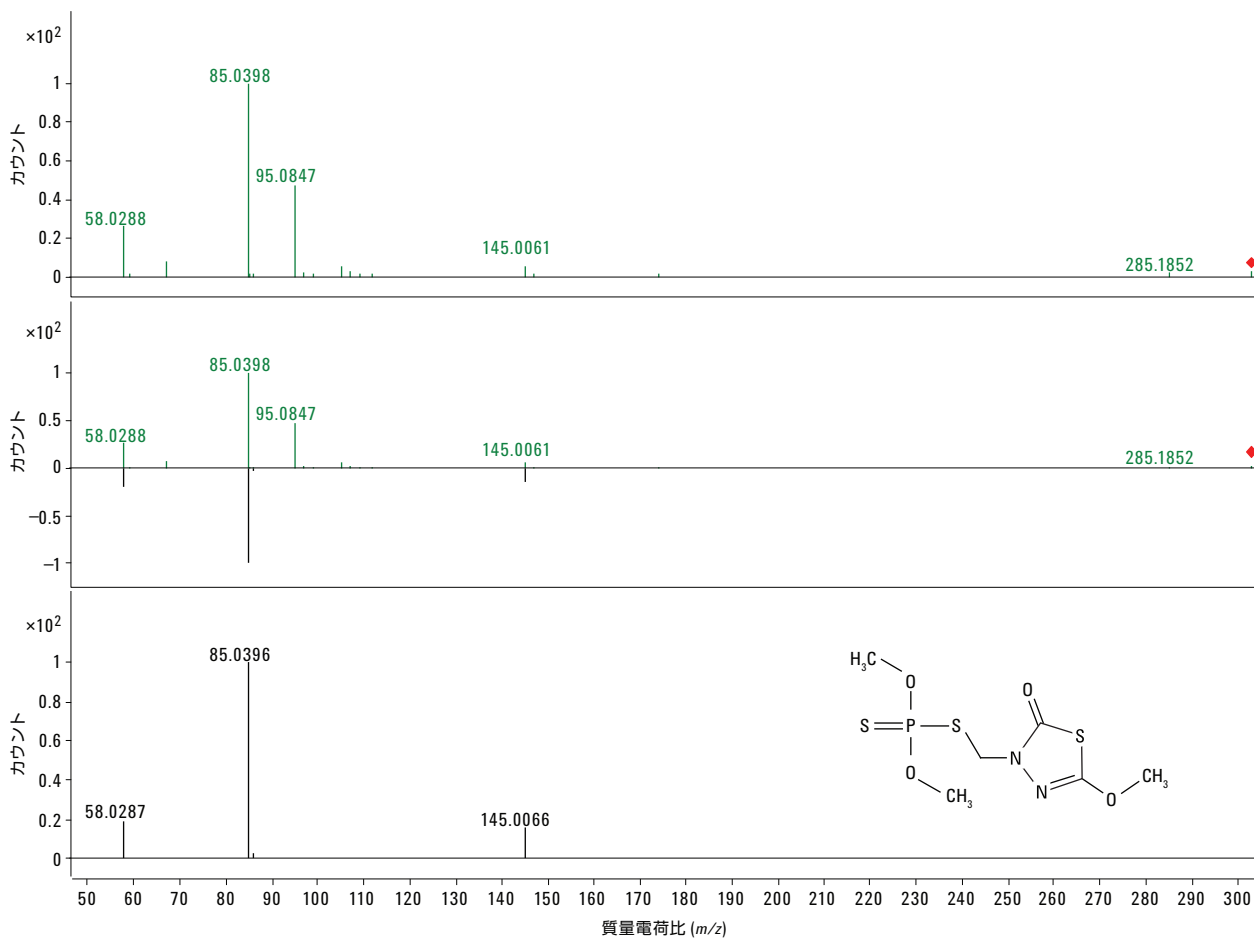


図 4. 添加ルッコラ抽出物中のメチダチオン (濃度 10 µg/kg に相当) の測定スペクトルと Agilent 農薬 PCDL のメチダチオンの参照スペクトルの比較



標準溶液とキュウリ、レモン、ルッコラの添加 QuEChERS 抽出物について、MS/MS ライブラリ検索による同定済み汚染物質の確認と組み合わせた農薬の精密質量スクリーニングのバリデーションをおこないました。標準溶液および添加 QuEChERS 抽出液の農薬濃度は、5、10、50、100 ng/mL としました。表 5 に、Find by Formula アルゴリズムと表 3 のパラメータを用いた自動データ解析により得られた結果をまとめています。ほとんどの化合物はポジティブモードで検出されました。2,4-D および MCPA はネガティブモードでのみ検出されました。いくつかの化合物は、両方のモードで検出されました。

添加農薬の大多数は、複雑なマトリックス中に 5 µg/kg 相当の濃度で含まれている場合でも、FBF アルゴリズムにより問題なく検出できました。また、ほとんどの農薬について、この濃度で有意な MS/MS スペクトルが得られました。これにより、PCDL に含まれる MS/MS スペクトルを用いたライブラリ検索による化合物確認が可能になりました。

分析に使用した条件下では、一部の化合物の優勢付加種が [M+H] イオンではなく、対応するナトリウム付加物またはアンモニア付加物のライブラリスペクトルを利用できませんでした。そうした化合物には、アスタリスクマークをつけています。添加実験に用いたキュウリサンプルでは、もっとも可能性の高い汚染物質は低濃度のイプロジオンでした。この物質は、殺菌剤としてキュウリ栽培で用いられています。ブランクサンプルのその他の陽性物質は、すべてきわめて低濃度で、キャリアオーバーにより生じた可能性が高いと見られます。

データベースとライブラリにさらに多くの化合物を追加し、データ解析の範囲を 570 種類の最重要農薬にまで拡大しました。そうした農薬のうち、およそ 300 種類については、リテンションタイム情報を利用できます。このデータベースを分子式ソースとして FBF アルゴリズムに適用したところ、マトリックスサンプル中の農薬スクリーニングにおいて、さらに複数の汚染物質候補が検出されました。その結果を表 6 にまとめています。ルッコラ抽出液については、リテンションタイム情報を含めた 300 種類の化合物データベースを適用したところ、55 の農薬候補が追加で検出

されました。リテンションタイム情報のない 570 種類の化合物データベースを適用した場合には、166 の農薬候補が追加で検出されました。すべての農薬候補のプレカーサ質量は、ターゲット MS/MS メソッドのプレカーサ質量として含まれています。これらの農薬候補のいずれについても、農薬参照ライブラリを用いたターゲット MS/MS スペクトルの比較では確認できませんでした。複雑性の低いキュウリおよびレモンマトリックスでも、同様の結果になりました。レモン抽出物では、300 種類の化合物データベースを用いた場合は 13 の農薬候補、リテンションタイム情報のない 570 種類の化合物データベースを用いた場合は 119 の農薬候補が追加で検出されました。キュウリ抽出物では、300 種類の化合物データベースを用いた場合は 6 の農薬候補、570 種類の化合物データベース (リテンションタイム情報なし) を用いた場合は 79 の農薬候補が検出されました。どちらのマトリックスでも、Agilent 農薬 PCDL のライブラリ検索により、偽陽性の可能性を排除することができました。

## 定量分析の検証

このメソッドの MS ドメインデータを用いて、添加抽出物と複数の公式対照サンプルについて、(半) 定量分析をおこないました。定量メソッドに最適なイオンについては、50 ng/mL 標準溶液データファイルを用いて、定性ソフトウェアから抽出した化合物分析結果をもとに選択しました。これらの結果を MassHunter Quantitative ソフトウェアで用いられる化合物変換ファイル (.cef) にエクスポートし、定量メソッドを自動作成しました。この方法により、それぞれの相対アバンドンスをもとに、検出された付加種および同位体シグナルからクオンティファイアイオンおよびクオリファイアイオンを自動的に選択しました。

55 種類のターゲット農薬のほとんどについて、分析したすべてのマトリックスで TOF モードの定量下限が 5 ng/g を下回りました。直線範囲は最大 4 桁でした図 6E と 6F は、MS ドメインデータで得られたピリミカルブとボスカリドの検量線を示しています。

表 5. ターゲット MS/MS モードとライブラリ検索による果実および野菜中農薬のスクリーニングと確認の結果のまとめ(緑: MS/MS ライブラリ確認により自動的に検出され確認された化合物、黄:自動的に検出されたが、適切な MS/MS スペクトルが利用できなかった化合物、\*優勢付加種についてスペクトルがない化合物、\*\*\*ネガティブイオンモードで採取された化合物分析結果)

	キュウリ					レモン					ルッコラ				
	Blank	5 ppb	10 ppb	50 ppb	100 ppb	Blank	5 ppb	10 ppb	50 ppb	100 ppb	Blank	5 ppb	10 ppb	50 ppb	100 ppb
2,4-D***															
アセタミプリド															
アゾキシストロピン															
ピフェナゼート															
ボスカリド															
ブプロフェジン															
カルバリル															
カルベンダジム															
クロルピリホス															
クロルピリホスメチル															
シヘキサチンデヒドレート*															
シプロジニル															
DEET															
シクロロポス*															
ジフェンコナゾール															
ジフロベンスロン															
ジメアート															
ジメモルフ															
ファミキサドソ*															
フェンヘキサミド															
フルアジホップ															
フルジオキシニル***															
フルキンコナゾール															
フルトリアホル															
イマザリル															
イミダクロプリド															
イプロジオン															
クレソキシムメチル															
リニューロン															
マンジプロバミド															
MCPA***															
メタラキシル															
メチダチオン															
マイクロフタニル															
ベンコナゾール															
ベンジメタリン															
ホスメット															
ホキシム															
ピベロニルプトキシド*															
ピリミカルブ															
ピリミカルブ、デスメチル															
プロバモカルブ															
プロバルギット*															
プロビコナゾール															
プロスルホカルブ															
ピラクロストロピン															
ピリダベン															
テフロベンスロン															
チアベンダゾール															
チアクロプリド															
チアトキシサム															
チオファネートメチル															
トリアジメホン															
トリアソホス															
トリフロキシストロピン															

表 6. Find-By-Formula データマイニングアルゴリズムの分子式ソースとしてリテンションタイム情報がある/ない大規模化合物データベースを適用した場合に、ブランク QuEChERS マトリックス (N = 5) において精密質量ライブラリ検索により検出および確認された農薬候補の数。

	キュウリ	レモン	ルッコラ
Find by Formula により同定された農薬候補			
RT が必要 (300 種類のターゲット化合物)	6 ± 2	13 ± 6	55 ± 20
MS/MS ライブラリ検索により確認	0	0	0
RT オプション (570 種類のターゲット化合物)	73 ± 2	119 ± 6	166 ± 24
MS/MS ライブラリ検索により確認	0	0	0

図 5 では、各種のサンプル (横列で整理) および各種の農薬 (縦列で整理) について、MassHunter Quantitative ソフトウェアの化合物 at a glance 画面のスクリーンショットを示しています。

表 4 に示すように、ピークのスペクトルの同位体パターンを理論上予想されるパターンと比較し、類似性にもとづいてスコアを割り当てることが可能です。このアプローチは、MassHunter Quantitative ソフトウェアでも導入することができます (パターン

マッチング)。クオンティファイア/クオリファイアのコンセプトと精密質量分析により、分析結果の信頼性が高まり、バッチ処理における効率的なデータ検証が可能になります。図 5 では、最低の同位体マッチスコアが外れ値と特定されています。これをもとに、質量精度と同位体パターンの一致度が化合物を同定するのに十分ではないサンプルがフラグging (赤) されています。

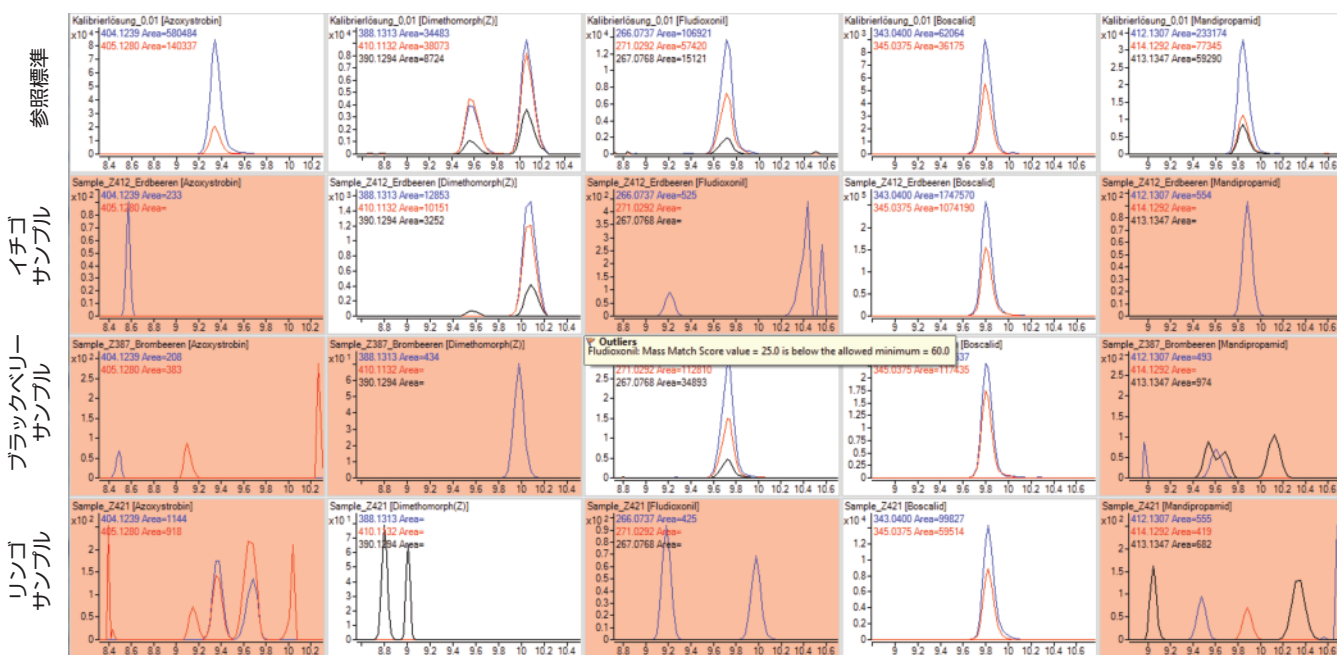


図 5. 複数サンプル中の複数化合物を示す MassHunter Quantitative ソフトウェアの化合物 at a glance 画面のスクリーンショット。精密質量指標を用いて外れ値をフラグgingしています。

## 実際のサンプルの分析

ワークフローのバリデーションに用いた添加マトリックスサンプルに加えて、このUHPLC-QTOFメソッドを用いて、ルーチンモニタリングラボから入手したサンプルを分析しました。これらのサンプルは、LC/MS/MS または GC/MS でも分析され、複数の残留農薬が検出されました。

図 6A と 6B は、リンゴサンプルの残留農薬として検出されたピリミカルブとボスカリドのクロマトグラムとスペクトルを示しています。図 6C と 6D では、分析で得られたスペクトルと関連するライブラリスペクトルを比較しています (パターンマッチング)。ピリミカルブについては、分子イオンの質量誤差が  $-0.54$  ppm で、質量スコアは 99.2 でした。同位体パターンマッチスコアは 97.0 でした。ボスカリドについては、質量誤差が  $-0.15$  ppm で、質量スコアは 97.5 となりました。同位体パターンマッチスコアは 93.0 でした。

このリンゴサンプルからは 10 種類の農薬が検出され、良好な質量スコアとパターンマッチスコアが得られました。これらのスコアを関連するリテンションタイムスコアと統合したところ、10 種類の農薬すべてで 85 を超えるスコアが得られました。うち 7 種類の農薬について、ターゲット MS/MS モードと精密質量ライブラリ検索により、さらに確認をおこないました。残りの 3 種類の化合物については、比較できる MS/MS スペクトルがライブラリに存在しませんでした。

ターゲット MS/MS データではさらに 5 種類の農薬が検出され、ライブラリ検索により高いライブラリマッチスコアで同定されました。これらの農薬の濃度はいずれも  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  未満で、報告が必要な閾値を下回っています。

表 7 では、4 種類のサンプルについて、このUHPLC-QTOF/MS/MSメソッドで得られた分析結果と公式対照分析結果を比較しています。トリプル四重極 LC/MS/MS または GC/MS で検出されたすべての農薬が、精密質量スクリーニングメソッドにより検出されました。同定された化合物の濃度も、すでに測定されていた濃度と良好に一致しました。パセリサンプルだけは、一部の化合物の濃度が対照分析で得られた分析結果よりも大幅に低くなりました。これは、検量線が溶媒キャリブレーションをベースにしており、実際のサンプルにおけるマトリックス抑制により、農薬化合物の見かけの回収率が低下したためと考えられます。マトリックスマッチキャリブレーションやその他のメソッドを用いてマトリックス効果を補正すれば、公式対照分析の結果との一致度は高くなるものと予想されます。

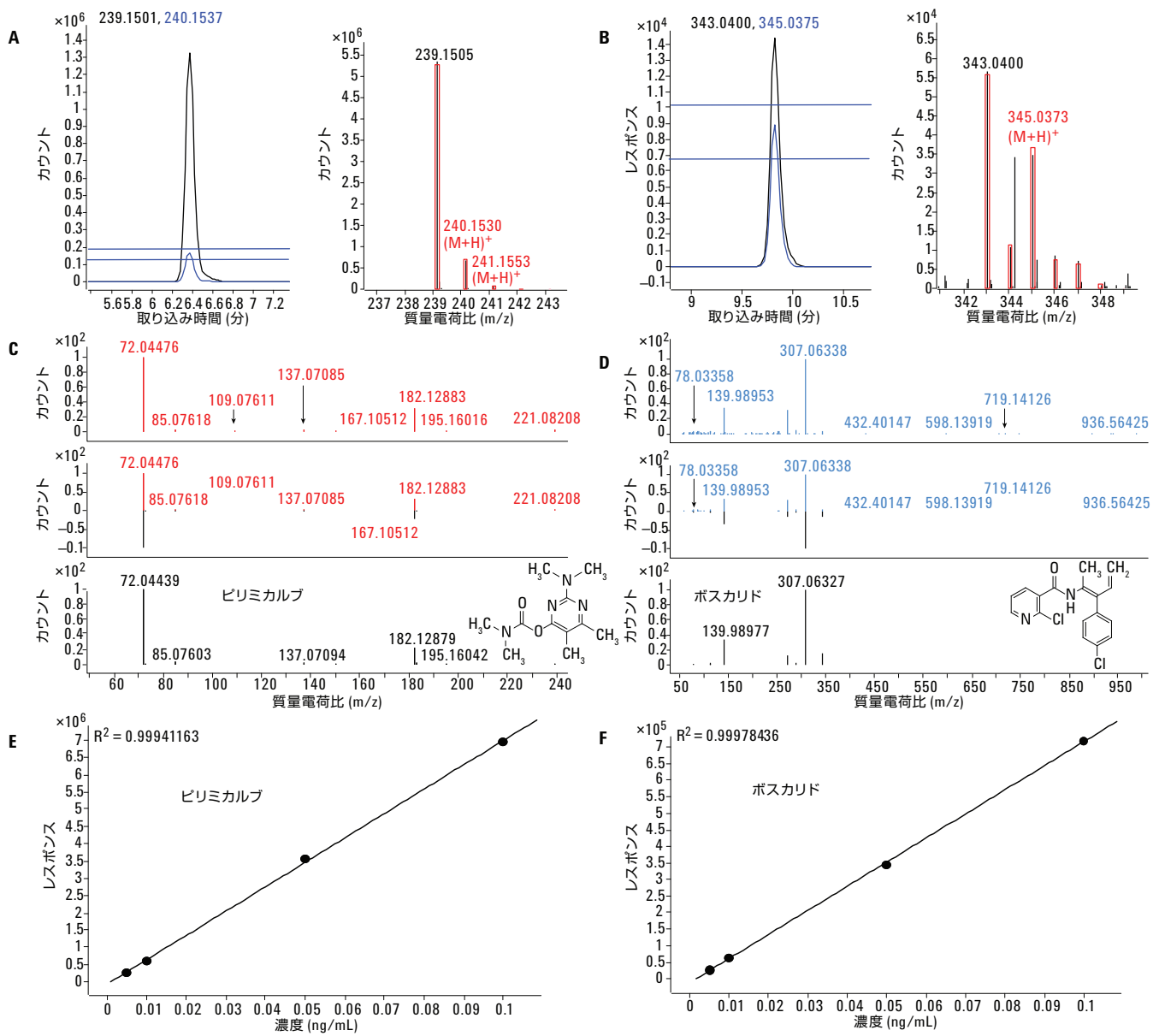


図 6. 農業モニタリングラボから入手したリンゴサンプルに含まれる農薬の LC/QTOF/MS スクリーニング、確認、定量結果。ピリミカルブとボスカリドの関連化合物クロマトグラム、TOF および MS/MS スペクトルとライブラリスペクトルとの比較、両化合物の検量線を示しています。

表 7. 4 種類のサンプルにおける公式対照分析 (トリプル四重極 LCMS および GCMS) の結果と UHPLC-QTOF/MS/MS メソッドで得られた結果の比較

化合物	リンゴ ドイツ		イチゴ オランダ		ブドウ ブラジル		パセリ ドイツ				
	LC-QQQ および		LC-QQQ および		LC-QQQ および		LC-QQQ および				
	QTOF	GCMS	QTOF	GCMS	QTOF	GCMS	QTOF	GCMS			
アセタミプリド	○	0.01	0.01								
アゾキシストロピン					○	0.06	0.09	○ 0.15	0.34		
ボスカリド	○	0.02	0.02	○	0.24	0.02		○ 0.03	0.14		
カルベンダジム	○	0.02	0.02			○	<0.01				
ジフェンコナゾール	○	<0.01				○	<0.01	0.02	○ 0.03	0.04	
ジメトモルフ				○	<0.01				○ 0.38	0.74	
イミダクロプリド	○	<0.01				○	0.01	0.01			
リニューロン								○	0.01	0.01	
マンジプロバミド					○	<0.01	0.01				
ペンコナゾール	○	<0.01		○	0.05	0.1					
ピリミカルブ	○	0.01	0.18								
ピリミカルブデスメチル	○	0.01	0.01								
プロスルホカルブ								○	0.01	0.01	
ピラクrostロピン	○	<0.01	0.01	○	0.05	0.09	○	<0.01	○	0.02	0.03
チアクロプリド				○	0.03						
チオファネートメチル	○	<0.01					○	<0.01	0.01		
トリフロキシストロピン	○	0.01	0.01					○	<0.01		
トリフロキシストロピン	○	0.01	0.01					○	<0.01		

## 結論

農薬の精密質量 MS/MS ライブラリを作成し、果実および野菜抽出物中農薬の LC/QTOF/MS/MS スクリーニングに応用しました。3 種類の農作物グループに含まれる 50 種類以上の農薬のスクリーニングと同定に関して、このメソッドの有効性を確認することができました。実際のサンプルを用いたルーチンモニタリングプログラムに応用したところ、トリプル四重極 LC/MS および GC/MS メソッドで検出されたすべての農薬が同定されました。定量結果も、すでに得られていた定量分析結果と良好に一致しました。

このアプリケーションノートで紹介した Agilent 農薬 PCDL は、(p/n G3878CA) として提供されています。または、クロマトグラフィカラム、包括的な農薬標準、アプリケーションサポートを含む p/n (G3878AA) としてもご利用いただけます。

## 参考文献

1. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed, Document N° SANCO/12495/2011. Implemented by 01/01/2012.  
[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcontrol_en.pdf)
2. 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.
3. Agilent TOF LC/MS and Q-TOF LC/MS Screening of Pesticides - Workflow Guide, Agilent publication 5990-7072EN, June 2012
4. Analysis of Pesticide Residues in Spinach Using Agilent SampliQ QuEChERS AOAC Kit by LC/MS/MS Detection, Agilent application note 5990-4248EN, January 2012
5. Codex Classification of Foods and Animal Feeds (Section 2 of Codex Alimentarius, Second Edition, Volume 2 (1993)).
6. Glauner, T. and Zavitsanos, P.: Electrospray Operational Parameters in TOF-MS, in Amadeo R. Fernandez-Alba, editor: Comprehensive Analytical Chemistry, Vol. 58, Elsevier, 2012, pp. 273-305. ISBN: 978-0-444-53810-9

## 詳細

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト [www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

[www.agilent.com/chem/jp](http://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。

本資料に記載の情報、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. 2013

Printed in Japan

April 24, 2013

5991-2227JAJP



**Agilent Technologies**