

Application News

No. C154A

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

残留農薬のルーチン分析におけるデータ信頼性向上に向けた MRM スペクトルモードおよびライブラリ検索の応用

David R. Baker¹, Chris Titman¹, Jonathan Horner², Neil Loftus¹
¹Shimadzu Corporation, UK; ²Scientific Analysis Laboratories, UK

■ 要旨

多重反応モニタリング（MRM）モードを用いて残留農薬の分析を繰り返し行った場合、測定結果の偽陽性および偽陰性が課題となります。この課題を解決するために表示するフラグメントイオンの数を増やすことでより簡便に農薬を特定し、信頼できるデータを報告することができます。

従来の MRM 法では一つの農薬に対して 2-3 個のフラグメントイオンを観察するのにに対し、MRM スペクトルモードでは 6-10 個のフラグメントイオンのトランジションを観察しています。多くのフラグメントイオンのトランジションを取得することで、各農薬はライブラリ検索に搭載されているフラグメントイオンのスペクトルと一致しており、リファレンスライブラリの妥当性評価の整合性が向上しました。この MRM スペクトルモードを 193 種の農薬の定量・定性に用い、検出感度・直線性・再現性に妥協することなく 1291 個の MRM トランジションを使用しました。

キーワード： MRM スペクトルモード; 偽陽性、偽陰性の抑制; 農薬; 食の安全; LCMS-8060; 高い特定性

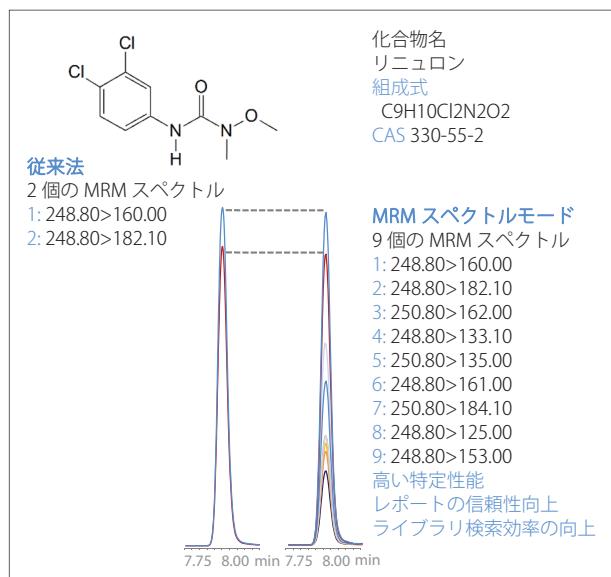


図 1 従来法と MRM スペクトルモードの比較。多くのフラグメントイオンの MRM トランジションを取得することで同定性能を向上し、偽陽性・偽陰性を抑制することができます。リニュロンの測定を行った場合、9 個のプリカーサーイオンのトランジションを用いることで結果の信頼性が向上しました。多くのフラグメントイオンを観察したにも関わらず、従来法と比較してデータの質は低下しておらず、信号強度、直線性、再現性に違いは見られませんでした。

■ 背景

高い検出感度、選択性から定量目的においてトリプル四重極分析計を用いた多重反応モニタリング（MRM）法が広く使用されています。食の安全などの規制において、1 回の測定で分析できる農薬の数を増やすこと、また化合物同定の信頼性を高め誤検出を減らすことが求められています。EU における農薬分析では識別基準 SANTE/11945/2015 が用いられており、保持時間および少なくとも 2 個の MRM トランジションから得たイオン比が規制値内¹⁾である必要があります。しかしながら、この基準を用いた場合、特定の農薬と食品の組み合わせにおいて、多くの測定結果の偽陽性が報告されています。²⁻⁴⁾

MRM スペクトルモードではそういった偽陰性、偽陽性を減らすために、ひとつの農薬に対してより多くの MRM トランジションが用いられており、化合物の特定性を高めています。それぞれの対象となる農薬において検出されるフラグメントイオンのトランジション数は化合物の構造に影響され、およそ 6-10 個のフラグメントイオンが生じます。MRM スペクトルモードは従来の MRM 定量に多くの MRM トランジションを用いており、このプロダクトイオンスペクトルは繰り返し行われるライブラリ検索や化合物の検証、同定に用いることができます。

ここでは 193 種の農薬に対して 1291 個の MRM トランジション、サイクルタイム 15 分の分析手法を開発しました。数多くの MRM トランジション数を取得するためにそれぞれの MRM トランジションにおいて Dwell time を 3 ミリ秒、正負切替を 5 ミリ秒で行いました。1 つの農薬に対して平均 7 個の MRM トランジションを用いました。当社の残留農薬メソッドパッケージを用いてメソッドを確立しました。このメソッドパッケージには 750 種類の農薬および 6000 個以上の MRM トランジションがデータベースに搭載されており、迅速なメソッド開発および化合物の検証が可能です。メソッドに MRM トランジションを追加した場合、データの質への影響を評価するために MRM スペクトルモードと従来の農薬モニタリング手法（1 化合物につき 2 個の MRM トランジション、計 386 個の MRM トランジション）の比較を行いました。様々な種類の食物（ターメリック、プラム、ペパーミント、パースミット、チェリー、ライム、カボチャ、トマト、イモ）の分析を行いました。対象の MRM スペクトルをライブラリから自動検索する LabSolutions Insight を用いてデータ取得を行いました。

■ 実験方法

QuEChERS 法による抽出物に農薬を添加したサンプルを Scientific Analysis Laboratories、UK に提供して頂きました。MRM スペクトルモードのデータベースおよびライブラリ検索機能の動作確認を行うためにターメリック、プラム、ペパーミント、パースミット、チェリー、ライム、カボチャ、トマト、イモを用いて実験を行いました。最終抽出物はアセトニトリルを溶媒とし、直接 LC-MS/MS に供しました。測定において早い段階で溶出するピーク形状の改善を行うために、オートサンプラーで自動的に水を共注入し、ピーク面積改善のために約 2 μm の粒子径のカラムを用いました。(表 1)

農薬を 0.01 mg/kg から 0.2 mg/kg に調製し、検量線を作成しました。再現性試験にはアボカドに 0.1 mg/kg の農薬を添加し、試料に供しました。最後に ESI の正負極性切替を 5 ミリ秒で分析を行いました。

それぞれの農薬に対して平均 7 個の MRM トランジションを用い、34 種の農薬では 10 個以上の MRM トランジションを用いました。しきい値を設けてトリガーすることなく全ての MRM トランジションを取得しました。1291 種の MRM トランジションを含む農薬 193 種類の分析時間はわずか 15 分でした。各 MRM トランジションの Dwell time は 3 ミリ秒でした。MRM スペクトルモードによって取得したデータの信頼性を評価するために、従来の MRM 法 (1 つの農薬に対し 2 個の MRM、計 386 個の MRM) と同様の分析条件を用いました。(表 2)

全ての農薬のフラグメンテーションを自動的に最適化し、MRM スペクトルモードの分析法を作成する LabSolutions を用いました。島津の農薬データベースを用いることでライブラリ検索および化合物同定を目的とした MRM スペクトルモードの分析手法を簡便かつ迅速に設定することができました。このデータベースは 750 種以上の農薬の MRM トランジション (6000 個以上) が搭載されています。

定量結果の評価のために LabSolutions Insight ver.3.0 および MRM スペクトルモードを用いました。MRM スペクトルモードのライブラリ検索にはフィルタリングツールが搭載されており、偽陰結果を低減または取り除くことができます。

表 1 LC 条件

液体クロマトグラフィ		
UHPLC	Nexera LC system	
分析カラム	HSS T3 (100 × 2.1, 1.7 μm)	
カラム温度	40 °C	
流速	0.4 mL/min	
移動相 A	ギ酸アンモニウム (5 mmol/L) 0.004 % ギ酸+水	
移動相 B	ギ酸アンモニウム (5 mmol/L) 0.004 % ギ酸+メタノール	
グラジエント プログラム	時間 (min)	%B
	1.50	35
	11.50	100
	13.00	100
	13.01	3
	15.00	Stop
注入量	0.1 μL (30 μL の水と共注入)	

表 2 MRM スペクトルモード、および従来の MRM 法を用いた分析モードの MS/MS 取得/パラメータ。LC の測定は同じ条件を用いました。

LC-MS/MS	MRM スペクトル モード: ライブラリ検索 可能	従来法 (MRM2 個)
農薬	193	193
トランジション数	1,291 個 (1,229 ポジティブ、 62 ネガティブ)	386 個 (374 ポジティブ、 12 ネガティブ)
ボースタイム/ Dwell タイム	1 ミリ秒/3 ミリ秒	1 ミリ秒/3 ミリ秒
イオン化法	ESI +/-	ESI +/-
極性切替	5 ミリ秒	5 ミリ秒
インターフェース 温度	350 °C	350 °C
ヒートブロック温度	300 °C	300 °C
DL 温度	150 °C	150 °C
ネプライザーガス	3 L/min	3 L/min
ヒーティングガス	10 L/min	10 L/min
ドラインガス	10 L/min	10 L/min

■ 実験結果および考察

化学汚染の評価規制は、既知の化合物リストから化合物を決定し、偽陽性、偽陰性のあるデータを出さずに高速かつ費用対効果の高い分析を目的としております。化合物同定のガイドラインは EU の SANTE/11945/2015 に記載されており、この同定基準は 少なくとも 2 個の MRM トランジションにおけるイオン比および保持時間が規制値内であることが求められています。

残留農薬の評価プログラムにおいて誤検出を減らすために新しい MRM 法の開発を行いました。この MRM 法は一つの農薬に対してより多くの MRM トランジションを用いることで特定性能が向上しております。プロダクトイオンスペクトルと農薬の MRM トランジションを組み合わせることで MS/MS ライブラリを参照することなく、農薬同定の妥当性を向上することができます。MRM スペクトルモードを用いることで誤検出を著しく減らし、最適な定量・定性結果を得ることができます。

農薬 193 種 (0.010 mg/kg) を添加し、MRM スペクトルモードを用いて測定した MRM クロマトグラムを図 2 に示します。193 種の農薬の 1291 個の MRM トランジションを取得しました。その中の 151 個の MRM トランジションを図 3 に示します。MRM スペクトルモードを用いて測定を行うことで、検出感度に影響を与えることなく、効率的にデータを取得することができます。

■メソッドのパフォーマンス

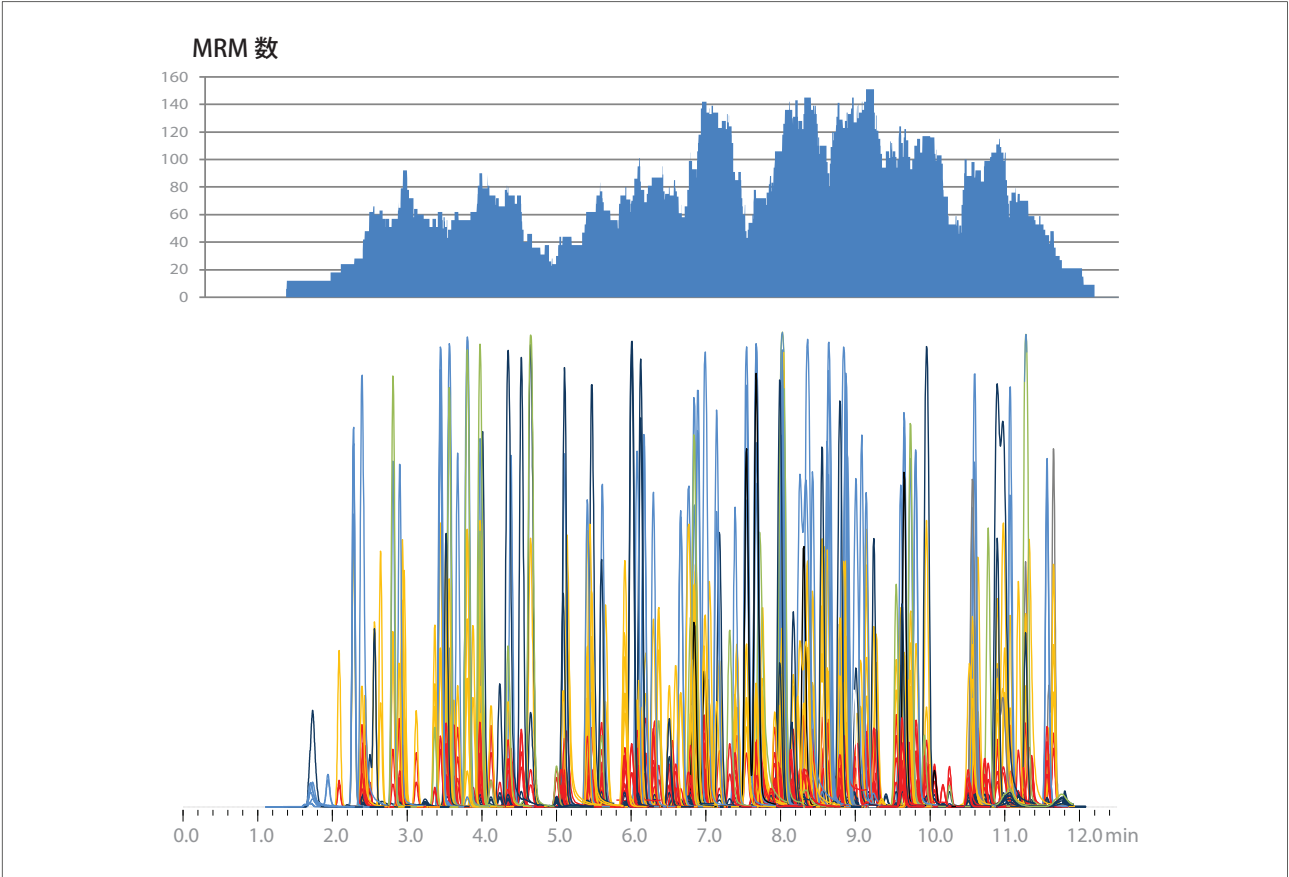


図2 各時間におけるMRM トランジションのヒストグラムおよび農薬 193 種のクロマトグラム。MRM は最大で 151 個、オーバーラップしていました。このような密集したデータ取得を行った場合においても、従来の MRM 法と比較してピーク面積値 5.2%以下でした (n=5)。詳細を図 3 に示します。

表 3 保持時間 8.80 分から 9.30 分までのポジティブおよびネガティブの 151 個の MRM トランジション。

	保持 時間	MRM の数	極性	ピーク面積 %RSD(n=5)
Dichlofluanid	8.80	6	ESI+	2.2
Dichlofluanid 2	8.80	6	ESI+	3.4
Dichlofluanid 1	8.80	5	ESI+	2.6
Fluoxastrobin	8.82	12	ESI+	2.0
Fenhexamid	8.83	11	ESI+	2.2
Iprovalicarb	8.88	6	ESI+	2.3
Spirotetramat	8.89	6	ESI+	2.6
Azinphos-ethyl	8.90	5	ESI+	3.1
Chromafenozide	8.91	5	ESI+	3.2
Triticonazole	8.93	5	ESI+	2.1
Cyazofamid	9.01	5	ESI+	2.1
Prothioconazole	9.07	10	ESI+	1.9
desthio				
Diflubenzuron	9.09	4	ESI+	2.0
Pyrifenoх	9.11	8	ESI+	2.0
Dodemorph	9.17	6	ESI+	2.1
Fenoxycarb	9.17	6	ESI+	2.0
Rotenone	9.17	6	ESI+	2.4
Fipronil	9.20	10	ESI-	5.2
Bixafen	9.25	8	ESI-	2.8
Tebufenozide	9.27	6	ESI+	3.9
Bensulide	9.27	6	ESI+	2.6
Neburon	9.30	9	ESI+	1.7
計 151				平均 2.6 %RSD

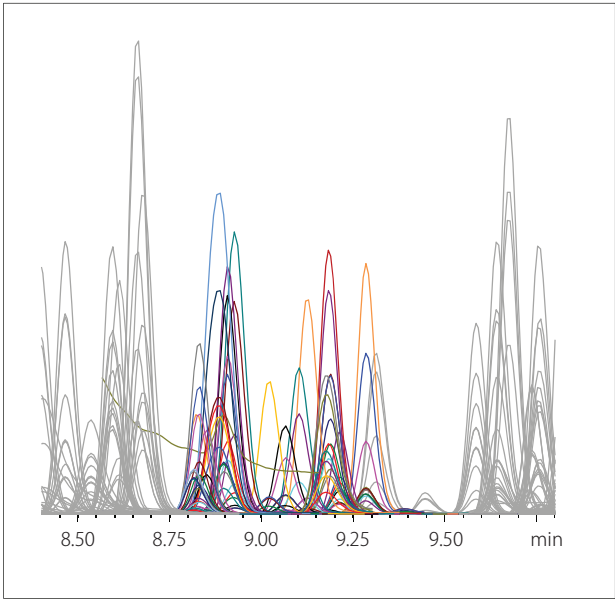


図3 保持時間 8.80 分から 9.30 分までのポジティブおよびネガティブの 151MRM トランジション。この時間に溶出した 22 化合物のピーク面積値再現性 (RSD) は 5.2%以下でした。アボカドに 0.1 mg/kg の農薬を添加し測定を行いました。

■メソッドのパフォーマンス

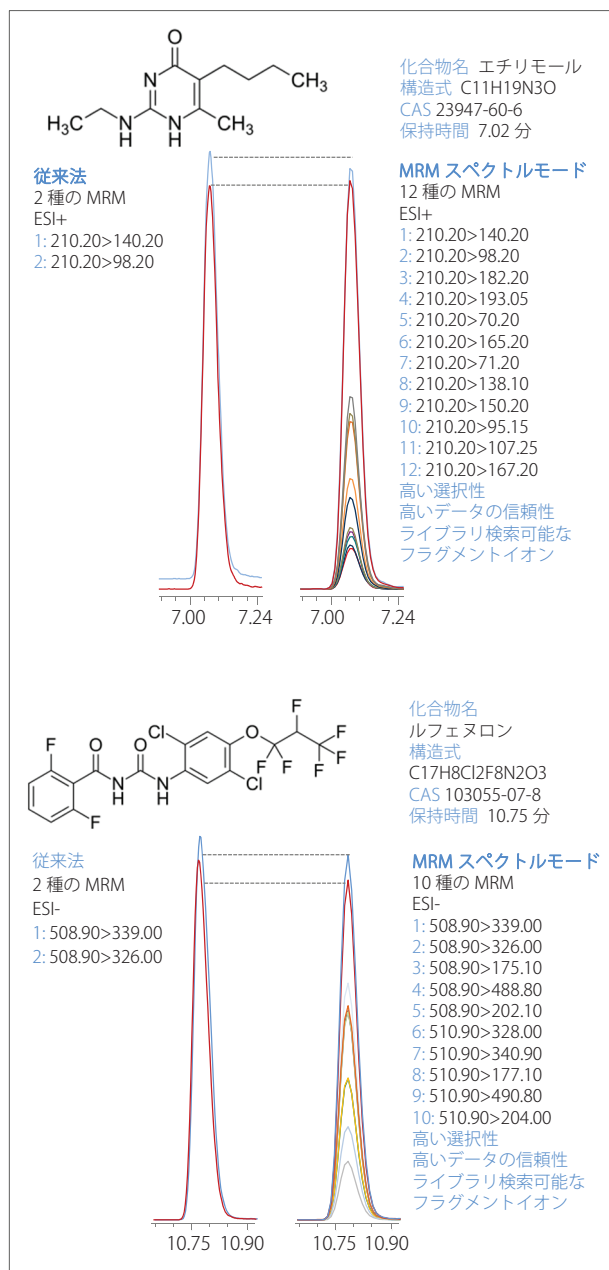


図4 エチリモール（ポジティブ）およびルフェヌロン（ネガティブ）の MRM クロマトグラム。0.1 mg/kg の農薬をアボカドに添加し、5 回繰り返し注入し、再現性の試験を行いました。エチリモールおよびルフェヌロンにおける MRM 法を用い、%RSD3.5%を得ました。

LC-MS/MS による誤検出を減らすために一つの農薬に対して多くの MRM トランジションを用いる手法を開発しました。また、MRM スペクトルモードの性能を評価するために従来の MRM 法（一つの農薬に対して 2 つの MRM トランジションを用いる手法）との比較を行いました。

図4にエチリモールおよびルフェヌロンの MRM クロマトグラムを示します。0.1 mg/kg の農薬をアボカドに添加し、それぞれの MRM 手法で分析を行いました。MRM クロマトグラムはスムージングを行っておらず、それぞれの農薬は同じスケールで表示しております。エチリモールおよびルフェヌロンは 7.02 から 10.75 分の間に溶出され、100 以上の MRM を取得したデータの密度が高い時間内に取得しました。多くのフラグメントイオンを検出したにも関わらず、ポジティブモードおよびネガティブモードでおよそ同強度のイオンを検出しました。

それぞれの MRM 法を用いて全ての農薬を測定した場合におけるピーク面積値との相関関係を図5に示します。線形回帰曲線によると傾きが 1 に近く、原点近くを通る良好な結果を得ました。

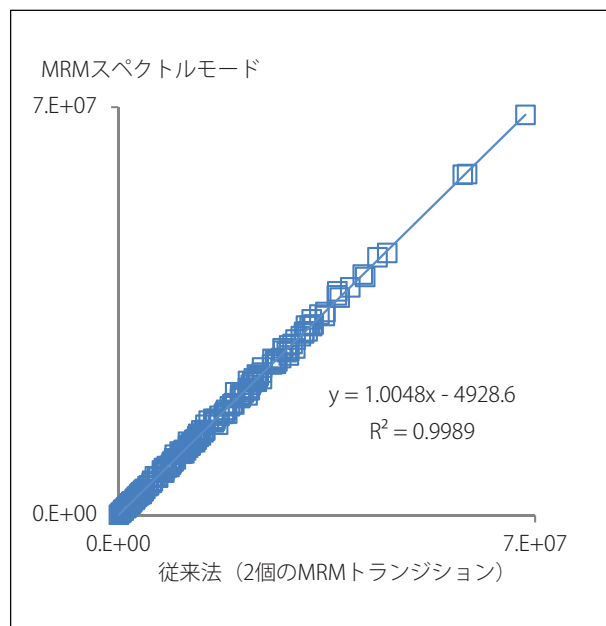


図5 従来の MRM 法（トランジション数 386）および MRM スペクトルモード（トランジション数 1291）と 193 種の農薬のピーク面積値の相関関係。線形な結果を得ることができました。

■ スペクトルの同定

高速極性切替は島津の LCMS-8050/8060 において高速なデータ取得システムのひとつです。ここではメソッドは MRM トランジション数を増やすだけでなく、高速極性切替により一回の測定における網羅数を増やしております。

異なる極性切替時間による分析結果を図 7 に示します。それぞれに切替時間で取得したビクサフェン（ネガティブイオンモード）および ヘキシチアゾクス（ポジティブモード）のピーク面積値は 3.5% RSD (n=4) 以下でした。

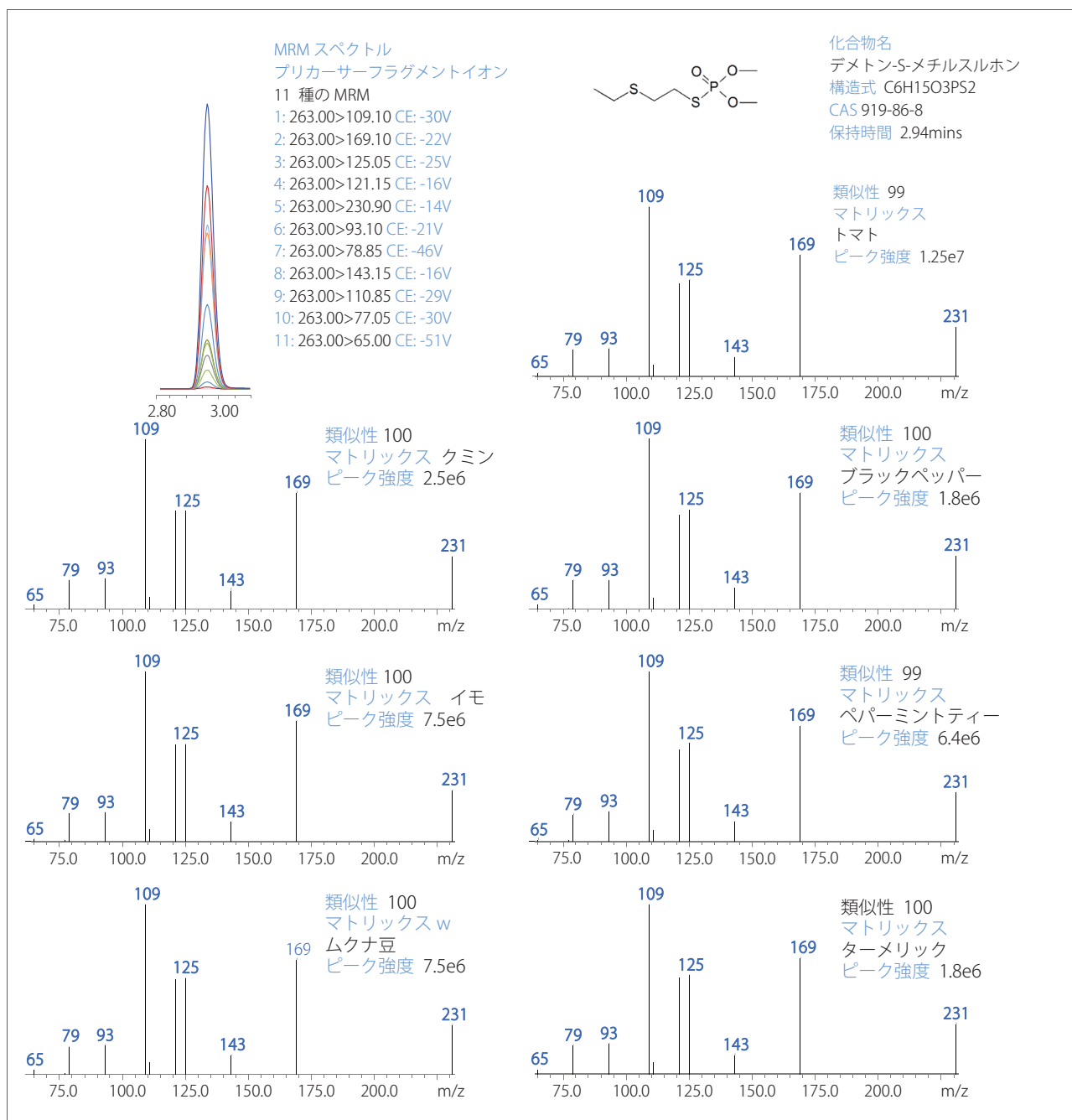


図 6 異なるマトリックス中における MRM スペクトルモードを用いたデメトン-S-メチルスルホンの同定

■ スペクトルの同定

得られたデータの信頼性を向上するために一つの農薬に用いるトランジションの数を増やしました。さらに MRM トランジションと組み合わせることでプロダクトイオンスペクトルを取得しました。この MRM を用いて取得したプロダクトイオンスペクトルは自動的にリファレンススペクトルと比較され、類似性スコアが算出されます。

図 7 にライブラリ検索可能なフラグメントイオンスペクトルを使用する有意性を示します。ここでは定性・定量のためにデスメディファムおよびフェンメディファムを用いました。デスメディファムおよびフェンメディファムは、ほぼ同じフラグメントイオンおよび保持時間を有しております。MRM スペクトルモードを用いてスペクトルの比較を行った場合、デスメディファム及びフェンメディファムを正確に同定することができました。（フェンメディファムのプロダクトイオンスペクトルでは m/z 154、182 にフラグメントイオンは検出されませんでした。）

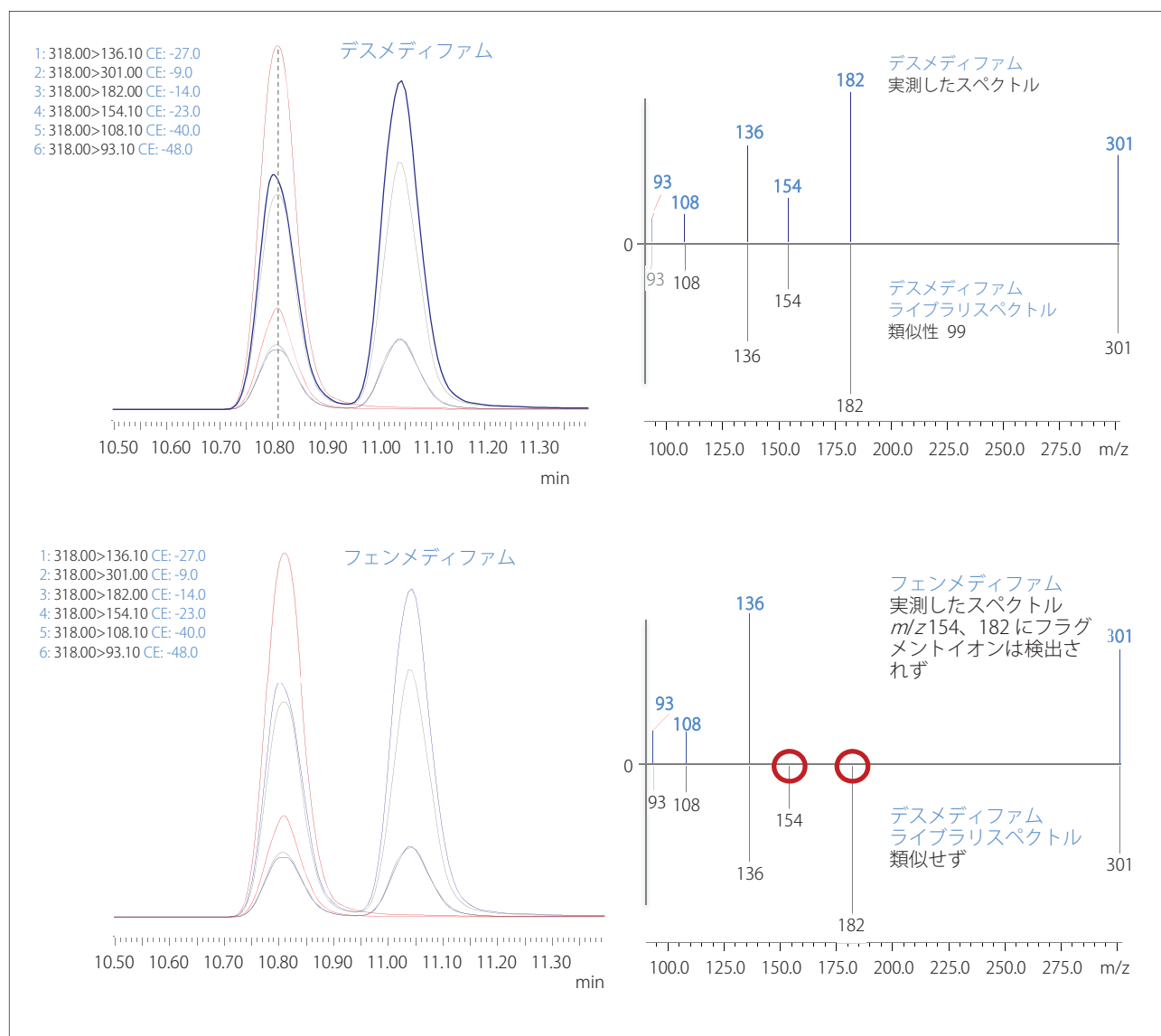


図 7 デスメディファムおよびフェンメディファムを 0.1 mg/kg に調製し、クミンに添加した MRM クロマトグラムを示します。フェンメディファム、デスメディファムは同一のトランジションおよび保持時間であり、MRM スペクトルにより農薬を区別し、誤検出を避けることができました。

■ 定量

カルベンダジムを3段階に希釈し、マトリックスに添加して測定を行いました。図8では報告されている値と同様の0.010 mg/kgの濃度で全てのプロダクトイオンのS/Nが10を超えておりました。得られた検量線の結果を図9に示します。検量範囲(0.010-0.200 mg/kg)におきまして線形性を得ることができました。

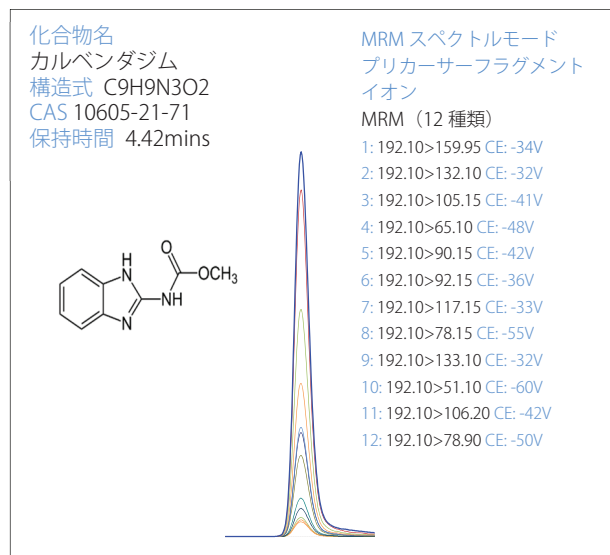


図8 広範囲のCEを印加することで12個のカルベンダジムのプリカーサーフラグメントイオンを検出しました。MRM 192.10>159.95を感度および定量の評価に用い、12個のフラグメントイオンをピーク同定に用いました。

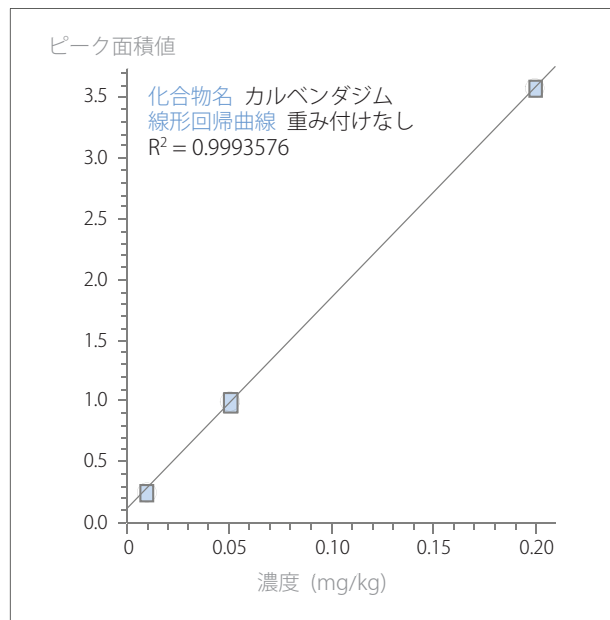


図9 最適化されたトランジション(MRM 192.10>159.95)を用いたカルベンダジムの検量線を示します。0.010 mg/kg添加し、12個全てのフラグメントイオンにおいて10を超えるS/Nを得ることができました。

プロダクトイオンスペクトルを得るために用いるMRMトランジションの数は農薬の化学構造によります。カルベンダジムの場合、CEを10-60 Vに設定するといくつかの結合が開裂し、12個のプロダクトイオンが生成されます。プロダクトイオンスペクトルはライブラリ検索に使用され、図10の様に分析の確認に用いられます。0.010-0.200 mg/kgの濃度範囲においてそれぞれの類似性スコアが98を超えました。この技術による利点はライブラリ検索できるプロダクトイオンスペクトルを用いることで、定量的なデータ報告において感度、精度、堅牢性を損なうことなく測定対象を同定できることです。

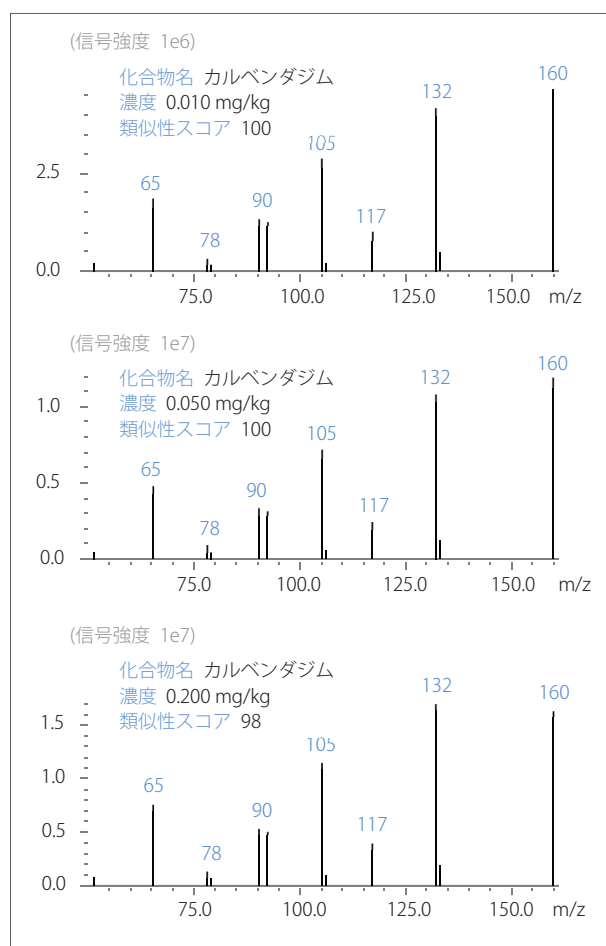


図10 3段階の濃度(0.010、0.050、0.200 mg/kg)のカルベンダジムを食品マトリックスに添加したMRMプロダクトイオンスペクトルを示します。ライブラリスペクトルと比較を行った結果、類似性スコア98を超える高い同定精度を得ることができました。

■ データ報告

LabSolutions Insight ソフトウェア (図 11) を用いることで自動的に参照されたライブラリと定量結果を簡単に評価することができます。

ライブラリ類似性および標準物質によって最適化を行った保持時間を用いた化合物同定方法により、LabSolutions Insight は誤検出を減らすことができます。

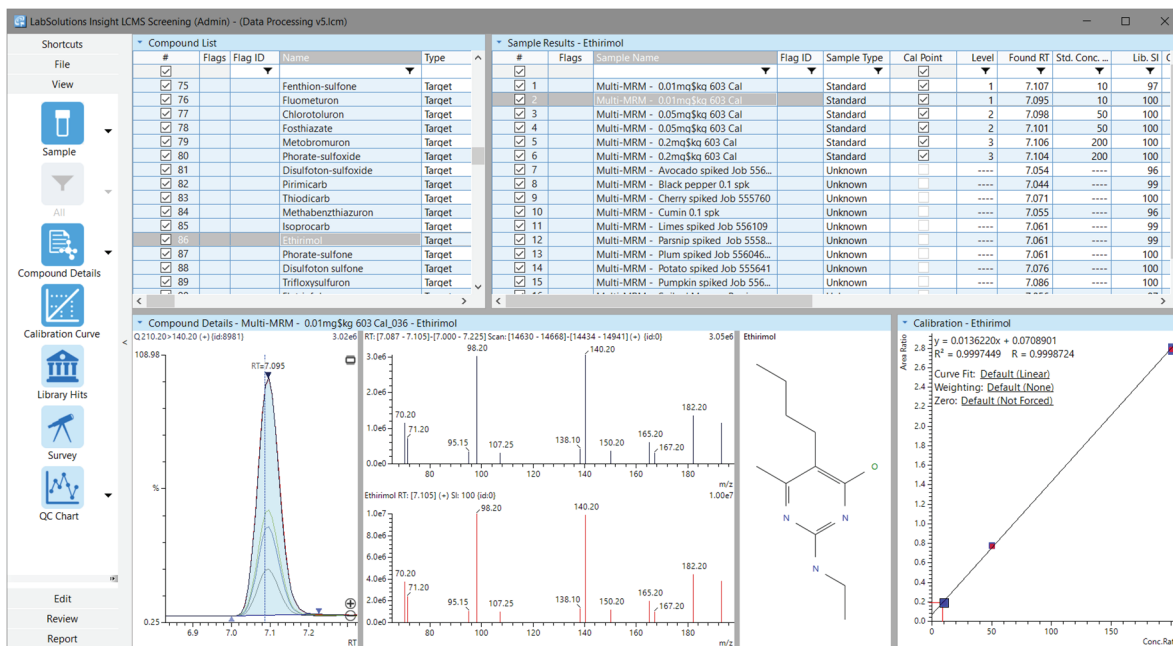


図 11 LabSolutions Insight によって定量およびライブラリ類似性スコアの結果を高速かつ簡単に評価することができます。フィルタリングおよびソート機能によって誤検出を減らし、プロダクトイオンスペクトルの類似性スコアによるフィルタリング機能により高いスループットを実現します。

■ 結論

農薬の誤検出は残留農薬の評価を行う研究において大きな課題とされています。EU の規制では保持時間および 2 個の MRM トランジションの比が規制値に収まることが求められています。しかしながら、特定の農薬と食品を組み合わせた場合、偽陽性のあるデータが生じていると報告されています。

ここでは様々な食物をマトリックスとし農薬 193 種類を MRM スペクトルモードを用いて定性・定量を行いました。得られたデータの信頼性向上のためにライブラリを用いた類似性スコアを識別基準として用いました。

MRM スペクトルモードによるデータ取得 (1291 個の MRM トランジション) と従来の一つの農薬に対して 2 つの MRM を用いる従来法 (386MRM) を比較した場合、同程度の信号強度および再現性を得ました。MRM スペクトルモードによって取得した MRM スペクトルは異なる食物マトリックス中において安定した直線性を得ることができました。この手法を用いてポジティブおよびネガティブモードでデータを取得し、極性切り替えを 5 ミリ秒で行うことにより高いデータの取得率を実現しました。

全ての 1291 MRM トランジションは、しきい値を設けることなく取得しました。Dwell Time の短い LCMS-8060 を使用しかつ、MRM トランジションにトリガーを用いないことが必要不可欠です。MRM スペクトルモードでは必要に応じて有効な MRM トランジションを入れ替えることができ、追加した MRM トランジションのピーク形状を評価することができます。

■ References

- 1* European Commission SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.
- 2* Schürmann A., Dvorak V., Crüzer C., Butcher P., Kaufmann A., False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebutylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon. Rapid Communications Mass Spectrometry, Volume 23, Issue 8, April 2009, Pages 1196-1200.
- 3* Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., Giles K., Uriá D. Are liquid chromatography/electrospray tandem quadrupole fragmentation ratios unequivocal confirmation criteria? Rapid Communications, Mass Spectrometry, Volume 23, Issue 7, April 2009, Pages 985-998.
- 4* Pozo Ó., Sancho J., Ibáñez M., Hernández F., Niessen W., Confirmation of organic micropollutants detected in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Achievements and pitfalls, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 25, Issue 10, November 2006, Pages 1030-1042.

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

A改訂版発行：2017年6月

初版発行：2017年3月

島津コールセンター 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。