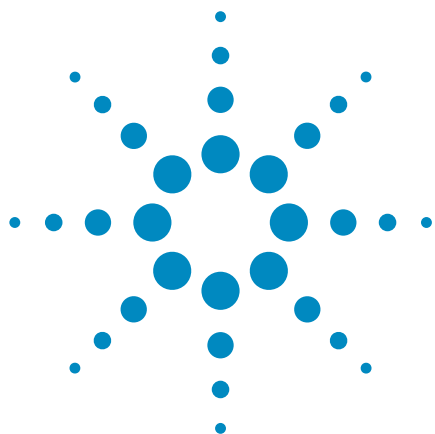




GC/Q-TOF と 精密質量農薬データベースによる 食品中の残留農薬のスクリーニング

アプリケーションノート

食品

著者

Amadeo R. Fernandez-Alba, Samanta Uclés, and
Noelia Belmonte-Valles
Pesticide Residue Research Group
Department of Hydrogeology and Analytical
Chemistry
University of Almería
Almería, Spain

Joerg Riener
Agilent Technologies GmbH
Waldbronn, Germany

概要

Agilent 7200 GC/Q-TOF と Agilent MassHunter Qualitative Analysis の All Ions ワークフロー、および世界初の市販精密質量農薬ライブラリを連携して、5 種類の食品マトリックス中の残留農薬を高速にスクリーニング、同定、および定量情報の生成を実施しました。このテクニックは偽陽性を排除するのに有効であるだけでなく、高速性と高い真度を実現していることにより、農薬スクリーニングおよび定量作業の生産性が大幅に向上します。最新の GC/Q-TOF 農薬ライブラリと独自の All Ions ソフトウェアツールを用いたスクリーニングワークフローにより、複雑なマトリックス内の 10 ppb という極めて低いレベルの農薬を検出することができます。



Agilent Technologies

はじめに

食品や食品原材料の国際的な取引が増加するにつれ、食品安全性がさらに重要視されるようになっていきます。最新の農業スクリーニングでは、1,000 を超える農業とその代謝物について考慮する必要があります。これらのうち 600 ～ 700 の化合物は、ルーチンモニタリングプログラムに組み込むことができます。試験方法は、一度に多数の化合物を処理できる必要があるのですが、同時に、多数の異なる食品マトリックスに由来するマトリックス干渉を回避できる必要があります。農業スクリーニングに関しては、世界的にますます重要視されるようになってきており、欧州連合 (EU) のガイドライン SANCO/12571/2013 [1] を導入する際にも規定されています。最新の改訂では、データベースまたはライブラリを使用した、定量的なスクリーニングに関する基準が規定されています。四重極飛行時間型質量分析計 (Q-TOF) を用いた、農業スクリーニングに関する精密質量手法では、信頼性の高い農業同定が実施でき、事実上無制限の数の化合物を同時にスクリーニングすることが可能です。多数の重要な化合物に対して、ガスクロマトグラフィー (GC) と Q-TOF 質量分析装置を連携させることは、スクリーニング、確認、および定量を実施するための理想的な分析ツールになります。これは、微量濃度のターゲット化合物と予期しない化合物の両方の場合に適用され、さらにこれらが複雑なマトリックス内に存在する場合でも同様です。

このアプリケーションノートでは、GC/Q-TOF と電子イオン化 (EI) を用いた、さまざまな食品内に含まれる農業残留物のスクリーニングのワークフローについて紹介します。この際、リテンションタイムロック GC メソッド [2]、メソッドの堅牢性を強化するためのミッドカラムバックフラッシュ [3]、および画期的な精密質量農業スペクトルライブラリも組み合わせて使用します。次に、Agilent MassHunter ソフトウェアにより、パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) に含まれている 700 を超える農業のスクリーニングを自動化します。Agilent All Ions ワークフローでは、PCDL の各化合物に対して特有の精密質量イオンを選択し、サンプルクロマトグラムからこれらのイオンを抽出します。ヒットを検証するために、共溶出プロットと共溶出スコアを作成し、抽出された精密質量イオンの共分散を求めて値に注目します。共溶出スコアはリテンションタイムだけでなく、ピーク幅やピーク対称性などのすべてのクロマトグラフィーピーク情報を用いて、特有なイオンの共分散を計算します。

この GC/Q-TOF スクリーニングは、GC/MS/MS ターゲット化合物分析を補完する手法です。さらに、クロマトグラムと EI フルスペクトルが取り込まれているため、レトロスペクティブデータ分析も使用可能です。予期しない化合物に対しては、高分解能の精密質量データを用いることにより、即座に同定して調査することができます。以降の作業において、引き続き定量スクリーニングを実施することが重要であると判断した場合、イオンに関する重要な情報を定量メソッドに簡単にエクスポートできます。必要な場合、一度の分析で数百種類の農業を定量することができます。

実験手法

試薬および標準溶液

高純度の農業標準試料はすべて、Dr. Ehrenstorfer 社 (アウクスブルク、ドイツ)、Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ)、および Riedel-de Haën 社 (ゼールツェ、ドイツ) から入手し、 -30°C で保管しました。各農業の原液 (1,000 ～ 2,000 mg/L) はアセトニトリルで調製し、 -20°C の暗所で茶色のスクリュキャップ付ガラスバイアルに保管しました。また、最適化に使用する個別の標準溶液、およびすべての標準試料をアセトニトリルに混合した 10 mg/L 混合液を、標準原液から作成しました。この標準混合溶液は、酢酸エチルで適切に希釈してキャリブレーションに使用しました。酢酸エチルは、Fluka Analytical Pestanal 社、アセトニトリルは Sigma-Aldrich 社 (シュタインハイム、ドイツ)、そして MgSO_4 は Panreac Quimica S.A. 社 (バルセロナ、スペイン) から入手しました。また、1 級-2 級アミン (PSA) 充填剤は Supelco 社 (ペンシルバニア州ベルフォント)、および NaCl は J.T. Baker 社 (デーフエンテル、オランダ) から入手しました。

機器

この実験には、Agilent 7890B GC システムと Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF システムを使用しました。分析条件を表 1 に示し、機器のシステム構成を図 1 に示します。

サンプル前処理

野菜と果実のサンプルを地元の市場から入手しました。野菜と果実のブランク抽出物を使用して、バリデーション用のマトリックスマッチング標準試料を作成しました。このようにして、以前に報告した [4]、QuEChERS メソッドを用いて 5 種類の果実と野菜 (リンゴ、ニンジン、ニラネギ、トマト、およびオレンジ) を抽出しました。野菜の抽出物には、異なる濃度 (10 ～ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲) の標準試料の混合物を添加し、その後 GC/Q-TOF で分析しました。

表 1. ガスクロマトグラフおよび質量分析計の分析条件

GC 条件	
カラム	Agilent HP-5MS Ultra Inert, 15.0 m × 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 19091S-431UI) マルチモード注入口、 アウトレット圧力制御ティ Agilent HP-5MSUI, 15.0 m × 0.15 mm, 0.15 µm (p/n 19091S-431UI) 注入口圧力制御ティ アウトレット真空
注入口	マルチモード注入口
注入モード	スプリットレス
注入量	1.0 µL
注入口ライナ	ウルトラライナート、スプリットレスライナ、 シングルテーパー、ウール入 (5190-2293)
キャリアガス	ヘリウム、0.96 mL/min 定流量
オープンプログラム	60 °C で 1 分維持 40 °C/min で 60 ~ 120 °C、0 分維持 5 °C/min で 120 ~ 310 °C、0 分維持
リテンションタイムロッキング	18.111 分にクロロピリフォスメチルによるロック
バックフラッシュ	ポストラン、オープン 300 °C で 5 分維持 圧力制御ティ 40 psi、注入口 1 psi
トランスファーライン温度	280 °C
Q-TOF MS 条件	
機器	Agilent 7200 Q-TOF
イオン化モード	EI
MS 温度	イオン源 280 °C、四重極 150 °C
検出モード	45 ~ 550 m/z スキャン
スペクトル採取スピード	5 スペクトル/秒

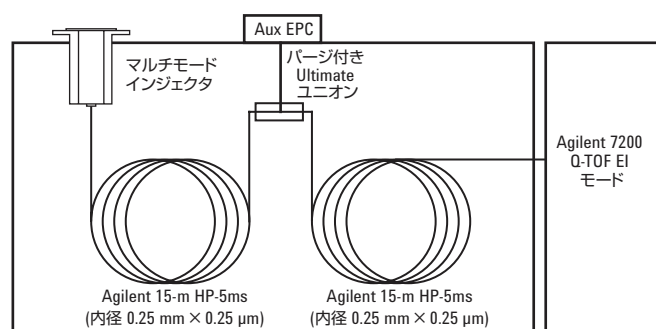


図 1. ミッドカラムバックフラッシュ付きの GC/Q-TOF のシステム構成

データの取り込みと分析

データは、MassHunter Acquisition ソフトウェア B.07.02 を用いて取り込みました。農業スクリーニングのデータ解析は、MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア (B.07.00) の All Ions ツールおよび GC/Q-TOF 農業 PCDL (p/n G3892A) により実施しました。農業定量のデータ解析は、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア (B.07.01) により実施しました。

結果と考察

All Ions ツール

データ解析は、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア (B.07.00) により実施しました。MassHunter Qualitative Analysis の Find by Formula (FbF) にある Fragment Confirmation (フラグメントの確認) という名前の新しいタブで、All Ions MS テクニックのパラメータを設定できます (図 2)。このタブでは、抽出対象となる特有なイオンの数を指定できます。また、リテンションタイム (RT) の差異、最小 S/N 比 (S/N)、および共溶出スコアに基づいて、フラグメントイオンの抽出イオンクロマトグラム (EIC) に対する制限値も設定できます。各 PCDL スペクトルで特有な EI フラグメントの EIC を抽出し、独自の共溶出スコアパラメータを用いて評価します。共溶出スコアは、UV クロマトグラフィーのピーク純度 [1] に似たテクニックにより導出しました。このテクニックでは、ソフトウェアが、アバンダンス、ピーク形状 (対称性)、ピーク幅、RT など複数の因子を考慮に入れて数値を計算します。図 3A は、ニンジン抽出物のプブリメート由来のイオンに対して、EIC を重ね表示した例を示しています。すべてのイオンはクロマトグラフィーの頂点と形状が一致しており、これらのイオンは同一の化合物から得られた可能性があります。リファレンスイオンの強度に対するフラグメントイオンの正規化後の比率を RT 全体にわたってプロットしており、共溶出プロットの検査に使用できます (図 3B)。この例のように、すべてのイオンがリファレンスイオンのピークの間でほぼ 1 に近い比率を示している場合、フラグメントが同一の化合物に属している可能性が高くなります。

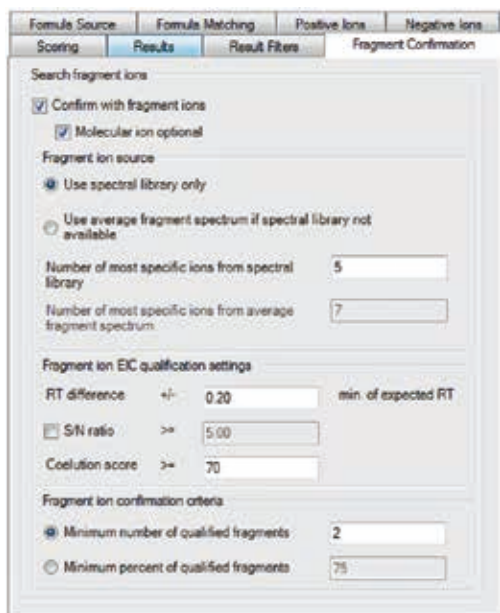


図 2. Agilent MassHunter Qualitative Analysis の Find by Formula (FbF) ツールの Fragment Confirmation (フラグメントの確認) タブ。

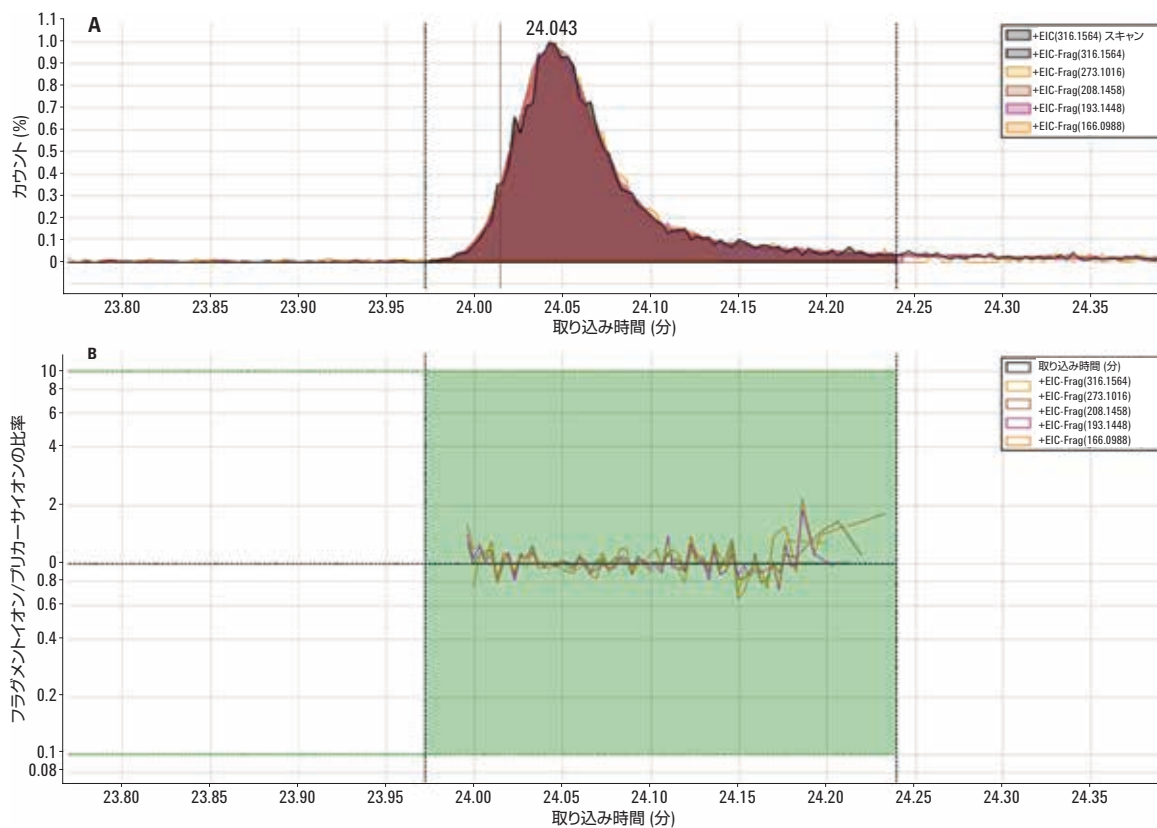


図 3. ニンジン内のプレリメートとリファレンスイオンの比率をグレーで、コリファイアイオンの比率をその他の色で表した EIC の重ね表示。すべてのイオンにおいてクロマトグラフィーのピークが同一であり (A)、計算された共溶出プロットも同一です (B)。すべてのフラグメントイオンは、リファレンスイオンのピークの中間でほぼ 1 に近い比率を示しており、これは共溶出の可能性が高いことを示しています。このことにより、サンプル内のプレリメートが同定されていることを確認しました。

化合物の詳細情報の表示

画面内のすべての化合物を通してスクロールし、この場合は、ブピリメートの EIC の重ね表示、共溶出プロット、各化合物のスペクトルの結果、また同定パラメータを効率よく表示することにより、結果をすばやく簡単に検査できます (図 4)。同定パラメータ単独のパネルを図 5 に示しています。これは測定された質量とリテンションタイム、およびターゲットまたはリファレン

スに関する値と同定のスコアを表しています。All Ions ツールの設定には柔軟性があるため、クオリファイイオン、共溶出スコア、質量抽出範囲、およびその他のパラメータに必要な数値を指定することにより、特定のアプリケーション向けに微調整することができます (図 2)。さらに、RT ロッキングにより、農薬を正確に同定します。

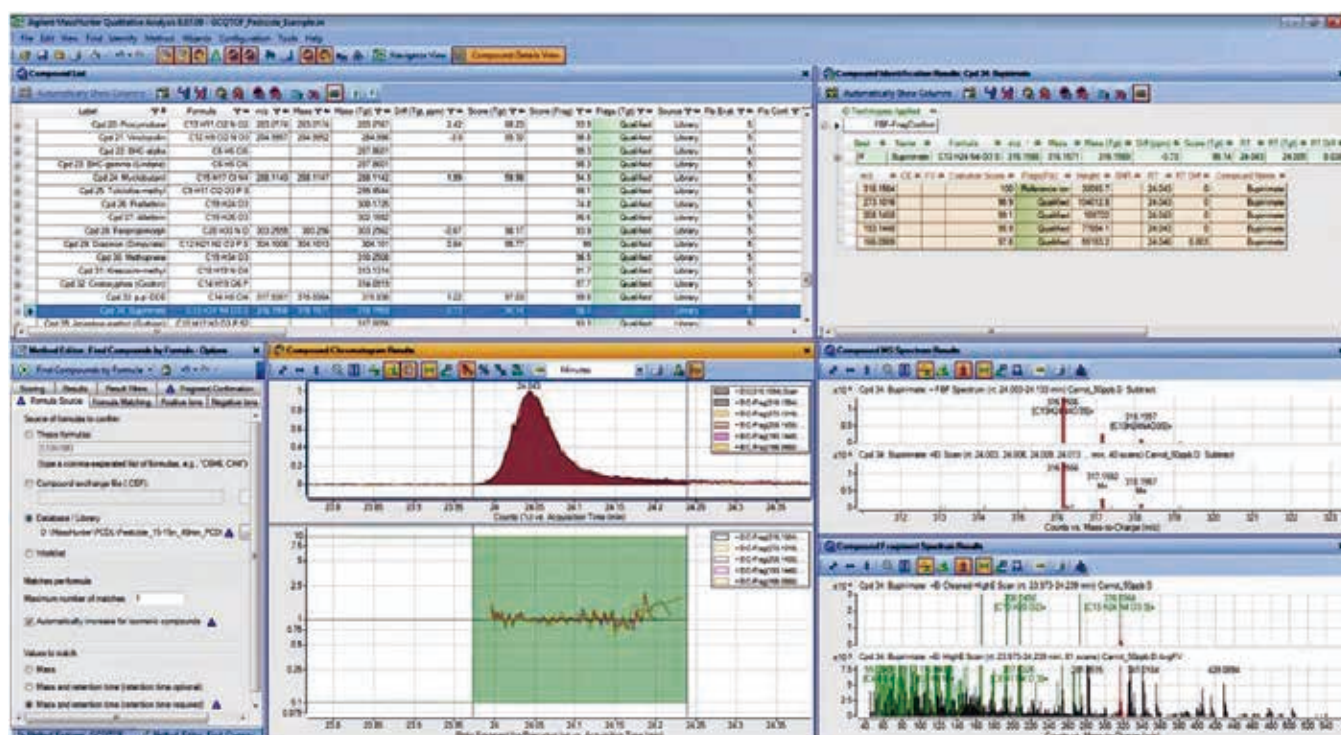


図 4. エンジンの抽出物に添加された農薬に対する Agilent All Ions ツールによる測定結果の概要。



図 5. Agilent All Ions ツールの Compound Identification Results (化合物の同定結果) 画面。

バリデーション分析として、56 の農薬を 5 種類の異なるマトリックス (リンゴ、ニンジン、トマト、ニラネギ、およびオレンジ) に濃度を増加させて添加しました (表 2)。大部分の化合物は、すべてのマトリックスにおいて最低の添加レベル 10 µg/mL (ppb) で検出されました。この結果から、最低でも 2 つの別のフラグメントイオン (濃緑色のセルで表示) およびリテンションタイムにより、化合物が存在することが検証されました。

定量分析

予期しない化合物が検出された場合、その後には定量分析が必要になることがあります。この分析は Compound Exchange Format (CEF) ファイルを使用して、定量データを MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアにエクスポートするだけで設定可能です。

表 2. 4 種類のマトリックスに対する化合物スクリーニングの結果 (10~200 ppb)

化合物	トマト				ニンジン				リンゴ				オレンジ				ニラネギ			
	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200
ジクロルボス																				
ビフェニル																				
2-フェニルフェノール																				
クロルプロファム																				
トリフルラリン																				
HCH α																				
HCB																				
HCH β																				
プロパジン																				
HCH γ (リンデン)																				
テルブチラジン																				
ピリメタニル																				
ダイアジノン																				
ピリミカルブ																				
クロルピリホスメチル																				
パラチオンメチル																				
ピンクロソリン																				
トルクロホスメチル																				
メタラキシル																				
フェンプロピジン																				
フェントロチオン																				
クロルピリホス																				
フェンプロピモルフ																				
ベンジメタリン																				
フィプロニル																				
プロシミドン																				
エンドスルファン α																				
ディルドリン																				
p,p'-DDE																				
ミクロブタニル																				
ブピリメート																				
クレソキシムメチル																				
エンドスルファン β																				
クロロベンジレート																				
p,p'-DDD																				
o,p'-DDT																				
オキサジキシル																				

白 = 未検出、濃緑 = 検出、黄緑 = 検出、定量にクオリファイア使用

表 2. 4 種類のマトリックスに対する化合物スクリーニングの結果 (10~200 ppb) (続き)

Compound	トマト				ニンジン				リンゴ				オレンジ				ニラネギ			
	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200	10	50	100	200
硫酸エンドスルファン																				
p,p'-DDT																				
TPP																				
イブロジオン																				
テトラメリン I																				
プロモプロピレート																				
テトラメリン II																				
ビフェントリン																				
g-シハロトリン																				
アクリナトリン																				
ピテルタノール																				
シベルメリン I																				
シベルメリン II																				
エトフェンブロックス																				
エスフェンバレレート (SS, RR)																				
アゾキシストロビン																				

白 = 未検出、濃緑 = 検出、黄緑 = 検出、定量にクオリファイア使用

CEF ファイルには、定量メソッドの設定に必要な情報が含まれています。つまり、化合物名、リテンションタイム、リファレンスイオン、フラグメントイオン (クオリファイア作成用)、および相対アバンダンスです。MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアが、リファレンスイオンとクオリファイアイオンを自動的に選択することにより、時間を要する手動処理の手間を省きます。メソッドの設定後、疑いのあるサンプルを分析し、定量的な結果を取り込みます。ターンキー自動化処理を用いると、MassHunter はデータを取り込んで定量し、ターゲット化合物に関するレポートを作成することができます。

MassHunter は、以前から定量的な結果を確認するための一般的な環境を提供してきましたが、これらのソフトウェアツールも同様に GC/Q-TOF で使用できます。この場合、Quantitative Analysis ソフトウェアを使用して、定量イオンとクオリファイアイオンを表示できますが、精密質量指標で同定の品質に関するスコアを提供することにより、結果の信頼性のレベルが高くなります。図 6 は、ピリメートと 2 つのクオリファイアイオンの抽出イオンクロマトグラム、および定量イオンに対する比率をプロットしたものを示しています。MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアは、データ処理時、クオリファイアイオンの比率が指定した制限を超えた場合、自動的にフラグを表示します。

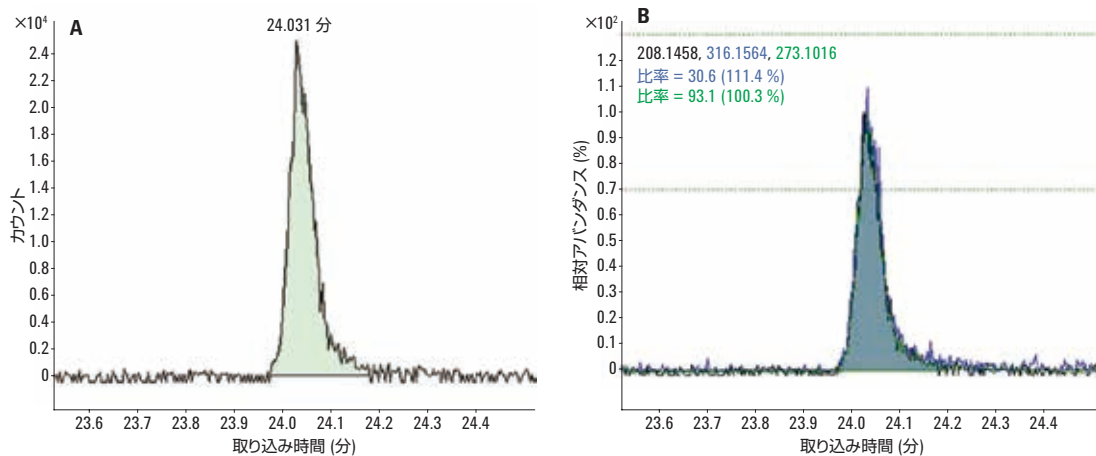


図 6. 定量 (ターゲット) イオン (A)、およびリンゴ内のピリメート 10 µg/mL (ppb) に対する、クオリファイアイオン、予期したクオリファイアイオンと定量イオンの比率 (B) の EIC。

通常、大部分の化合物に必要なキャリブレーション範囲は 10 ~ 200 ng/mL です。一度の分析で多数の化合物を定量する際には、おそらく一部の化合物において、他よりも極めて高いレスポンスが生じる場合があると考えられます。このような化合物では、最高濃度の標準溶液 200 µg/mL で飽和する可能性があります。GC/Q-TOF を使用している場合、レスポンス係数の統合は簡単です。これは、多くの場合、選択対象のさまざまな候補イオンを EI が提供するからです。さらに、質量分析計の分解能によっては、炭素 13 同位体イオンを使用することもあります。ここでは、キャリブレーション範囲に最適なイオンを選択するだけです。ただし、GC/Q-TOF による取り込みが対象にとって適切ではない場合、この選択を適時的に変更することも可能です。レトロスペクティブ分析は、添加物と標準試料を使用した定量メソッドを初めて管理する際には、まさに必要となる手法です。また、この分析は本研究の目的の一部でもあり、結果は個別のレポートとして示す予定です。今のところ、支配的なイオンから離れた条件での調整により、定量作業でメリットが生じている化合物を表 2 に示します (黄緑色のセル)。

結論

Agilent 7200 シリーズ GC/Q-TOF を Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアおよび GC/Q-TOF 農薬 PCDL と組み合わせて効率的に使用することにより、さまざまなマトリックスにおいて 10 ppb という低濃度で農薬残留物をスクリーニングすることができます。この際、独自の Agilent All Ions ツールを使用することにより、正確な同定が保証されます。GC/Q-TOF を使用するメリットは、精密質量高分解能データにより、化合物を確認する際の信頼性が向上する点です。また、レトロスペクティブ分析を実施することができ (特に、予期しないピークの場合)、定性的な分析から定量的な分析にシームレスに移行できる点も挙げられます。

以上は、非常に勇気づけられる結果です。つまり、ラボで新しい化合物について探索する際、過去に収集したデータを再度調査することが可能になるだけでなく、今後は最適化された定量メソッドを作成して拡張するための手法も使用できるようになるためです。

参考文献

1. SANCO/12571/2013.Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2013.
2. V. Giarrocco, B. Quimby, M. Klee, Retention Time Locking: Concepts and Applications, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5966-2469EN, December **1997**.
3. H. Prest, Capillary Flow Technology for GC/MS: A Simple Tee Configuration for Analysis at Trace Concentrations with Rapid Backflushing for Matrix Elimination, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5979-8664EN, June **2008**.
4. L. Rajski, et al. "Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry" *Analyst*, **138**, 921-931 (2013).
5. H. P. Sievert, A. C. J. H. Drouen. "Spectral matching and peak purity in Diode Array Detection" in *High Performance Liquid Chromatography*, New York, Marcel Dekker, 51, (1993).

詳細

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 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. 2016
Printed in Japan
February 9, 2016
5991-5894JAJP



Agilent Technologies