

Agilent トリプル四重極 GC/MS による 農薬 175 種の微量分析メソッド

アプリケーション

食品安全性

著者

Philip L. Wylie and Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Rd.
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent 7890A/7000A GC トリプル四重極質量分析計システム (GC/QQQ) を用いて、一般に分析される農薬 175 種のための GC/MS/MS マルチプルリアクションモニタリング (MRM) メソッドを開発しました。このメソッドと GC シングル四重極質量分析計 (GC/Q) により、多数の果実および野菜抽出液を分析し、結果を比較しました。GC/Q の測定モードとしては、選択イオンモニタリング (SIM) モードとスキャンモードを使用しました。スキャン結果の評価にあたっては、アジレントのデコンポリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) と RTL 農薬および内分泌かく乱物質データベースを使用しました。マルチモード注入口を搭載した GC/Q 機器を使用し、コールドスプリットレスモードで 5 μ L を注入しました。これらの結果を、GC/QQQ で同じ抽出液 1 μ L を注入した分析結果と比較しました。GC/QQQ の感度と選択性は、GC/Q のいずれのモードも大きく上回りました。これは主に、共抽出されたマトリックスに由来する干渉が大幅に低減するためです。ただし、MRM モードの GC/QQQ が適用できるのはターゲット化合物分析のみであることから、DRS により 900 種以上の農薬や他の汚染物質をスクリーニングできる GC/Q メソッドが必要であることには変わりありません。



Agilent Technologies

はじめに

残留農薬分析は、多様な農作物マトリックス中に含まれる数十種類、ときには数百種類もの化合物を検査することが求められる複雑な作業です。QuEChERS メソッド [1-3] などの抽出テクニックでは、抽出液中に多量の物質が残存します。より徹底的なクリーンアップ手順を用いると、マトリックスに加えて残留農薬も除去されてしまうおそれがあります。多くの農薬では 10 µg/Kg (10 ppb) 以下の検出下限が求められることから、より高度な分析ツールが必要とされています。

GC で分析できる農薬の場合、多くのラボではスクリーニングおよび確認のために 2 つの補完的なテクニックが用いられています。5~100 ppb レベルの広範なスクリーニングでは、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) と RTL 農薬および内分泌かく乱物質ライブラリを組み合わせた GC/ シングル四重極 (GC/Q) が適用されます [4-6]。このメソッドは、GC で分析できる 927 種類の農薬と内分泌かく乱物質を 1 回の GC/MS 分析でスクリーニングできるスキャンメソッドです。ほとんどの農薬の検出下限は 5~100 ppb 程度で、マトリックスや注入量により異なります [4]。より複雑なマトリックス中のターゲット農薬分析では、Agilent 7890A/ 7000A GC/ トリプル四重極 (GC/QQQ) が比類のない性能を発揮します。

本論文では、幅広い農作物マトリックスに含まれる残留農薬を分析する 3 種類の質量分析テクニックを比較します。GC/Q では選択イオンモニタリング (SIM) モードおよび DRS 分析を組み合わせたスキャンモードにより、添加および非添加サンプルを分析しました。GC/QQQ では同じサンプルを、農薬 175 種を対象にしたマルチプルリアクションモニタリング (MRM) メソッドにより分析しました。実験の目的は、複数の農作物マトリックスに含まれる微量農薬の検出における GC/Q および GC/QQQ メソッドの性能を比較することです。

実験手法

サンプル

青果の添加および非添加抽出液は、米国食品医薬品局 (FDA、CFR、カレッジパーク、メリーランド州) と米国農務省 (USDA ARS、ERRC、ウィンドムア、ペンシルベニア州) から入手しました。FDA のサンプルについては、追加の吸着剤として活性炭を用いるように修正した QuEChERS [1-3] メソッドにより調製しました。このメソッドにより得られたトルエン溶液は、1 mL あたり農作物 4.5 g が含まれています。USDA のサンプルについては、公表されている QuEChERS メソッドを用いて抽出しました。このサンプルでは、アセトニトリル溶媒 1 mL あたり農作物 1 g が含まれます。

使用機器

本実験に用いた GC/Q および GC/QQQ システムを表 1 および表 2 にまとめます。

表 1. GC/Q システムの機器設定および分析条件

GC	Agilent 7890A シリーズ
オートサンブラ	Agilent 7693A インジェクタおよびサンプルトレイ
注入口	マルチモード注入口
キャリアガス	ヘリウム
注入口圧力	分析時 18.420 psi (コンスタントプレッシャーモード)、2.0 psi (バックフラッシュ時)
スプリットレスモード注入口パラメータ	
温度	250 °C
注入口ライナ	ヘリックスダブルテーパー、不活性 (P/N 5188-5398)
注入量	1 µL
スプリットベントのパーセント	0.75 min で 30 mL/min
コールドスプリットレスモード注入口パラメータ	
温度プログラム	60 °C (0.01 min) - 700 °C/min - 280 °C
注入口ライナ	ヘリックスダブルテーパー、不活性 (P/N 5188-5398)
注入量	5 µL
スプリットベントのパーセント	1.25 min で 30 mL/min
オープン温度プログラム	70 °C (1 min) - 50 °C/min - 150 °C - 6 °C/min - 200 °C - 16 °C/min - 280 °C (5 min)
キャピラリー・フロー・テクノロジー	1 ポートに蓋をした 2 ウェイスブリッタ ——分析カラムおよびリテンションギャップのバックフラッシュに使用
圧力/流量制御モジュール (PCM)	ヘリウムを 2 ウェイスブリッタに配管
PCM 圧力	分析時 4.0 psi、バックフラッシュ時 60.0 psi
分析カラム	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 µm (P/N 19091S-431UI)
接続	リテンションギャップと 2 ウェイスブリッタ間
リテンションギャップ	2.0 m × 0.25 mm Siltek 不活性フューズドシリカチューブ (Restek、ベルフォンテ、ペンシルベニア州)
接続	注入口と分析カラム間、アルティメットユニオン (P/N G3182-61580) を用いてリテンションギャップとカラムを連結
リストリクタ	80 cm × 0.15 mm 不活性フューズドシリカチューブ (Agilent)
接続	2 ウェイスブリッタと MSD 間
初期カラム流量	2.705 mL/min
リテンションタイム	クローロピリホスメチルで 8.298 min にロック
ロッキング	
質量選択検出器	Agilent 5795C シリーズ、パフォーマンスターボポンプ
モード	EI
トランスファライン温度	280 °C
イオン源温度	230 °C
四重極温度	150 °C
スレッショルド	100
サンプリングレート	A/D = 4
ゲインファクタ	1
SIM ドウエルタイム	4~25 ms
微量イオン検出	オン
溶媒ディレイ	2.5 min
バックフラッシュ条件	
タイミング	分析後に 5 min
オープン温度	280 °C

(続く)

表 1. GC/Q システムの機器設定および分析条件 (続き)

Aux EPC 圧力	60 psi
注入口圧力	2 psi
ソフトウェア GC/MSD	Agilent GC/MS ChemStation コントロールおよびデータ解析ソフトウェア (P/N G1701EA E.02.00 SP1)
デコンボリューションレポート作成ソフトウェア	Agilent P/N G1716AA (Ver. A.04.00)
ライブラリ検索ソフトウェア	NIST MS Search (Ver 2.0d) (NIST 質量スペクトルライブラリに搭載 – Agilent P/N G1033A)
デコンボリューションソフトウェア	自動質量スペクトルデコンボリューションおよび同定ソフトウェア (AMDIS_32 パージョン 2.62 以降; NIST 質量スペクトルライブラリに搭載 – Agilent P/N G1033A)
MS ライブラリ	NIST 08 質量スペクトルライブラリ (Agilent P/N G1033A) 農薬および内分泌かく乱物質データベース (Agilent P/N G1672AA)

トリプル四重極質量分析計 モード	Agilent 7000A シリーズ EI
トランスファライン温度	280 °C
溶媒ディレイ	2.3 min
イオン源温度	300 °C
四重極温度	Q1 および Q2 = 150 °C
MRM モード条件	
MS1 分解能	1.2 u
MS2 分解能	1.2 u
コリジョンガスフロー	N2 : 1.5 mL/min、He : 2.35 mL/min
バックフラッシュ条件	
タイミング	分析後に 3min
オープン温度	280 °C
Aux EPC 圧力	80 psi
注入口圧力	1 psi
ソフトウェア データ採取	Agilent MassHunter データ取得ソフトウェア (Ver. B.04.00)
定性分析	定性分析用 MassHunter Workstation ソフトウェア (Ver. B.03.01)
定量分析	定量分析用 MassHunter Workstation ソフトウェア (Ver. B.03.01)

結果と考察

GC 構成

いずれの GC システムでも、15-m × 0.25 mm × 0.25 μm Agilent J&W HP-5ms UI カラムを使用し、2 倍のスピードで Agilent 標準農薬メソッド [7] を実行しました。このメソッドで適用される初期オープン温度は 70 °C です。この温度の場合、リテンションギャップを用いなくてもほとんどの GC 溶媒に対応できます。ただし、トルエン中のサンプル 1-μL を注入する場合はピーク形状が悪くなるため、2-m 不活性リテンションギャップをカラム前面に接続しました。これにより、ピーク形状が向上しました。

食品抽出物を分析する場合、一般に沸点の高い化合物が多く含有されているため、カラムのバックフラッシュが欠かせません [4, 8–9]。わずか数回の分析を行っただけで、そうした高沸点化合物がカラムヘッド (またはリテンションギャップ) に蓄積し、ピークテーリングやリテンションタイムの変動を引き起こすことがあります。そうした蓄積物は、やがてカラムから質量分析計のイオン源へと移動し、洗浄の必要が生じます。

アジレントのキャピラリー・フロー・テクノロジーは、カラムのバックフラッシュをルーチン手順に組み込むものです (4, 8–9)。各種のキャピラリー・フロー・デバイスをバックフラッシュに使用することができます。GC/QQQ システムでは パージ付アルティメットユニオン、GC/Q システムでは 2 ウェイスブリッタ (1 ポートに蓋) を使用しました。いずれのケースでも、分析カラムをキャピラリー・フロー・デバイスに接続しました。短いリストリクタを使用し、キャピラリー・フロー・デバイスと質量分析計を接続しました。図 1 に各機器の構成を示しています。

表 2. GC/QQQ システムの機器設定および分析条件

GC	Agilent 7890A シリーズ
オートサンブラ	Agilent 7683A インジェクタおよびサンプルトレイ
注入口	スプリット/スプリットレス
注入口ライナ	ヘリックスダブルテーパー、不活性 (P/N 5188-5398)
キャリアガス	ヘリウム
注入口圧力	分析時 18.350 psi (コンスタントプレッシャーモード)、1.0 psi (バックフラッシュ時)
注入口温度	250 °C
注入量	1 μL
スプリットベントの	0.75 min で 30 mL/min
パージ流量	
ガスセーバー	オン (2.0 min で 20 mL/min)
オープン温度プログラム	70 °C (1 min) - 50 °C/min - 150 °C - 6 °C/min - 200 °C - 16 °C/min - 280 °C (5.5 min)
キャピラリー・フロー・テクノロジー	パージ付アルティメットユニオン (P/N G3186B) — 分析カラムおよびリテンションギャップのバックフラッシュに使用
Aux EPC ガス	ヘリウムを パージ付アルティメットユニオンに配管
Aux EPC 圧力	分析時 4.0 psi、バックフラッシュ時 80.0 psi
分析カラム	Agilent J&W HP-5ms UI 15 m × 0.25 mm × 0.25 μm (P/N 19091S-431UI)
接続	リテンションギャップおよび パージ付アルティメットユニオン (P/N G3186B) 間
リテンションギャップ	2.0 m × 0.25 mm Siltek 不活性フューズドシリカチューブ (Restek、ベルフオンテ、ペンシルベニア州)
接続	注入口と分析カラム間、アルティメットユニオン (P/N G3182-61580) を用いてリテンションギャップとカラムを連結
リストリクタ	65 cm × 0.15 mm 不活性フューズドシリカチューブ (Agilent)
接続	パージ付アルティメットユニオン (P/N G3186B) と MSD 間
初期カラム流量	2.688 mL/min
リテンションタイム	クロルピリホスメチルで
ロッキング	8.298 min にロック

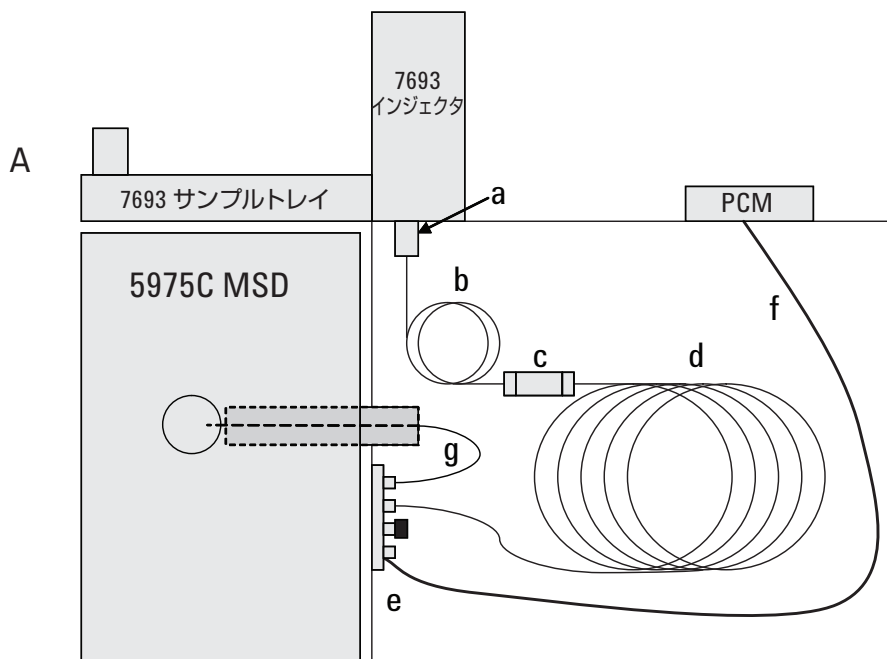


図 1A. スキャンおよび SIM 分析に使用した GC/MSD は、a) マルチモード注入口、b) 2 m × 0.25 mm 不活性リテンションギャップ、c) アルティメットユニオン、d) 15 m × 0.25 × 0.25 μm Agilent J&W HP-5ms UI カラム、e) 1 ポートに蓋をした 2 ウェイパージドスプリッタ、f) 圧力/流量制御モジュール (PCM) でコントロールしたヘリウムパージフロー、g) 80 cm × 0.15 mm 不活性リストリクタで構成されています。

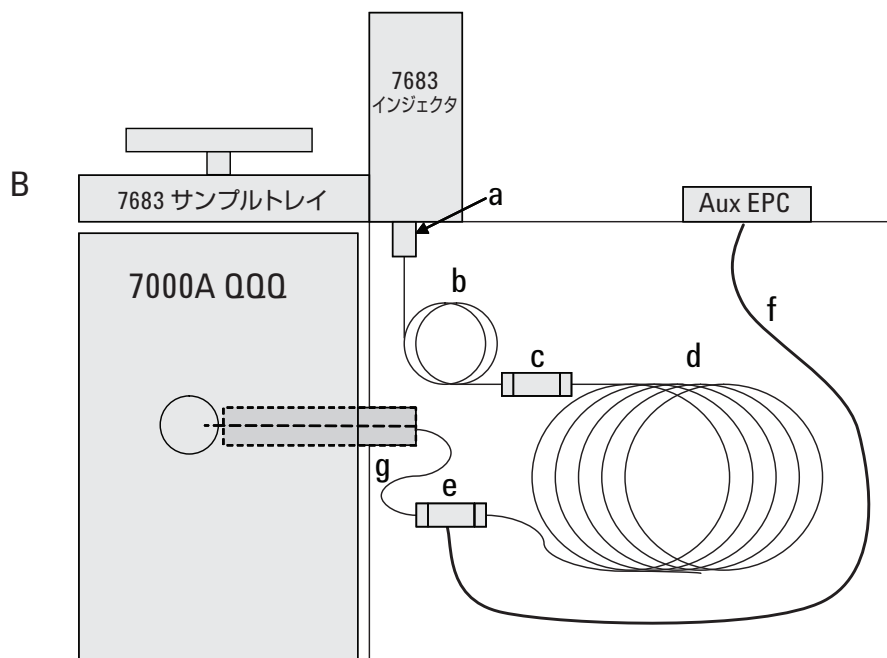


図 1B. MRM 分析に使用した GC/QQQ は、a) スプリット/スプリットレス注入口、b) 2 m × 0.25 mm 不活性リテンションギャップ、c) アルティメットユニオン、d) 15 m × 0.25 × 0.25 μm Agilent J&W HP-5ms UI カラム、e) パージ付アルティメットユニオン、f) ヘリウムパージフロー、g) 65 cm × 0.15 mm 不活性リストリクタで構成されています。

MRM メソッド

一般に分析される農薬 175 種類を分析するためのメソッドを開発しました。各化合物について 2 つのトランジションを決定し、それぞれについてコリジョンエネルギーを最適化しました。このメソッドは Agilent 農薬メソッド (オリジナルスピードの 2 倍で実施) に対してロックされているため、アジレントの RTL 農薬および内分泌かく乱物質データベース (P/N G1672AA)

に記載されている物質に対応するリテンションタイムを 2 で割りました。データベースとここで示す値には若干の違いがあります。これは、このメソッドではリテンションギャップ、キャピラリー・フロー・デバイス、リストリクタを使用したためです。表 3 に、各農薬をアルファベット順に記載しています。各農薬のリテンションタイム、定量および定性トランジション、コリジョンエネルギーも併せて記載しています。

表 3. 農薬 175 種類の定量および定性トランジション

化合物名	RT (分)	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	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE
アクリナトリン	15.371	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
アクトン	11.403	282.9	219.0	10	282.9	184.0	25
アラクロール	8.507	188.1	130.1	40	188.1	160.1	10
アルドリノ	9.247	262.9	192.9	40	262.9	190.9	40
アレスリン	10.908	123.1	81.1	10	123.1	79.1	20
アトラジン	6.581	200.1	122.1	10	200.1	104.0	20
アザメチダホス (アザメチホス)	13.248	215.0	171.0	15	215.0	128.0	30
アジンホス-メチル	14.835	160.1	77.1	20	160.1	132.1	0
ベンフルラリン	5.842	292.1	264.0	10	292.1	160.1	20
BHC, α-	6.025	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
BHC, β-	6.595	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
BHC, δ-	7.266	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
ビフェントリン	14.428	181.1	165.1	30	181.1	166.1	15
プロマシル	9.186	205.0	132.0	30	205.0	187.9	20
プロモホス	10.020	330.9	315.9	20	330.9	285.9	35
プロモホス-エチル	11.261	358.9	302.9	15	358.9	284.8	35
プロモプロピラート	14.320	183.0	155.0	15	183.0	76.0	35
カブタン	10.617	79.1	77.1	10	79.1	51.1	25
カルボフェノチオン	13.316	157.0	121.0	25	157.0	75.1	40
クロルデン, cis-	11.410	372.9	265.9	40	372.9	263.9	30
クロルデン, trans-	11.010	372.9	265.9	20	372.9	263.9	25
クロルディーノ, α-	8.562	230.0	160.0	40	230.0	195.0	25
クロルディーノ, β-	9.376	230.0	160.0	35	230.0	195.0	25
クロルディーノ, γ-	9.314	230.0	160.0	40	230.0	195.0	25
クロルフェンビンホス, β-	10.779	267.0	159.0	20	267.0	81.0	40
クロルベンジレート	12.706	139.0	111.0	15	139.0	75.0	30
クロロネブ	4.323	191.0	113.0	15	191.0	141.0	10
クロロタロニル	7.395	265.9	133.0	40	265.9	230.9	20
クロルピリホス	9.606	196.9	168.9	15	196.9	107.0	40
クロルピリホス-メチル	8.284	286.0	93.0	25	286.0	270.9	20
クロルチオホス	13.051	268.9	205.0	15	268.9	177.0	25
クマホス	15.859	362.0	109.0	15	362.0	81.0	40
シアナジン	9.694	212.1	123.1	20	212.1	151.1	10
シアノホス	6.887	243.0	109.0	10	243.0	79.0	30
シフルトリン 1	16.144	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
シフルトリン 2	16.212	163.0	91.1	15	163.0	127.1	

(続く)

化合物名	RT (分)	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	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE
シフルトリン 3	16.273	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
シフルトリン 4	16.307	163.0	127.1	5	163.0	91.1	15
シハロトリン, λ -	15.208	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
シベルメトリン 1	16.381	181.1	152.1	25	181.1	127.1	35
シベルメトリン 2	16.463	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
シベルメトリン 3	16.531	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
シベルメトリン 4	16.558	181.1	152.1	25	181.1	127.1	30
ダクタール (DCPA) (クロルタール-ジメチル)	9.721	300.9	222.9	25	300.9	166.9	40
DDD, o,p'-	12.170	235.0	165.1	30	235.0	199.1	15
DDD, p,p'-	12.841	235.0	165.1	25	235.0	199.1	20
DDE, o,p'-	11.241	246.0	176.1	40	246.0	211.0	20
DDE, p,p'-	12.007	246.0	176.1	40	246.0	175.1	40
DDT, o,p'-	12.882	235.0	165.1	30	235.0	199.1	20
DDT, p,p'-	13.492	235.0	165.1	30	235.0	199.1	20
DEF (トリブホス)	12.054	169.0	57.1	5	169.0	112.9	5
デルタメトリン	18.016	181.1	152.1	25	181.1	127.1	25
デメトン-S	6.303	88.1	60.0	5	88.1	59.0	20
デメトン-S-メチル	5.230	88.1	60.0	5	88.1	59.0	15
ジアリホス	15.432	208.0	102.1	40	208.0	89.0	40
ダイアレート 1	5.957	234.1	150.0	20	234.1	192.0	10
ダイアレート 2	6.127	234.1	150.0	20	234.1	192.0	10
ダイアジノン	7.226	179.1	121.1	40	179.1	137.2	20
ジカプトン	9.694	262.0	216.0	15	262.0	123.0	40
ジクロフェンチオン	8.067	279.0	223.0	15	279.0	205.0	30
ジクロフルアニド	9.199	123.0	77.1	20	123.0	51.1	40
ジクロロベンゾフェノン, 4,4'-	9.593	139.0	111.0	15	139.0	75.1	30
ジクロルボス	2.905	109.0	79.0	5	109.0	47.0	15
ジクロベニル	3.367	171.0	100.0	25	171.0	136.0	15
ジクロラン	6.269	206.0	176.0	10	206.0	124.0	30
ディルドリン	11.926	262.9	192.9	40	262.9	190.9	35
ジメタクロール	8.080	134.1	105.1	15	134.1	77.1	30
ジオキサチオン	15.934	125.0	97.0	5	125.0	65.0	25
ジスルホトン	7.260	88.1	60.0	5	88.1	59.0	25
ジタリムホス	11.586	130.0	102.1	15	130.0	75.0	30
エディフェンホス	13.377	173.0	109.0	15	173.0	65.1	40
エンドスルフアンエーテル	7.660	240.9	205.9	20	240.9	203.9	20
エンドスルフアン I	11.308	240.9	205.9	15	240.9	136.0	40
エンドスルフアン II	12.570	195.0	125.0	25	195.0	159.0	10
硫酸エンドスルフアン	13.377	271.9	236.9	20	271.9	116.9	40
エンドリン	12.366	262.9	193.0	35	262.9	190.9	35
エンドリンアルデヒド	12.956	249.9	214.9	35	249.9	141.9	40
エンドリンケトン	14.116	316.9	101.0	20	316.9	245.0	20
EPN	14.333	157.0	77.1	25	157.0	110.0	15
エタルフルラリン	5.632	276.1	105.1	35	276.1	202.0	20
エチオン	12.997	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
エトブロップ (エトプロホス)	5.357	158.0	97.0	15	158.0	114.0	5
エトリジアゾール	3.963	183.0	139.9	20	183.0	108.0	40

(続く)

化合物名	RT (分)	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	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE
ファミフル	13.329	218.0	109.0	15	218.0	79.0	30
フェナミホス (フェナミホス)	11.803	303.1	80.0	40	303.1	154.0	20
フェナリモル	15.222	139.0	111.0	15	139.0	75.0	35
フェンクロルホス (ロンネル)	8.650	284.9	269.9	15	284.9	239.9	35
フェニトロチオン	9.030	277.0	109.0	20	277.0	260.0	5
フェンプロパトリン	14.503	181.1	152.1	30	181.1	127.1	35
フェンスルホチオン	12.780	292.0	156.0	25	292.0	109.0	20
フェンチオン	9.552	278.0	109.0	20	278.0	125.0	20
フェンバレレート 1	17.202	167.1	125.0	15	167.1	89.1	40
フェンバレレート 2	17.412	167.1	125.0	10	167.1	89.1	35
フルクロラリン	7.321	306.1	264.1	5	306.1	206.0	15
フルシトリネート 1	16.571	199.1	107.1	30	199.1	157.1	10
フルシトリネート 2	16.741	199.1	107.1	25	199.1	157.1	5
フルリドン	16.944	328.1	259.0	30	328.1	189.1	40
フルバリネート τ -1	17.412	250.1	55.1	15	250.1	200.1	20
フルバリネート τ -2	17.480	250.1	55.1	15	250.1	200.1	25
ホルベット	10.807	147.1	103.1	5	147.1	76.0	30
ホノホス	6.934	246.1	109.0	15	246.1	137.0	5
ヘブタクロル	8.379	271.9	236.8	25	271.9	116.9	40
ヘブタクロル exo-エポキサイド異性体 A	10.474	183.0	118.9	30	183.0	154.9	15
ヘブタクロル exo-エポキサイド異性体 B	10.352	352.9	262.8	25	352.9	281.9	20
ヘキサクロロベンゼン	6.168	283.9	213.9	35	283.9	248.8	25
ヘキサジノン	13.702	171.1	71.1	15	171.1	85.1	15
イプロベンホス (IBP)	7.660	204.0	91.1	10	204.0	121.0	40
イプロジオン	14.211	187.0	124.0	25	187.0	159.0	15
イサゾホス	7.517	161.1	119.0	10	161.1	146.0	5
イソフェンホス	10.813	213.1	121.0	20	213.1	185.0	5
ヨードフェンホス (ヨードフェンホス)	11.776	376.9	361.9	20	376.9	93.0	35
レプトホス	14.876	171.0	77.1	25	171.0	124.1	10
リンデン (γ -BHC)	6.710	181.0	145.0	15	181.0	109.0	30
マラチオン	9.396	173.1	99.0	15	173.1	117.0	10
メチダチオン	11.146	145.0	85.1	5	145.0	58.1	15
メトキシクロル, o,p'-	13.730	227.1	121.1	15	227.1	91.1	35
メトキシクロル, p,p'-	14.442	227.1	141.1	40	227.1	169.1	30
メトラクロール	9.450	162.1	133.1	15	162.1	132.1	25
メビンホス	3.782	127.0	109.0	10	127.0	95.0	15
マイレックス	14.923	271.9	236.9	15	271.9	116.9	40
ノナクロル, cis-	12.848	408.8	109.0	20	408.8	299.9	25
ノナクロル, trans-	11.539	408.8	299.8	25	408.8	301.8	30
オキサジアゾン	12.210	175.0	112.0	15	175.0	76.1	40
パラチオン	9.633	291.1	109.0	10	291.1	81.0	40
パラチオンメチル	8.284	263.0	109.0	10	263.0	79.0	35
ペンタクロロアニリン	7.761	264.9	193.9	30	264.9	155.9	30
ペンタクロロベンゼン	4.459	249.9	214.9	25	249.9	142.0	40
ペンタクロロベンゾニトリル	6.866	274.9	239.9	20	274.9	204.9	35
ペンタクロロフェニルメチルエステル	6.283	264.9	236.9	10	264.9	142.9	40
ペンタクロロチオアニソール	9.016	295.9	245.8	40	295.9	262.9	15

(続く)

化合物名	RT (分)	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	プリカーサイオン	プロダクトイオン	CE
ベルメトリン, cis-	15.703	183.1	153.1	15	183.1	168.1	15
ベルメトリン, trans-	15.798	183.1	155.1	10	183.1	165.1	10
フェナントレン-d10	6.863	188	160	10	188	186	10
フェノトリン	14.713	183.1	153.1	15	183.1	168.1	15
フェントエート	10.861	274.0	121.0	10	274.0	125.0	20
ホレート	5.961	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
ホサロン	14.855	182.0	111.0	15	182.0	75.1	40
ホスメット	14.259	160.0	77.1	30	160.0	133.0	15
ビリミホスエチル	10.332	318.1	166.1	15	318.1	182.1	15
ビリミホスメチル	9.138	290.1	125.0	25	290.1	233.0	10
プロシミドン	10.983	283.0	96.1	10	283.0	67.1	40
プロフェノホス	11.953	207.9	63.1	40	207.9	99.0	25
プロパクロル	5.164	120.1	77.1	20	120.1	92.1	5
プロパルギット	13.858	135.1	107.1	15	135.1	77.1	30
プロパジン	6.676	214.1	172.0	10	214.1	104.0	20
プロペタンホス	6.948	138.0	110.0	5	138.0	64.0	15
プロピザミド	6.975	173.0	145.0	15	173.0	109.0	35
プロチオホス	11.878	162.0	63.1	40	162.0	98.0	20
ピラクロホス	15.439	360.0	96.9	35	360.0	194.0	15
ピラゾホス	15.351	221.1	193.1	10	221.1	149.1	15
ピリダフェンチオン	14.272	340.1	199.1	5	340.1	97.0	40
キナルホス	10.827	146.1	118.1	10	146.1	91.1	30
キントゼン	6.832	236.9	118.9	25	236.9	142.9	30
レスメトリン	13.994	123.1	81.1	5	123.1	95.1	5
シマジン	6.473	201.1	173.1	5	201.1	138.1	10
スルホテップエチル	5.902	322.0	146.0	25	322.0	65.0	40
スルプロホス	13.180	322.0	97.0	30	322.0	156.0	5
テブピリムホス	7.687	261.1	137.1	15	261.1	153.1	20
テクナゼン (TCNB)	5.110	202.9	83.0	25	202.9	142.9	20
テフルトリン	7.524	177.1	127.1	20	177.1	137.0	20
テメホス	20.525	125.0	47.0	20	125.0	79.0	10
テルブホス	6.890	231.0	128.9	25	231.0	174.9	10
テルブチラジン	6.907	214.1	104.0	20	214.1	132.0	10
テトラクロロアニリン, 2,3,5,6-	5.293	230.9	158.0	25	230.9	122.0	40
テトラクロルビンホス	11.478	329.0	109.0	25	329.0	79.0	35
テトラメトリン I	14.299	164.1	107.1	15	164.1	135.1	10
テトラメトリン II	14.421	164.1	107.1	10	164.1	135.1	5
チオメトン	6.161	125.0	47.0	20	125.0	79.0	10
トルクロホスメチル	8.392	265.0	250.0	15	265.0	93.0	25
トリフルアニド	10.623	137.0	91.1	20	137.0	65.1	35
トリアレート	7.470	268.0	183.9	25	268.0	226.0	15
トリアゾホス	13.241	161.0	134.1	10	161.0	91.1	20
トリフルラリン	5.808	306.1	264.0	5	306.1	160.0	30
リン酸トリフェニル	13.865	326.1	169.1	35	326.1	233.0	10
ピンクロゾリン	8.311	212.0	145.0	25	212.0	109.0	40

ニンジン抽出液

残留農薬を含むニンジン抽出液をスキャンおよび SIM モードの GC/Q で分析しました。いずれのケースでも、アジレントの新しいマルチモード注入口をコールドスプリットレスモードで操作し、5- μ L を注入しました。3 つの SIM メソッドを用いて、各メソッドで 60 種類ずつ、合計 170 種類以上の化合物をモニタリングしました。また、各化合物について 4 種類のイオンをモニタリングしました。アジレントのデコンポリューションレポート作成ソフトウェアと 927 種類の化合物を含む RTL 農薬および内分泌かく乱物質データベースを用いて、スキャンデータを自動的に解析しました。

同じニンジンサンプルを、表 3 の MRM トランジションを用いた 7890A/ 7000A GC/QQQ システムでも分析しました。3.33 μ g/kg (ppb)~6670 μ g/kg の農薬 170 種類について、ニンジンマ

表 4. DRS 分析を用いたスキャンモードの GC/MS、SIM モードの GC/MS、MRM モードの GC/MS/MS による含農薬ニンジン抽出液の分析結果 (X はメソッドにより化合物が検出されたことを示しています)。

農薬	GC/Q 5 μ L (マルチモード注入口) コールド SL スキャン + DRS		GC/QQQ ^a 1 μ L ホット SL (ppb)
	コールド SL	コールド SL SIM	
ジクロロベニル			0.38 ^b
ベンタクロロベンゼン			0.75 ^b
トリフルラリン			2.3 ^b
テフルトリン			0.53 ^b
4,4'-ジクロロベンゾフェノン			1.2 ^b
クオルピリホス			24.7
o,p'-DDE			3.7
p,p'-DDE	X	X	240
o,p'-DDD			9
p,p'-DDD	X		Sum = 45
o,p'-DDT	X		
p,p'-DDT	X	X	130
フェナザキン	X		当該メソッドでは 検出されず

a. 抽出メソッドにより、抽出液 1 mL あたり農作物 4.5 g を含む溶液に濃縮されているため、オリジナルのニンジンサンプルに含まれるこれらの化合物の濃度は、実際には 4.5 倍低くなります。

b. ここに記載した値は、検量線の最小ポイントを下回るものです。

トリックスで 11 ポイントの検量線を作成しました。表 4 に各分析の結果を示しています。

シングル四重極メソッドは定量的ではないため、DRS または SIM データの手動評価のいずれかによる農薬検出の有無のみを示しています (X でマーク)。トリプル四重極メソッドは検量線によって各農薬の量を決定することが可能でした。記載された濃度は、抽出液中で検出された値です。抽出メソッドにより 4.5:1 (最終抽出液 1.0 mL にニンジン 4.5 g) の比率でサンプルが濃縮されているため、オリジナルのニンジンサンプルの濃度は、実際にはその分低くなります。

DRS 分析を用いたスキャンメソッドは、データベースに収録された 927 種類の化合物を検出できます。一方、SIM および MRM メソッドは、表 3 に示す 175 種類のターゲット化合物に制限されます。DRS ではフェナザキンが検出されましたが、この農薬は SIM または MRM メソッドでは対象外でした。このことは、ターゲット化合物分析用の GC/MS/MS と組み合わせ、スクリーニングのために DRS を用いた GC/MS を使用することの利点を示しています。

ニンジンマトリックスが濃縮されているにもかかわらず、GC/QQQ 分析では、1 ppb (1 μ g/kg) 未満の農薬 3 種類と、5 ppb 未満の農薬 3 種類を検出することができました。最小レベルの検量線は 3.33 ppb で作成したため、記載されている値のうち、このレベルを下回るものは外挿値となります。p,p'-DDD および o,p'-DDT は最適な MRM トランジションが同じ値で、いずれもクロマトグラムが部分的にしか分離されなかったため、これら 2 つの化合物については値を合算して記載しています。

図 2A は、ニンジンサンプルのスキャン分析により得られた p,p'-DDE の定量用マスキロマトグラム (m/z 246) を示しています。これらのクロマトグラムでは干渉が存在するため、スペクトルを最初にデコンポリューションしなければ、正確な定量分析を行うのは困難です。デコンポリューション後 (図 2B) は、クロマトグラムが明瞭になっています。図 2C には、同じサンプルの GC/MS SIM 分析で得られた SIM クロマトグラム (m/z 246) を示しています。シグナル/ノイズ比 (S/N) は 10 倍向上していますが、干渉は増加しているように見えます。

ターゲット化合物分析では、GC/QQQ の効果が現れています。ニンジン抽出液 1- μ L を注入した GC/QQQ 分析では、5- μ L を注入した GC/Q SIM 分析 (S/N = 375) に比べ、S/N (434) が良好で明瞭な MRM クロマトグラムが得られました (図 2C)。

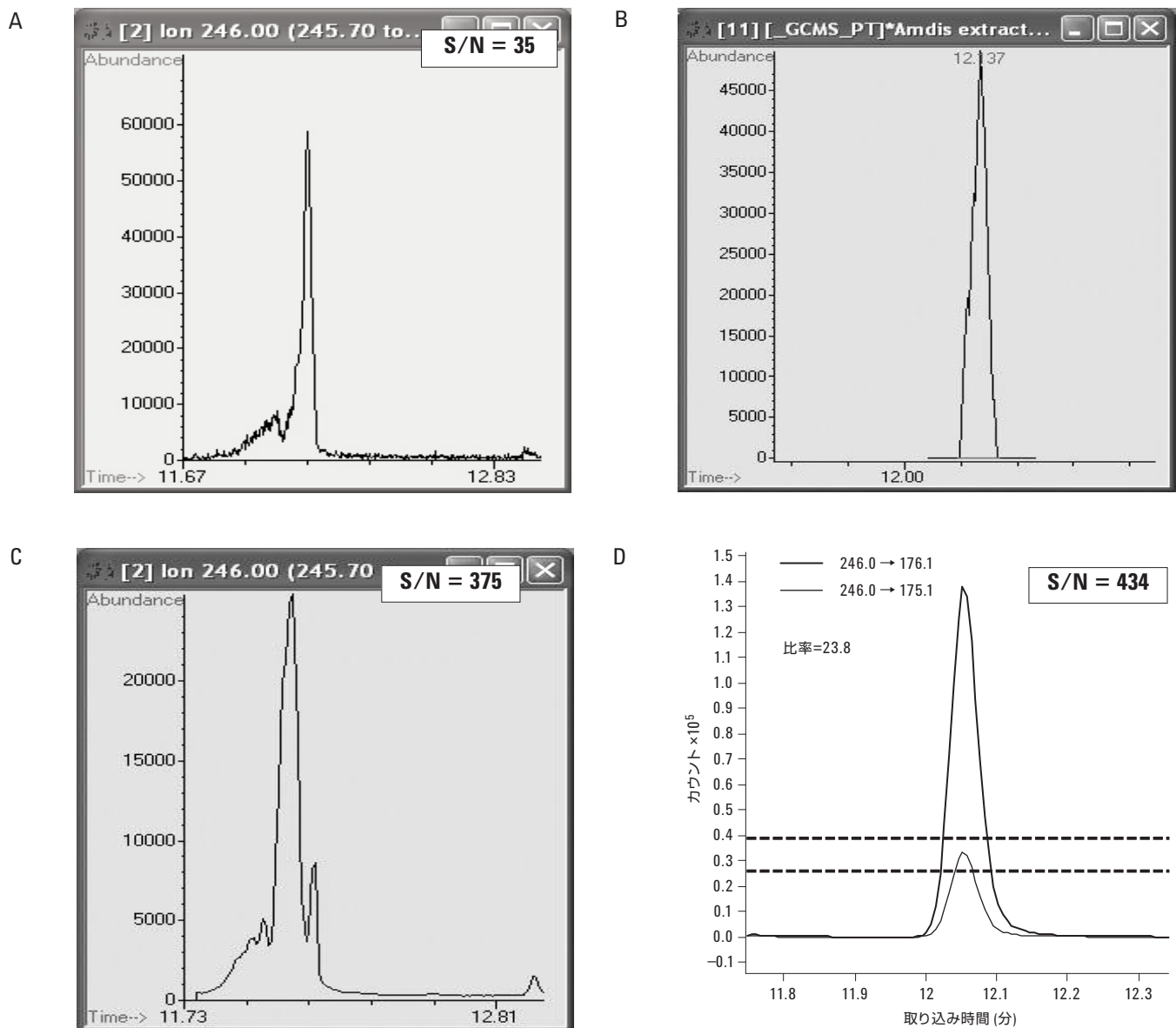


図 2. A) 農薬を含むニンジン抽出液 5- μ L のコールドスプリットレス注入により得られた p,p'-DDE 定量イオン (m/z 246) のマスククロマトグラム。B) デコンボリューション後の (A) と同じクロマトグラム。C) 同じサンプル 5- μ L のコールドスプリットレス注入により得られた p,p'-DDE 定量イオン (m/z 246) の SIM クロマトグラム。D) 同じニンジン抽出液 1- μ L のホットスプリットレス注入による GC/MS/MS 分析の定量および定性トランジション (各 246.0 \rightarrow 176.1 および 246.0 \rightarrow 175.1)。S/N は抽出イオンおよび定量トランジションの peak-to-peak シグナル/ノイズ比を示しています。2 つのトランジションイオン (D) の比率は 23.8 で、p,p'-DDE の存在を裏付けています。

各種マトリックスにおける GC/MS SIM と GC/MS/MS MRM の比較

図 3 は、各種農作物に p,p'-DDE 10 ppb を添加した場合の GC/MS SIM 分析結果と GC/MS/MS MRM 分析結果を比較しています。左側の図を見ると、定量イオン (m/z 246) の SIM クロマトグラムでは、リンゴ、キャベツ、ヤクヨウニンジン、オレ

ンジ、ホウレンソウサンプルのマトリックス干渉が増加していることがわかります。それに対して、右側の p,p'-DDE の GC/MS/MS トランジションでは、どの抽出液でも干渉は見られません。定量トランジションに見られる S/N 値の大きさ (246.0 \rightarrow 176.1) は、サブ ppb レベルで p,p'-DDE を検出できることを示しています。

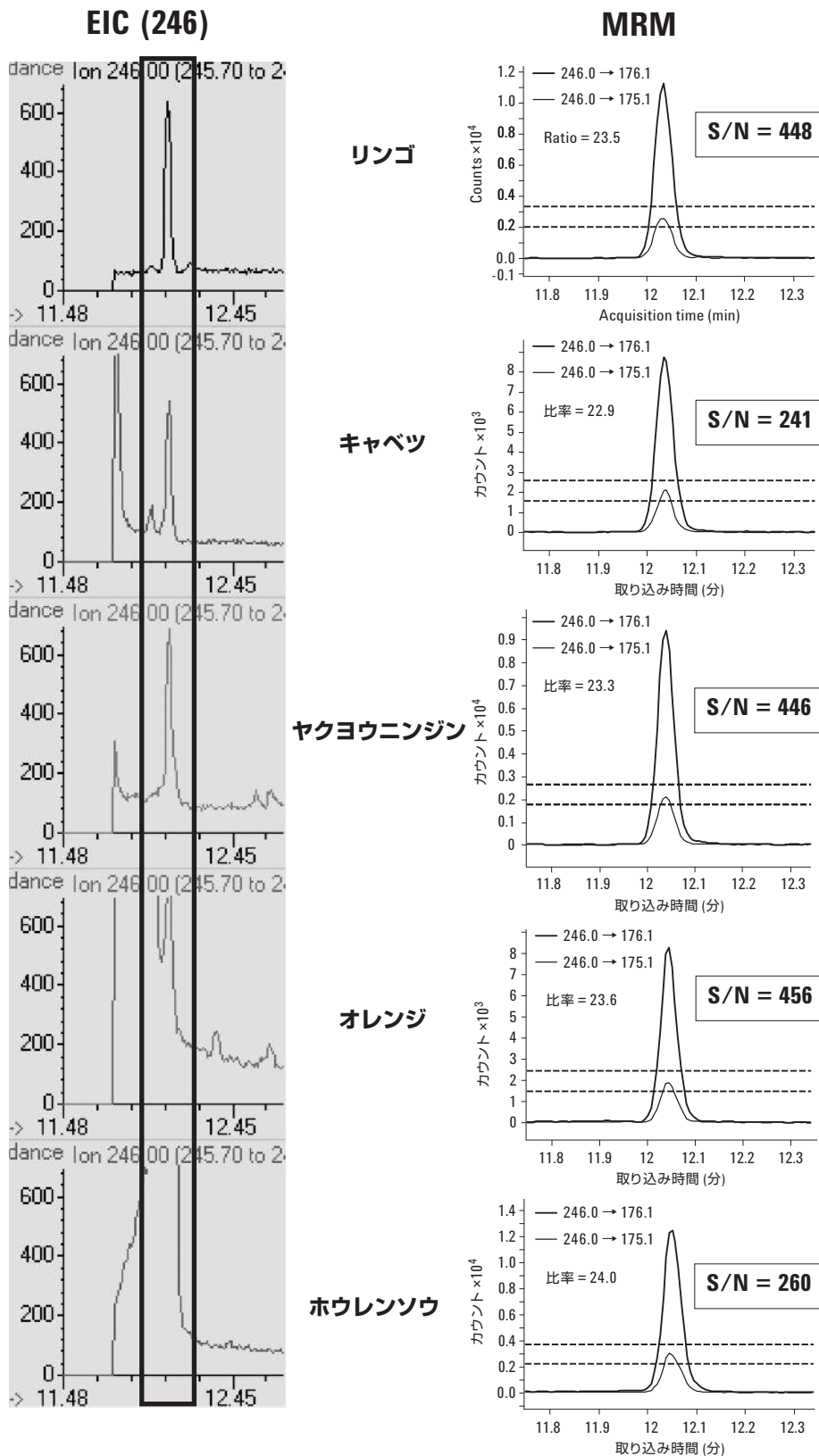


図 3. 5 種類の農作物抽出液に p,p'-DDE 10 ppb (10 µg/kg) を添加した場合の GC/MS SIM 分析結果と GC/MS/MS MRM 分析結果の比較。左側の p,p'-DDE 定量イオン (m/z 246) の SIM クロマトグラムは、マトリックスの干渉が増加していることを示しています。右側の p,p'-DDE のトランジション (246.0 → 176.1 および 246.0 → 175.1) はクリーンで、S/N は 241~448 です。注入量はすべて 1 µL です。

トマト抽出液

ここで取り上げている 3 種類のテクニックは、いずれもトマト抽出液に 1 ppm で含まれるクロロタロニルを検出できました。しかし、クロロタロニル代謝物であるペンタクロロベンゾニトリルを検出できたのは GC/QQQ だけで、測定濃度は 9.3 ppb でした。図 4 には、ペンタクロロベンゾニトリルの MRM トランジションと、3.33 ppb~6670 ppb の範囲における検量線を示しています。

カラムのバックフラッシュ

GC/MS で不純物の多いサンプルを分析する場合、頻繁に注入口ライナを交換し、カラムを切断する必要があります。多くのラボでは、そうした作業を日常的に行っています。これを行わなければ、マトリックスがライナやカラムに蓄積し、クロマトグラフィに悪影響を及ぼします。やがて、そうした蓄積物が GC カラムを経由して移動し、イオン源を汚染します。そうなると、イオン源を洗浄しなければなりません。この問題には、GC/QQQ 機器の構造も関係しているものと考えられます。GC/QQQ 機器はマトリックスの蓄積が目につきにくいいため、イオン源 (場合によっては最初の四重極) の洗浄が必要になるまでメンテナンスが先延ばしにされがちです。

Agilent 7000A シリーズトリプル四重極 GC/MS は、5975C MSD と同じ不活性イオン源と金メッキ石英四重極を採用しています。これらの部品は、それぞれ 350 °C および 200 °C までの加熱が可能です。これにより、高沸点マトリックス成分が検出器に到達する場合でも、洗浄の手間が大幅に低減されます。

クロマトグラフィ性能の悪化を防ぎ、イオン源洗浄の必要性を減らすための最良の方法は、分析中または分析後に GC カラムをバックフラッシュすることです。図 1 に示している構成の場合、キャピラリー・フローデバイス (2 ウェイスプリッタまたはパージ付アルティメットユニオン) の圧力を上げ、注入口圧力を下げれば、バックフラッシュを分析後の 3~5 分で実施できます。このバックフラッシュにより、カラムフローが逆流し、

高沸点マトリックス成分がカラムヘッドから押し出され、注入口のスプリットベントから排出されます。

本実験では、濃縮食品抽出液 1- μ L を GC/QQQ システムに約 100 回注入しても、カラムや MS 性能に明らかな問題は生じませんでした。GC/Q システムでは、カラムおよび注入口のメンテナンスの必要が生じるまでに、同じ抽出液ほぼ 300 μ L を注入することができました。キャピラリー・フローデバイスを設置すれば、質量分析計の真空解除を行わずにメンテナンスを実施することもできます。

結論

Agilent 7890A/7000A トリプル四重極 GC/MS システムは、農業のターゲット分析に適した感度と堅牢性を備えています。シングル四重極メソッドに比べてマトリックス由来の干渉が大幅に減るため、現在の法規制で求められる低 ppb 域の農業の定量を容易に行うことができます。多くのケースでは、GC/QQQ にサンプル 1- μ L を注入した分析のほうが、GC/Q にサンプル 5- μ L を注入した場合よりも良好な結果が得られました。

ただし、数百種類の農業を検出できるスクリーニングメソッドは依然として必要です。このメソッドとしては、アジレントの新しいマルチモード注入口による大容量注入を用いたスキャンモードでの GC/Q 分析と、アジレントの農業および内分泌かく乱物質データベース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を用いたデータ解析を組み合わせた手法を推奨します。900 種類の以上の汚染物質をスクリーニング (DRS を組み合わせた GC/Q) する一方で、それよりも少数のターゲット化合物の超微量分析 (GC/QQQ) を実施する場合には、この 2 つのアプローチが最良の組み合わせといえます。いずれのアプローチも、カラムのバックフラッシュを利用することができます。食品抽出液などの不純物の多いサンプルを分析する場合には、バックフラッシュを強く推奨します。

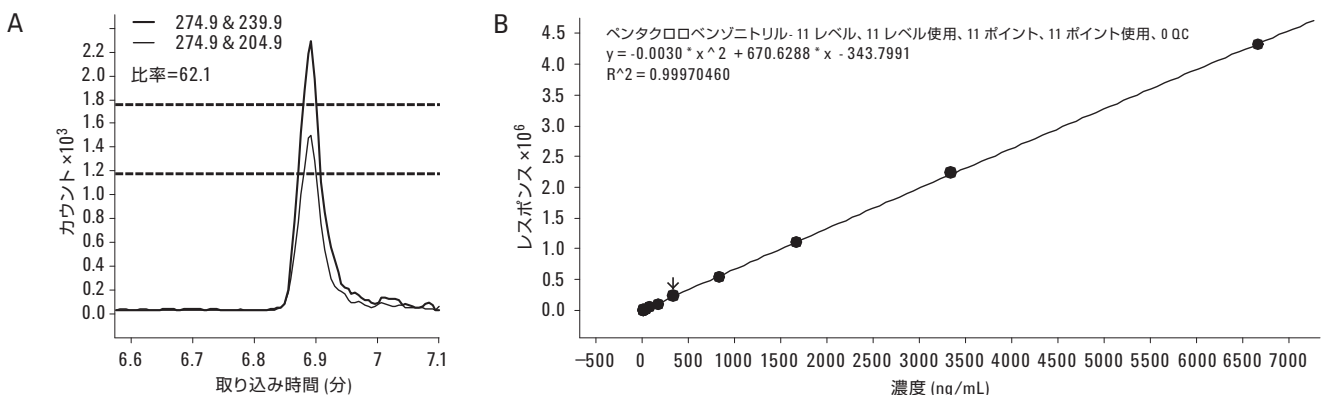


図 4. A) トマト抽出液から濃度 9.3 ppb で検出されたペンタクロロベンゾニトリルの MRM トランジション。B) 3.33~6,670 ppb におけるペンタクロロベンゾニトリルの検量線、二次曲線適合 > 0.999。

References

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, *J AOAC Int*, 86 (2003) 412.
2. S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, and P. Bodegraven, *J AOAC Int*, 88 (2005) 595.
3. QuEChERS Web site, <http://www.quechers.com>
4. M. Mezcuca, M. A. Martínez-Uroz, P. L. Wylie, and A. R. Fernández-Alba, "Simultaneous screening and target analytical approach by GC-q-MS for pesticide residues in fruits and vegetables," Accepted for publication by *J. AOAC Int*.
5. Chin-Kai Meng and Mike Szelewski, 「フルスキャンGC/MSによる対象外農薬のスクリーニング分析における生産性の向上—従来のGC及びGC/MS (SIM) による各50分の分析時間を15分に短縮」、アジレント資料番号 5989-7670JAJP.
6. Philip L. Wylie, 「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」、アジレント資料番号 5989-5076JAJP.
7. Bruce D. Quimby, Leonid M. Blumberg, Matthew S. Klee, and Philip L. Wylie, "Precise Time-Scaling of Gas Chromatographic Methods Using Method Translation and Retention Time Locking," Agilent Technologies publication 5967-5820E.
8. Chin-Kai Meng, 「バックフラッシュによる生産性の向上とカラム寿命の延長」、アジレント資料番号 5989-6018JAJP.
9. Philip L. Wylie, 「GC-ECD への直接注入による魚油中のPCB分析:Deans スイッチデバイスを用いたバックフラッシングの結果」、アジレント資料番号 5989-6095JAJP.

謝辞

多数の標準物質と食品抽出液を提供して下さった米国食品医薬品局 (カレッジパーク、メリーランド州、米国) の Jon Wong 博士と、米国農務省 (ARS、ERRC、ウィンドムア、ペンシルベニア州、米国) の Steven Lehotay 博士に感謝します。

詳細情報

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., 2009
Printed in Japan
February 25, 2009
5990-3578JAJP



Agilent Technologies