

# Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS システムによる紅茶およびオレンジマトリックス中の多成分残留農薬の分析

## 著者

Kyle Covert and Linfeng Wu  
Agilent Technologies, Inc.  
Santa Clara, California, USA

## 概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS システムを用いて食品マトリックス中の 244 種類の農薬残留物を検出する LC/MS/MS スクリーニングメソッドについて説明します。食品マトリックス中の農薬の検出評価において、有機オレンジと紅茶を選んだ理由は、その複雑さにあります。オレンジマトリックスについては、1 種類を除くすべてのターゲット農薬が、欧州委員会の定めたデフォルト MRL である 10 µg/kg 以下で検出されました<sup>1</sup>。高濃度の紅茶マトリックスについては、239 種類の農薬が 10 µg/kg 以下で検出されました。成分のレスポンスに対するマトリックス効果の調査も行われ、オレンジマトリックス中の農薬の 50%、紅茶マトリックス中の 40% が SANTE ガイドラインの枠内（80 ~ 120 %）で回収されました<sup>2</sup>。このような結果は、6470B トリプル四重極 LC/MS が、濃度の高い食品マトリックス中の農薬を正確かつ厳密に定量するために必要な高感度の要件を満たしていることを証明しています。

## はじめに

多くの生育環境において、高い収穫量をあげるには、農業で農作物を保護することが不可欠です。しかし、私たちが購入する農産物については、農業の使用やその量が懸念されています。特に、最近の有機/非有機表示付きの農作物市場では、食品の真正性や汚染が有機農作物の品質に影響するため、これが特に懸念されます。規制機関（US-EPA<sup>1,3</sup> や欧州委員会<sup>4</sup>など）は、消費者にとって食品が安全なものとなるように、使用できる農業の用途や量を制限する規制を定めています。最大残留基準値（MRL）とは、農業を正しく使用したとき（農業のグッドプラクティス）に、食品や飼料が法的に含有を容認される農業の最高レベルを指します。一般的な MRL は、食品の重量 1 kg に対し  $\mu\text{g}$  ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の桁数（10 億分の 1 (ppb)）であるため、化合物の検出には、非常に感度の高い機器が必要になります。これは特に、紅茶のように、高濃度のマトリックス効果をもたらす多くの内因性化合物を含む食品にあてはまります。

このアプリケーションノートでは、多様度高濃度の食品マトリックスに含まれる 244 種類の農業を検出および定量するための LC/MS/MS スクリーニングメソッドを説明します。アジレントの農業総合混合液を、有機紅茶とオレンジの抽出物にスパイクしました。抽出物の調製は、後述の Agilent QuEChERS 抽出および EN 分散 SPE プロトコルに従って行いました。サンプルの分析には、Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS と組み合わせた 1290 Infinity II LC による、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング（dMRM）メソッドを用いています。6470B トリプル四重極 LC/MS では、

大気開放なしのイオン源のメンテナンスによって機器の稼働時間を延ばす VacShield テクノロジーや、セトリング時間のパラメータ化機能が向上した高速エレクトロニクスなど、いくつかの点でハードウェアの機能が強化されており、非常に短いドウェルタイムで分離ピークの再現性を確保できます。

## 実験方法

### 試薬および標準物質

アジレントの農業総合混合液（部品番号 5190-0551）を用いました。農業総合混合液のサブミックス 8 種類を混ぜ合わせ、さらに作業用農業溶液の最終濃度が  $10 \mu\text{g}/\text{g}$  になるまでアセトニトリル（ACN）で希釈しました。キャリブレーションサンプル調製のため、この溶液を QuEChERS 抽出物にスパイクしました。サンプルマトリックスのメソッド検出限界（MDL）および定量下限（LLOQ）を判断するため、紅茶のサンプル抽出物と有機オレンジの抽出物を使って、濃度 0.5 ~ 100 ppb の 7 種類のキャリブレーションサンプルをそれぞれに用意しました。

すべての試薬と溶媒には、HPLC または LC/MS グレードのものを使用しました。アセトニトリルおよびメタノールは Honeywell（モリスタウン、ニュージャージー州、米国）から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および  $0.22 \mu\text{m}$  コースポイントメンブレンフィルタカートリッジ（EMD Millipore、ピレリカ、マサチューセッツ州、米国）を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。ギ酸およびギ酸アンモニウムは、Fluka（Sigma-Aldrich Corp.、セントルイス、ミズーリ州、米国）で購入しました。

### サンプル前処理法

有機ルーズリーフ紅茶と有機オレンジ（丸ごと）は、地域の食料品店で入手しました。紅茶のサンプル 2 g を 8 mL の水で湿らせ、室温で 2 時間、インキュベーションしました。セラミックホモジナイザ（部品番号 5982-9312）を使って、よく混ぜて均質化したオレンジのサンプルを調製し、抽出物用に 10 g を量って取り出しました。固形の紅茶 2 g と固形のオレンジ 10 g を、10 mL のアセトニトリルを使って 1 分間、しっかりと振とうして抽出しました。混合物それぞれに、Agilent EN 抽出塩（部品番号 5982-6650）1 袋を加え、1分間振とう後、 $3,000 \times \text{g}$  で 5 分間、遠心分離しました。紅茶の上澄み液 6 mL を、高色素 EN 用 Agilent QuEChERS 分散 SPE（部品番号 5982-5356）に添加しました。同様に、オレンジの上澄み液 6 mL を、色のある野菜・果実 EN 用 Agilent QuEChERS 分散 SPE（部品番号 5982-5256）に添加しました。この両方を 1 分間振とう後、 $3,000 \times \text{g}$  で 5 分間、遠心分離しました。結果として生じた上澄み液を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$  シリンジフィルタに通しました。前もって用意しておいた作業用農業溶液を、元の固体食品マトリックスの乾燥重量  $100 \text{ ng}/\text{g}$  (ppb) の紅茶抽出物とオレンジ抽出物にスパイクしました。農業のキャリブレーションサンプルを 7 つのレベル（0.5、1、5、10、20、50、100 ppb）にするため、適切なマトリックスを使ってさらに希釈しました。この希釈液は、1 レベルあたり 6 回の繰り返し注入を行う直前に調製しました。また、両マトリックスの  $10 \text{ ng}/\text{g}$  で信号回収率を比較するため、純アセトニトリルにも農業をスパイクしました。

## 機器

次のモジュールで構成される Agilent 1290 Infinity II LC システムを使用して分離しました。

- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II マルチサンプル (G7167B)、サンプル冷却システム (オプション #100) を搭載
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)

LC システムと、Agilent Jet Stream 技術のイオン源 (G1958-65638) 付きの Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS (G6470B) を組み合わせました。データ採取には、Agilent MassHunter Acquisition (ver. 10.1) ソフトウェアを、データ解析には MassHunter Quantitative Analysis (ver. 10.1) ソフトウェアを使用しました。

## メソッド

LC/MS パラメータは表 1 のとおりです。極性、プリカーサ、プロダクトイオンなどの MRM パラメータは、コリジョンエネルギーとともに、十分に確立されたメソッドを適用しました。イオン源の状態は、選択した反応の悪い分析成分に合わせて最適化しました。データは高速極性切り替え dMRM モードで取得しました。最終抽出物 2  $\mu$ L を LC/MS システムに注入しました。検量線の回帰では、原点に対する直線近似を無視し、1/x の重み付けを使用しました。

表 1. LC/MS パラメータ

Agilent 1290 Infinity II LC システム															
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、3.0 $\times$ 100 mm、1.8 $\mu$ m (p/n 959758-302)														
カラム温度	40 °C														
注入量	2 $\mu$ L														
オートサンブラ温度	4 °C														
ニードル洗浄	フラッシュポートで 10 秒間洗浄 (75/25 メタノール/水)														
移動相	A) 5 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸水溶液 B) 5 mM ギ酸アンモニウム + 0.1 % ギ酸を含むメタノール														
流量	0.400 mL/min														
グラジエントプログラム	<table border="1"><thead><tr><th>時間</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.00</td><td>5</td></tr><tr><td>0.50</td><td>5</td></tr><tr><td>2.00</td><td>40</td></tr><tr><td>13.00</td><td>98</td></tr><tr><td>14.50</td><td>98</td></tr><tr><td>14.60</td><td>5</td></tr></tbody></table>	時間	B (%)	0.00	5	0.50	5	2.00	40	13.00	98	14.50	98	14.60	5
時間	B (%)														
0.00	5														
0.50	5														
2.00	40														
13.00	98														
14.50	98														
14.60	5														
ポストタイム	2 分														

Agilent 6470B トリプル四重極 LC/MS	
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS)
極性	ポジティブおよびネガティブ
ガス温度	225 °C
ドライガス (窒素)	11 L/min
ネブライザガス	30 psi
シースガス	350 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧	3500 $\pm$ V
ノズル電圧	500 $\pm$ V
スキャンタイプ	ダイナミック MRM (dMRM)
Q1/Q2 分解能	ユニット (0.7 amu)
デルタ EMV	$\pm$ 200 V
セル加速電圧	3 ~ 7 V
サイクル時間	500 ms

## 結果と考察

### ダイナミック MRM メソッドと高速分離

従来の Agilent LC/TQ 機器モデル (G6470A) 用に開発された多成分残留農薬スクリーニングメソッドを、6470B トリプル四重極 LC/MS システム (G6470B) に直接適用しました。以前は LC カラムと LC

システムが同じではなかったため、リテンションタイムがわずかにシフトする原因となっていました。MassHunter ソフトウェアダイナミック MRM 更新オプションを使用することにより、すべての農薬のリテンションタイムが自動的に調整されるようになりました。図 1 は、オレンジ抽出物に 1 ng/g の濃度でスパイクされた 244 種類の農薬の MRM クロマトグラムを重ねて表示

したものです。反応の低い農薬があるため、Y 軸を拡大しています。すべての化合物の MRM クロマトグラムは、14.5 分の LC グラジエントでベースライン分離されています。大半の農薬は、デフォルト MRL の 10% で定量化できました。

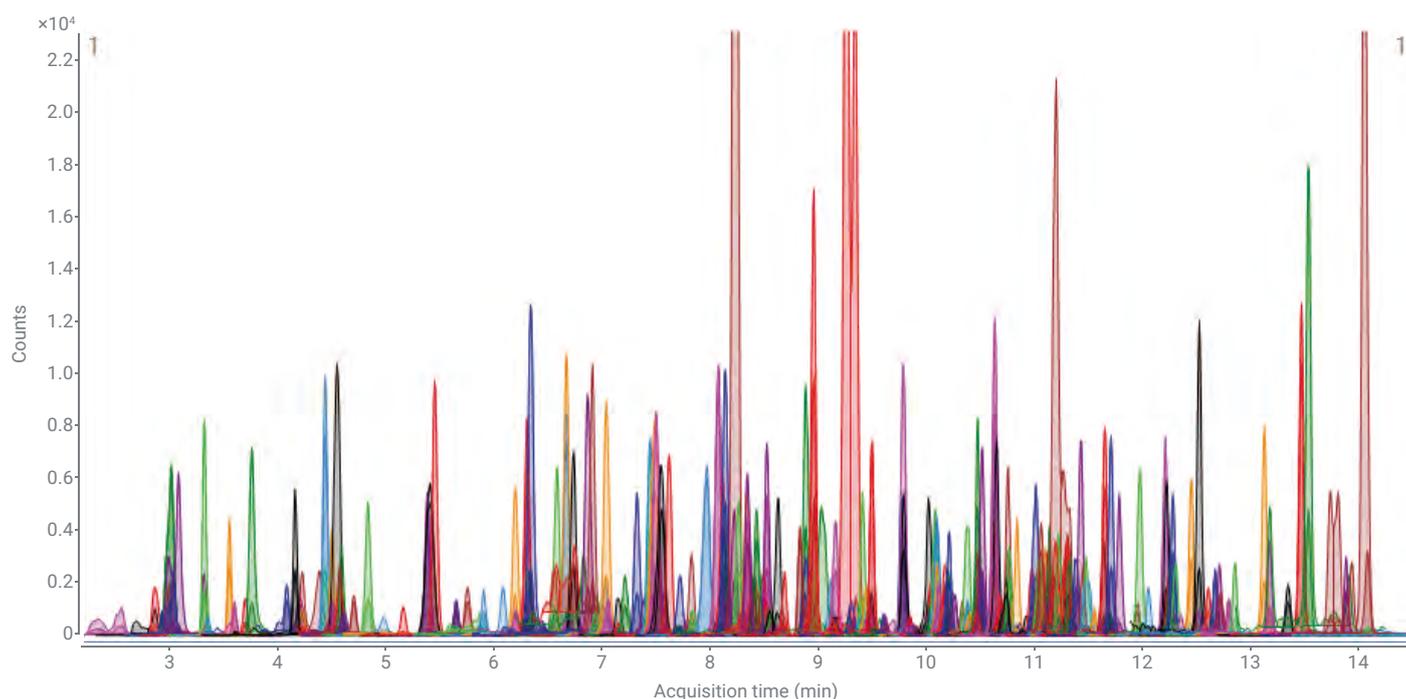


図 1. オレンジ抽出物に 1 ng/g の濃度でスパイクした 244 種類の農薬を重ねて表示した MRM クロマトグラム (反応の低い農薬があるため、Y 軸を拡大)

## 検量線分析

0.5 ~ 100 ng/g の 7 種類の濃度で、検量線に繰り返し注入 (n = 6) することで、多成分残留農薬測定 の 精度 と 真 度 を、紅茶マトリックスとオレンジマトリックスの両方で評価しました。優れた分析精度 (LLOQ 以上で相対標準偏差 (RSD) <20 %) と平均真度 (算出濃度/予想濃度が LLOQ 以上で 80 ~ 120 %) を得られました。検量線

の相関係数 ( $R^2$ ) は、オレンジ抽出物では 244 種類の農薬すべてで、また、紅茶抽出物では 244 種類中 230 種類で 0.99 を超えていました。紅茶で 14 種類の農薬の  $R^2$  値が低かった (<0.99) という結果は、重大なマトリックス効果を反映しています。図 2 は、紅茶マトリックスの代表的な農薬を 4 種類選び、その検量線をプロットしたものです。

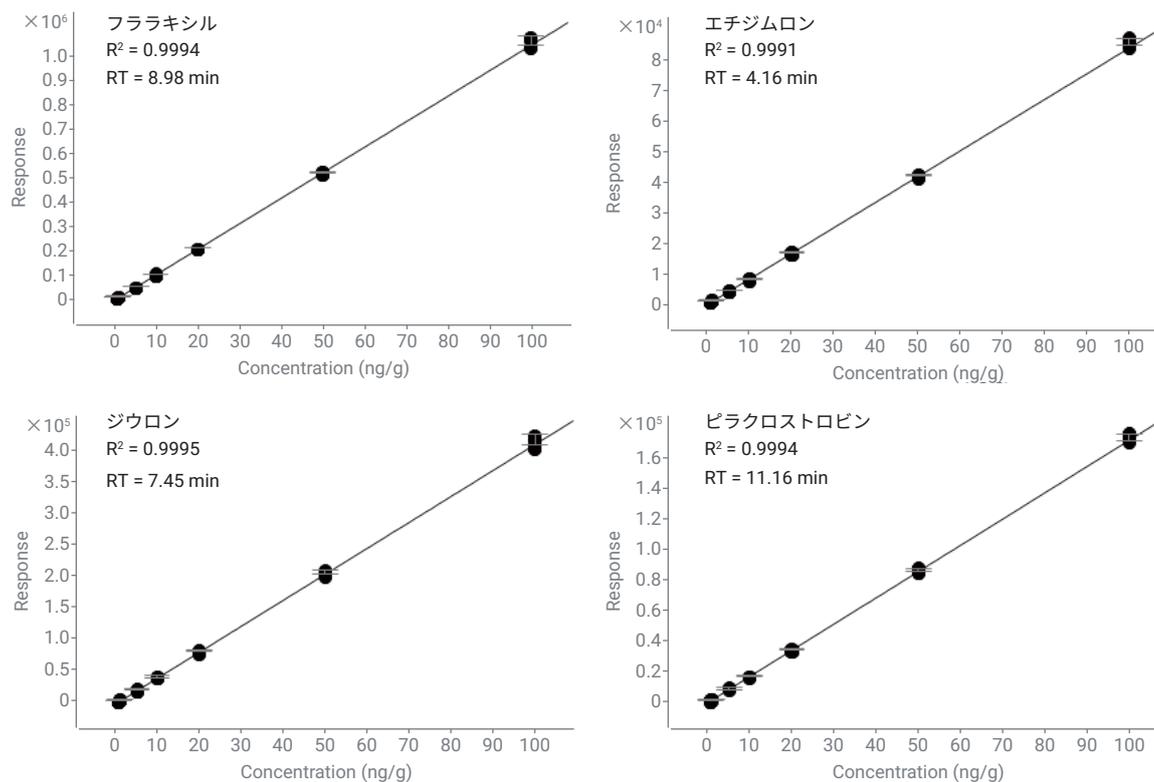


図 2. 紅茶にスパイクした農薬残留物 (フララキシル、エチジムロン、ジウロン、ピラクロストロピン) の検量線

この研究では、6470B トリプル四重極 LC/MS を用いて、オレンジマトリックスに含まれる、スクリーニングプロトコルの 10 µg/kg を下回る農薬 (S/N 比 >3) をすべて検出できました。紅茶マトリックスでは、1 つ (ボスカリド) を除くすべての化合物が 10 µg/kg 以下で検出されました。検量線は、マトリックス中の農薬それぞれの LLOQ (最低レベルとして定義されるもので、6 回の繰り返し分析すべてで真度が 80 ~ 120 %、RSD がピーク面積の 20 % 未満) を決定するために使用されました。図 3 は、紅茶とオレンジの両マトリックスにおける農薬化合物の LLOQ を示しています。改良された 6470B トリプル四重極 LC/MS システムでは、紅茶とオレンジの大半のターゲット農薬を、欧州委員会<sup>4</sup> の定めたデフォルト MRL である 10 µg/kg 以下で定量化可能で、紅茶では 244 種類中 239 種類、オレンジでは 244 種類中 243 種類で、LLOQ が 10 ng/g 以下です。US-EPA<sup>3</sup> で許容基準が定められている化合物については、すべてが MRL 以下で定量化されました。

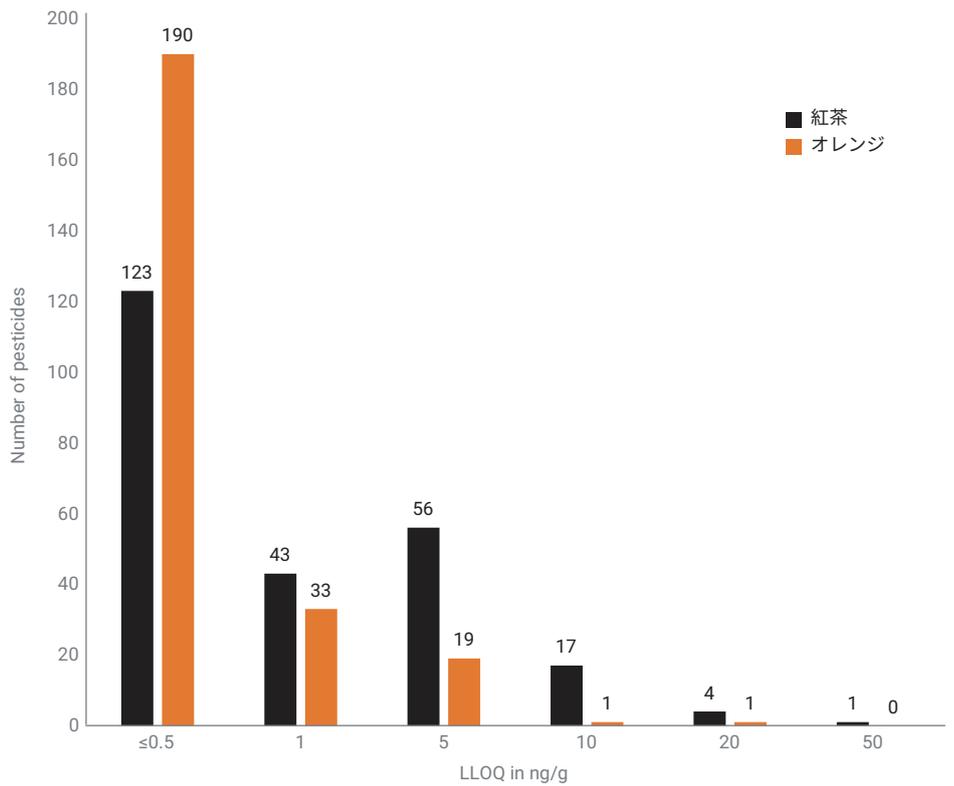


図 3. 紅茶とオレンジにスパイクした農薬の LLOQ

### 食品マトリックスにおける回収率

マトリックス効果 (イオン抑制および増感) を評価するために、デフォルト MRL の 10 µg/kg でのマトリックス中の農薬の反応を、希釈なしの溶媒中の農薬と比較し、回収率を計算しました (図 4)。オレンジマトリックスでは、化合物の約 50 % が 80 ~ 120 % という SANTE ガイドラインの枠内で、紅茶マトリックスでは、約 40 % が、このガイドラインの枠内で回収されました<sup>2</sup>。予想どおり、紅茶マトリックスの方が、オレンジマトリックスよりも高いマトリックス効果を示しました。したがって、高濃度のマトリックス効果を持つサンプルには、一般に、マトリックス適合検量線を推奨します。原材料の紅茶とオレンジは地域のスーパーマーケットで「有機栽培」食品として販売されていましたが、マトリックスブランクでの分析によると、これらのサンプルには 12 種類の農薬が存在しました。

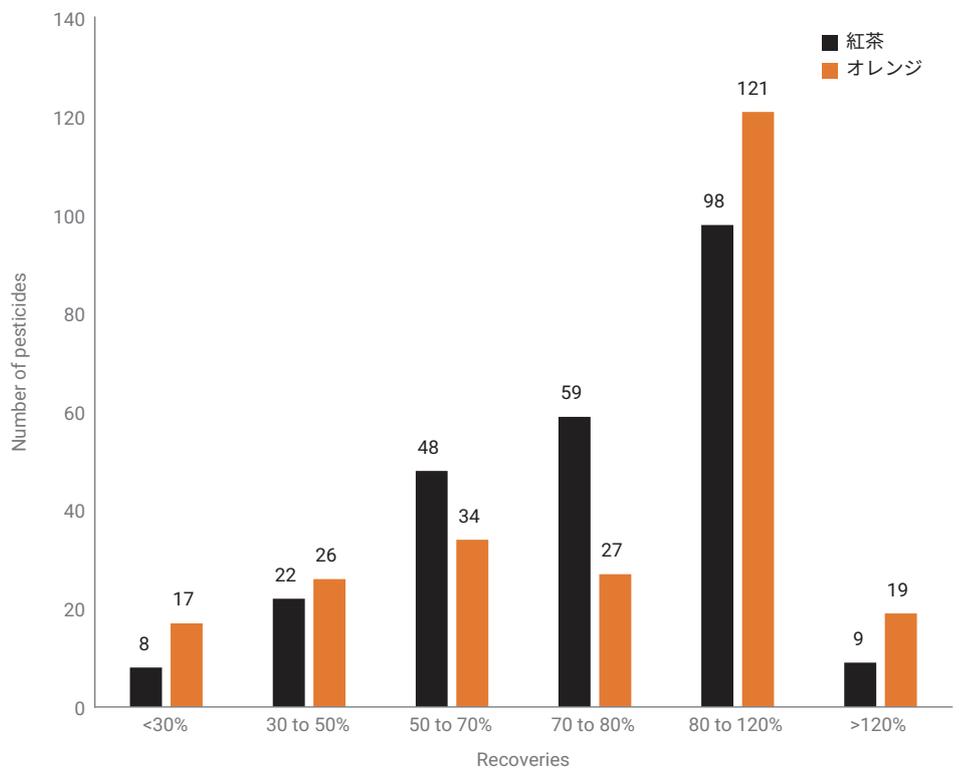


図 4. 紅茶とオレンジにデフォルト MRL の 10 µg/kg でスパイクした農薬の回収率のヒストグラム

## 結論

食品マトリックス中の 244 種類の農薬残留物定量性能を、高感度 Jet Stream 技術のイオン源 (AJS) 付きの 6470B トリプル四重極 LC/MS と組み合わせた超高性能 1290 Infinity II LC システムで評価しました。この 6470B トリプル四重極 LC/MS システムには、VacShield と、改良され、微調整されたエレクトロニクスが追加されています。これにより、非常に高い堅牢性と感度が要求される長時間の動作に対応でき、メンテナンスが簡単で、堅牢なシステムとなっています。

このアプリケーションノートでは、紅茶とオレンジ抽出物の 2 種類の食品マトリックスを使用しました。驚くべきことに、地域のスーパーマーケットで購入した有機栽培食品には、数種類の合成農薬が含まれていました。どちらの食品マトリックスでも、希釈なしの ACN と比較したときの成分のレスポンスの違いから、マトリックス効果は明らかでした。高濃度マトリックスであっても、ターゲット農薬 244 種類全体の 98 % 超の LLOQ が、欧州委員会の定めるデフォルト MRL の 10 µg/kg 以下で、LC/MS システムの高感度の性能が実証されました。化合物の回収率は、希釈なしの ACN でのレスポンスに対するマトリックス中の農薬のレスポンスに基づいて計算されました。オレンジマトリックスでは、化合物の約 50 % が 80 ~ 120 % という SANTE ガイドラインの枠内で、紅茶マトリックスでは、約 40 % が、このガイドラインの枠内で回収されました。

## 参考文献

1. Title 7 U.S. Code of Federal Regulations – Part 205. US-EPA. <https://www.ecfr.gov/> Retrieved 9 April **2020**.
2. SANTE/12682/2019 European Commission. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkdoc\\_2017-11813.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf) Retrieved 20 April **2020**.
3. Title 40 U.S. Code of Federal Regulations – Part 180. US-EPA. <https://www.ecfr.gov/> Retrieved 9 April **2020**.
4. Regulation (EC) No 396/2005. European Commission. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/> Retrieved 9 April **2020**.

ホームページ

**[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)**

カスタマコンタクトセンター

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto: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おりません。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, May 14, 2020  
5994-1973JAJP  
DE.6638541667

