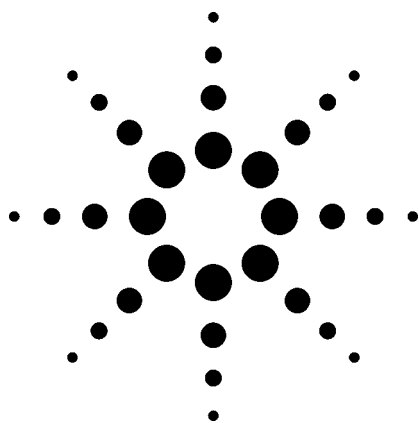




Molecular Feature データベースサーチを使用した LC/TOF MS による食品中の 600 種類の農薬の自動スクリーニングアプリケーション

食品安全性

著者

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Pesticide Residue Research Group
University of Almeria
04120 Almeria,
Spain

Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要約

液体クロマトグラフ飛行時間質量分析計のフルスキャン精密質量スペクトル（ポジティブイオンモード）を用いる、食品抽出物中の 600 種類の農薬と分解物のスクリーニングを目的として、molecular feature (MF) アルゴリズムを使用したデータベース検索を構築しました。データベースサーチは、イオン抽出やデータベース中の化合物とのモノアイソトピック精密質量の比較をせずに、実際の化合物のクロマトグラムピークとして検出および同定されたイオンの精密質量を用いて行います。スクリーニング基準は、 ± 5 ppm の精密質量ウィンドウ、 ± 0.2 分のリテンションタイム、および 1,000 カウントの最小面積カウント (S/N 比 10:1 以上) から構成されます。600 種類の化合物の中の 100 種類に対して、検出下限値とリテンションタイムを測定しました。検出下限値は化合物の 34% が 0.01 mg/kg 以下、

化合物の 95% が 0.5 mg/kg 以下となりました。MF アルゴリズムの強みは、手動による方法で数時間から数日を要するのと比べ、数分内に高感度レベルで数百種類の化合物を迅速にスクリーニングすることです。

緒言

農薬による食料品の汚染は、常に消費者にとってリスクを意味します。特に敏感な集団である胎児、幼児、子供などは、欧州連合法によるベビーフード中のリミット値 0.01 mg/kg で現在は保護されています [1]。最大残留限界 (MRL) は、市場に出ている製品から測定可能な残留物が検出されないように、考えられる最低レベルに設定する必要があります。しかしながら、果物や野菜の輸送および保存のために防カビ剤を使用するだけでなく、作物保護のために殺虫剤を使用するために、これが困難なことがよくあります。

ベビーフード中の農薬の分析には、GC/MS と LC/MS 両方のメソッドを必要としました。古典的には、GC/MS を使用して特に塩素系殺虫剤や除草剤といった揮発性農薬を探し、LC/MS を使用してさらに極性の強い殺虫剤、除草剤、防カビ剤などをモニタリングしてきました。GC/MS メソッドはフルスキャンと選択イオンモニタリングの両方に依存します。最近、GC/MS にリバースサーチメソッドを使用することで、大きな NIST 農薬ライブラリを数分で検索可能になり [2]、GC/MS メソッドの影響を受けやすい農薬に対するスクリーニングがかなりシンプルになりました。



Agilent Technologies

残念ながら、同様のリバースサーチメソッドは 2 つの理由から LC/MS に利用できません。まず、シングル四重極とトリプル四重極は、農薬スクリーニングのためのフルスキャンモードで感度が足りません。次に、汎用的に利用するための CID 解裂エネルギーの標準化と再現性を得ることが難しく、一般的なスペクトルライブラリが利用できなくなっています。最近、LC/TOF MS を使用することで、データベースサーチ [4] に適した 1 ppm 未満 [3] の精密質量を持つフルスキャンスペクトルを入手する機能と感度を有することが分かりました。

実験

野菜と果物の抽出物 (QuEChERS)

QuEChERS は抽出メソッドの頭字語で、quick (速い)、easy (簡単)、cheap (安価)、effective (効率的)、rugged (丈夫な)、safe (安全) を表します。このメソッドは、食品中の農薬を迅速に抽出するために幅広く採用されています。

- 事前に均質化されたサンプルを 40 mL テフロン遠心分離管に 15 g 量り取ります。アセトニトリル (1% の酢酸を含む) 15 mL を加え、無水 MgSO_4 6 g と $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (酢酸ナトリウム三水和物) 2.5 g を加え、そしてボルテックスミキサーを最高スピードで使うか手で振るかで、サンプルを 1 分間強く振盪します。3,700 rpm で 3 分間、遠心分離機に掛けます。
- 上澄み 5 mL を 15 mL チューブに取り、PSA 吸着剤 250 mg と MgSO_4 750 mg を加え、ボルテックスミキサーで 20 秒間振盪します。次に、3700 rpm で 3 分間、再び遠心分離機に掛けます。1.0 mL を LC/MS バイアルに移します。次に、1.0 mL の上澄みを濃縮乾燥して、LC/MSD TOF とイオントラップ分析用の 8/92% のメタノール/水溶液に戻します。
- 果物と野菜の抽出物の直接分析は、50 μL を注入して分析しました。
- 非強化サンプルは、LC/MS TOF で同じように直接分析しました。

LC/MS TOF メソッド

- LC ポンプ: Agilent 1100 バイナリポンプ、注入量 50 μL 、標準 Agilent 1100 ALS 付き
- カラム: ZORBAX Eclipse® XDB 4.6 x 150 mm C-8、5 ミクロン (p/n 993967-906)
- 移動相 A = 0.1% ギ酸水溶液、B = アセトニトリル、グラジエントは B の 10% で 5 分間アイソクラティック後、流量 0.6 mL/min、30 分で B 100% まで直線グラジエント。

- Agilent 6210 LC/MS TOF、ディアルスプレーエレクトロスプレーイオン源
- ポジティブ ESI、キャピラリ 4000 V
- ネブライザ 40 psig、乾燥ガス 9 L/min、ガス温度 300 °C
- フラグメンタ 190 V、スキマー 60 V、Oct DC1 37.5 V、OCT RF V 250
- リファレンス質量: 質量範囲 (m/z) 121.0509 と 922.0098、分解能: m/z 922.0098 で 9500 ± 500 、 m/z 50 で 1000、リファレンス A スプレイヤー 2 は分析中、定流量。

結果と考察

Molecular feature データベースサーチ

化合物の理論的モノアイソトピック精密質量は、分子式から Excel 表計算ソフトを使用して計算し、csv (コンマ区切り) 形式で記録しました。これはポジティブイオンエレクトロスプレーでイオン化する 600 種類の農薬に対して、Agilent LC/TOF MS システムの TOF ソフトウェアで使用するためです。csv ファイルは、「Formula DB Generator」という Excel 表計算ツールにより、TOF ソフトウェア上で作成されます。

次に、サンプル分析完了時に LC/TOF MS 装置により、csv ファイルは自動的に検索され、データベースで発見された化合物に関するレポートが作成されます。検索基準には、ppm 質量許容値 (5 ppm)、可能な場合にリテンションタイムウィンドウ (0.2 分)、化合物スレッシュホールド (1000 カウント、S/N 10:1 以上、または 0.06% 相対容量) と呼ばれる最小ピーク高さカウント、そして付加体およびニュートラルロスも含まれます。

検索ルーチンは molecular feature extractor と呼ばれ、現在 Agilent LC/TOF MS で利用可能なソフトウェアです (2005 年 11 月)。molecular feature extractor は、分析したサンプル中の実際の化合物のイオンに相当する LC/MS TOF データファイルの中のすべてのイオンを検出します。ノイズとその他の無関係なイオンは除かれます。次に、選択した基準を使用して作成したイオンのリストは csv データベースと対照して検索され、検出されたイオンはフルスキャンスペクトルから一覧にされ、データベースと対照して精度とリテンションタイムが確認されます。操作が簡単で、検索を完了するのが速いため、molecular feature extractor による方法は大きなライブラリによく適しています。従って、リバースサーチのように、データベース中の各対象イオンがサンプルファイルから抽出されることはありません。この作業には、プロファイルモードで収集された LC/TOF MS データファイルを使用して多くの時間が必要です。

この点から、確認はリテンションタイムマッチと解裂イオン (存在する場合) のポジティブスクリーニングを手動で行ないます。その結果として、サンプルは高電圧で解裂イオンを確認するために再分析し、標準品の分析結果と比較することもあります。

検出限界

検出限界 (LOD) の測定は100種類の化合物 (表1) の溶媒抽出物およびいくつかのマトリックスにスパイクした食品サンプルを用いて行いました。これらの化合物は、果物や野菜処理用に米国と欧州で一般的に使用される農薬の主要分類で構成されます。検出限界は、3 ppm 未満の精密質量と A+1 と A+2 の同位体パターンの正確な精密質量の出現に基づきました。ベビーフードに対して 0.01 mg/kg、農薬と作物の種類に応じて、さまざまな食品レベルに対して 0.05、0.1、0.5 mg/kg の EU 規制を含む、農薬作業に対してさまざまなレベルで LOD を測定しました。

LOD は 33 種類の化合物に対して 0.01 ppm 以下で、60 種類の化合物 (60%) に対して 0.05 以下でした。0.05 mg/kg の LOD は、禁止物質または規制化合物の食品モニタリングにとって重要なものの 1 つでもあります。95% の化合物の LOD は、食品に対して 0.2 mg/kg 以下でした。6 種類の化合物だけが、食品に対して 0.5 mg/kg の LOD と感度が悪いことが分かりました。感度の悪い化合物はプロメカルブとアルジカルブで、これらはエレクトロスプレーイオン源で簡単に解裂し、MH⁺ イオンに対して低いアバンダンスを示す 2 種類のカルバメート農薬です。同様に、マラチオンオキソンとジメトエートは簡単に解裂する有機リン酸農薬です。その

ため、これらの化合物は MH⁺ よりも感度の高い解裂イオンを使用することで、高感度に検出できました。たとえば、図 1 にはジメトエートのマススペクトルを示しています。MH⁺ イオンはスペクトルの中の大きな解裂イオンではなく、実際に m/z 124.9819 のイオンより約 3 ~ 4 倍悪い感度を示します。

さらに、LOD が 2 つの理由でマトリックスの影響を受けることに配慮する必要があります。1 つ目はイオン化の抑制で、2 つ目はほぼ同一質量の干渉イオンです。イオン化の抑制は、ピーマン、ブロッコリー、トマト、メロン、オレンジ、レモンなどを含む食品中のいくつかの農薬に対する事前試験を行ったので [7]、どのマトリックスが最も難しいかの経験があります。たとえば、図 2 には農薬を含まないピーマンのマトリックスのクロマトグラムを示していて、これは複雑なクロマトグラムになっています。MF データベースサーチにより、どれ 1 つ農薬ではない 3000 種類に及ぶ化合物を同定しました。これらのピークは S/N 比 10:1 以上で、特に微量でイオンを検出するのが極めて難しいマトリックスが存在します。

これらの困難なマトリックスにスパイクした食品抽出物を使用して、表 1 に示した化合物の LOD を規定しました。印刷例は図 3 のとおりです。レポートには、化学式、化合物、中性分子の精密質量、エラー (mDa)、エラー (ppm)、リテンションタイムエラー (分)、説明 (具体的に、防カビ剤など) が含まれます。MH⁺ のマススペクトルと化合物の同位体パターンも示されます、特に大部分の農薬はハロゲンまたは硫黄原子による特徴的な A+2 イオンを示すため、迅速な確認や、化学式の部分的な確認に有効です。

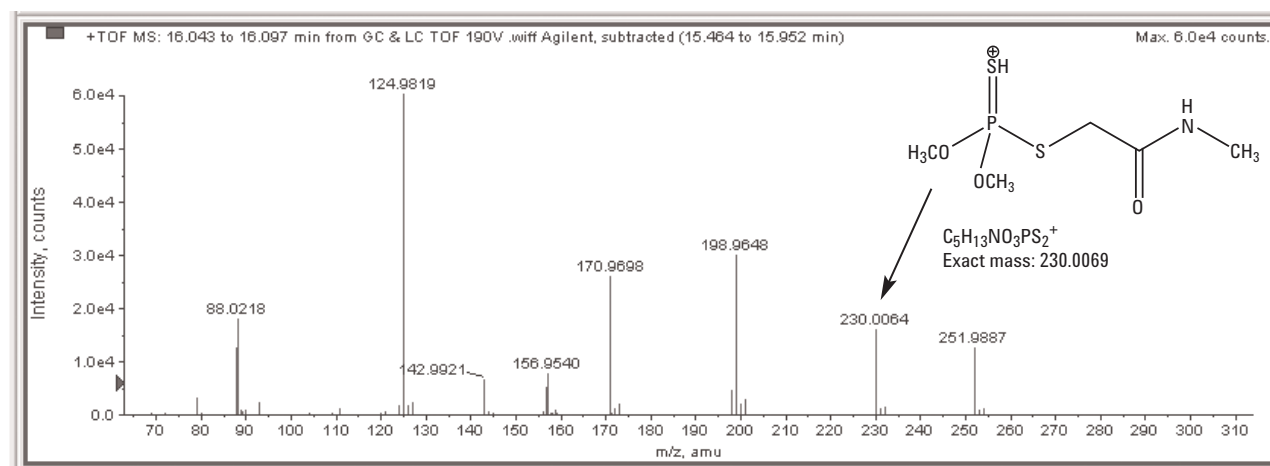


図 1 低強度の MH⁺ イオンと、強度の低い何種類かの化合物、特に m/z 124.9819 のイオンの LOD を下げるために、特徴のある解裂イオンを使用することの重要性を示しているジメトエートのマススペクトル。

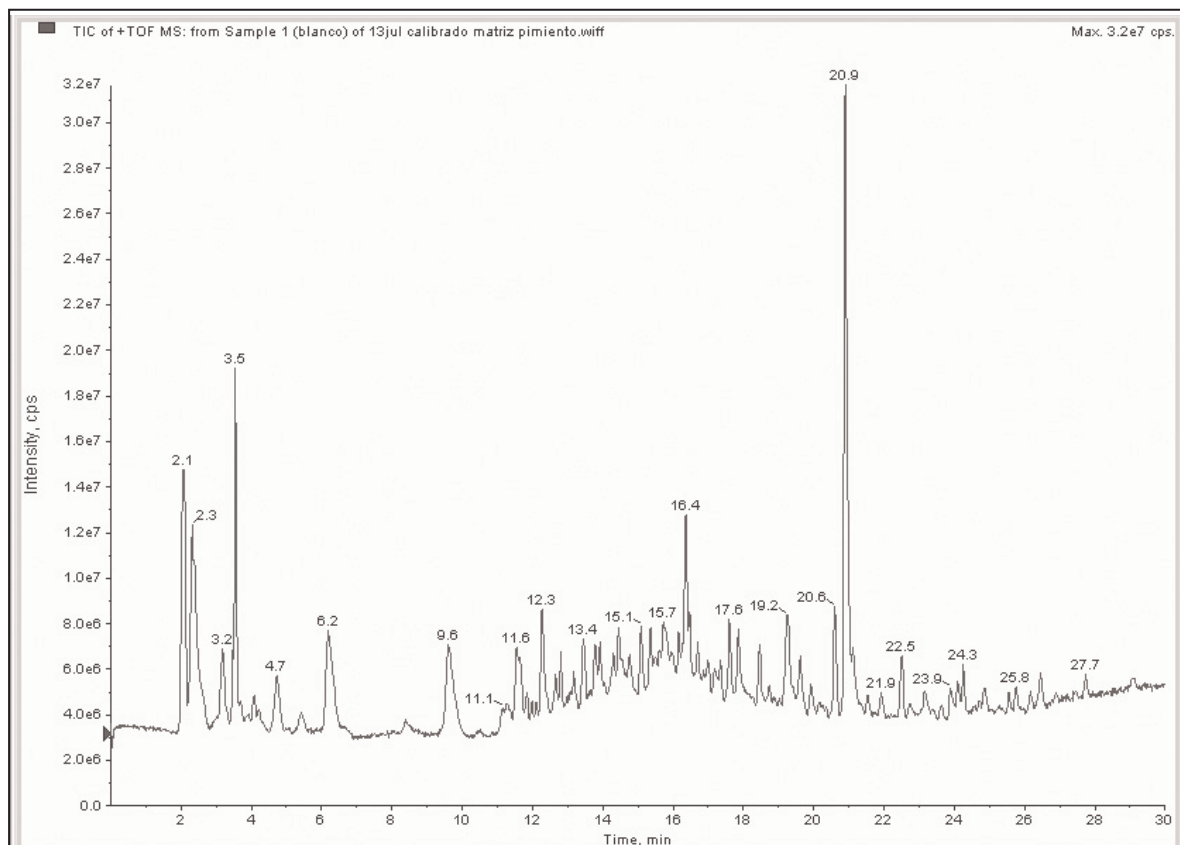


図 2 サンプルの複雑性を示すブランクピーマンサンプルで、S/N 比 10:1 以上で 3,000 本に及ぶ精密質量ピークがこのサンプルで検出されました。

A+2 イオンと実験式確定

MF データベースサーチはスクリーニングプログラムであるため、5 ppm の質量精度ウィンドウを持ち、分子式を明快に確定するものではありません。分子式は化合物の A+2 同位体パターンで確定できます (分子の同定はできません)。たとえば、600 種類の化合物データベースの 70% には、A+2 イオンの同位体クラスターを与える S、Cl、または Br のいずれかが含まれます。強度プロファイルとともに、同位体の精密質量は、実験式の 1 次レベルの確定に用いることができます。従って、このことは分子の同定にまでは至りませんが、精密質量のスクリーニングデータに多くの信頼性を加えます、分子の同定については後述しました。

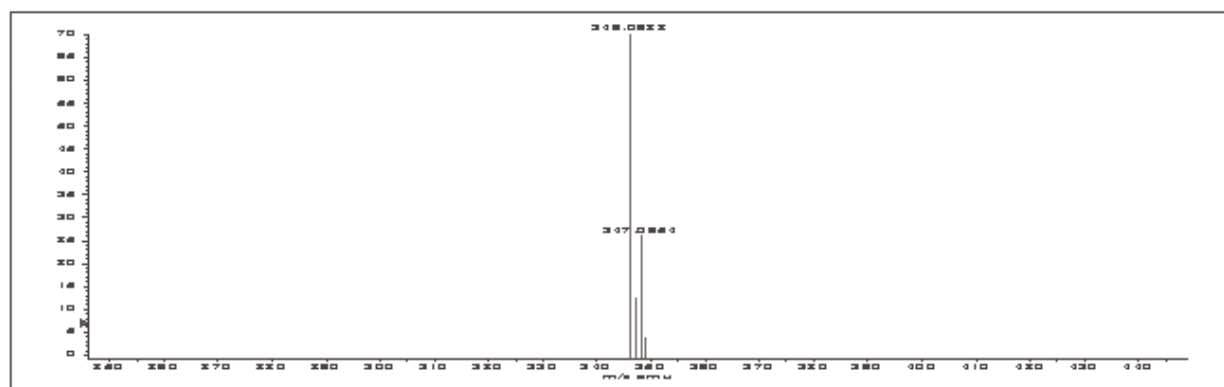
たとえば、西洋ナシ抽出物に含まれるイマザリルの同位体パターンを調べてみましょう (図 4)。MH⁺ の測定質量は 297.0564 で、塩素 37 同位体は 299.0533 でした。そのため、質量差は 1.997 質量単位で、これが置き換えられた塩素 35 原子に対する塩素 37 原子の質量欠損です。さらに、A+2 ピークの強度は A ピークの約 2/3 で、これは分子中に 2 個の塩素原子が存在する場合に一致しています。301.0503 に A+4 ピークが存在することで、このことがさらに立証されます。そのため、これらのデータはイマザリルの分子式を確定するための好材料となります (しかしながら、イマザリルの同定はできません)。質量精度は 0.8 mDa の差 または エラー 2.7 ppm でした。このように、これが農薬分子式のデータベーススクリーニングを確証する方法の 1 例です。データベー

表1 リテンションタイムと精密質量を用いた、食品サンプル中の農薬の検出限界

化合物	リテンションタイム	化学式	精密質量分子	LOD 食品 mg/kg
アトラジン	21.1	$C_8H_{14}N_5Cl$	215.0938	0.005
アゾキシストロビン	24.0	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	403.1168	0.005
ベナラキシル	26.8	$C_{20}H_{23}NO_3$	325.1678	0.005
ブフロフェジン	27.2	$C_{16}H_{23}N_3OS$	305.1562	0.005
シアナジン	22.0	$C_9H_{13}N_6Cl$	240.0890	0.005
ダイアジノン	27.6	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304.1010	0.005
ジフェンコナゾール	26.4	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	405.0647	0.005
異性体	26.6	$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$	405.0647	0.005
ジフェノクスウロン	21.3	$C_{16}H_{18}N_2O_3$	286.1317	0.005
ジメトモルフ	22.2	$C_{21}H_{22}NO_4Cl$	387.1237	0.005
フェナミホス	23.9	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	303.1058	0.005
イマザリル	18.0	$C_{14}H_{14}N_2OCl_2$	296.0483	0.005
イマザピル	20.0	$C_{13}H_{15}N_3O_3$	261.1113	0.005
イマザキン	20.0	$C_{17}H_{17}N_3O_3$	311.1270	0.005
イルガロール	21.2	$C_{11}H_{19}N_5S$	253.1361	0.005
イルガロール代謝物	17.0	$C_8H_{15}N_5S$	213.1048	0.005
イソプロトウロン	21.3	$C_{12}H_{18}N_2O$	206.1419	0.005
メベンダゾール	18.2	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	295.0957	0.005
メトラクロール	25.6	$C_{15}H_{22}NO_2Cl$	283.1339	0.005
メトリブジン	15.0	$C_8H_{14}N_4OS$	214.0888	0.005
ニコスルフロン	17.0	$C_{15}H_{18}N_6O_6S$	410.1009	0.005
プロクロラズ	23.0	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	375.0308	0.005
プロメトン	16.6	$C_{10}H_{19}N_5O$	225.1590	0.005
プロメトリン	19.0	$C_{10}H_{19}N_5S$	241.1361	0.005
プロバジン	23.0	$C_9H_{16}N_5Cl$	229.1094	0.005
プロピコナゾール	25.9	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	341.0698	0.005
異性体	26.1	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	341.0698	0.005
シマジン	18.8	$C_7H_{12}N_5Cl$	201.0781	0.005
スピノシン A	20.9	$C_{41}H_{66}NO_{10}$	731.4608	0.005
スピノシン D	21.9	$C_{42}H_{67}NO_{10}$	745.4765	0.005
スピロキサミン	19.6	$C_{18}H_{36}NO_2$	297.2668	0.005
異性体	19.7	$C_{18}H_{36}NO_2$	297.2668	0.005
テルブチラジン	23.4	$C_9H_{16}N_5Cl$	229.1094	0.005
テルブチルン	20.4	$C_{10}H_{19}N_5S$	241.1361	0.005
トリフルマゾール	25.9	$C_{15}H_{15}ClF_3N_3O$	345.0856	0.005
アセタミプリド	16.3	$C_{10}H_{11}N_4Cl$	222.0672	0.01
アセトクロール	23.0	$C_{14}H_{20}NO_2Cl$	269.1183	0.01
アラクロール	23.0	$C_{14}H_{20}NO_2Cl$	269.1183	0.01
ベンスルタップ	21.4	$C_{17}H_{21}NO_4S_4$	431.0353	0.01
ブロムコナゾール	23.8	$C_{13}H_{12}N_3OCl_2Br$	374.9541	0.01
カルバリル	21.3	$C_{12}H_{11}NO_2$	201.0790	0.01
カルベンダジム	6.2	$C_9H_9N_3O_2$	191.0695	0.01
カルボフラン	20.4	$C_{12}H_{15}NO_3$	221.1052	0.01
カルタップ	3.1	$C_7H_{15}N_3O_2S_2$	237.0606	0.01
クロルフェンビンホス	26.5	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	357.9695	0.01
シプロコナゾール	23.4	$C_{15}H_{18}N_3OCl$	291.1138	0.01
シロマジン	2.9	$C_6H_{10}N_6$	166.0967	0.01
デエチルアトラジン	15.3	$C_6H_{10}N_5Cl$	187.0625	0.01
デシプロビルアトラジン	12.1	$C_5H_8N_5Cl$	173.0468	0.01
ジクロルボス	20.0	$C_4H_7Cl_2O_4P$	219.9459	0.01
ジメテナミド	24.0	$C_{12}H_{18}NO_2SCI$	275.0747	0.01
ジメトエート	16.3	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	228.9996	0.01
ジウロン	21.0	$C_9H_{10}N_2OCl_2$	232.0170	0.01

表1 リテンションタイムと精密質量を用いた、食品サンプル中の農薬の検出限界 (続き)

化合物	リテンション タイム	化学式	精密質量 分子	LOD 食品 mg/kg
エチオフェンカルブ	21.8	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.0823	0.01
フェヌロン	15.7	$C_9H_{12}N_2O$	164.0950	0.01
イミダクロプリド	15.7	$C_9H_{10}N_5O_2Cl$	255.0523	0.01
レナシル	19.2	$C_{13}H_{18}N_2O_2$	234.1368	0.01
マラチオン 1	22.5	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330.0361	0.01
マラチオン 2	16.9	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330.0361	0.01
メタラキシル	21.2	$C_{15}H_{21}NO_4$	279.1471	0.01
メチオカルブ	23.5	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.0823	0.01
メソミル	12.1	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.0463	0.01
モニユロン	18.7	$C_9H_{11}ClN_2O$	198.0560	0.01
ニテンピラム	11.9	$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	270.0884	0.01
オキサジキシル	19.1	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	278.1267	0.01
プロフェンホス	28.6	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	371.9351	0.01
プロメカルブ	24.0	$C_{12}H_{17}NO_2$	205.1341	0.01
プロバクロール	25.6	$C_{11}H_{14}NOCl$	211.0764	0.01
プロスルホカルブ	29.0	$C_{14}H_{21}NOS$	251.1344	0.01
チアベンダゾール	3.7	$C_{10}H_7N_3S$	201.0361	0.01
チアクロプリド	17.7	$C_{10}H_9N_4SCl$	252.0236	0.01
チオシクラム	4.5	$C_5H_{11}NS_3$	181.0054	0.01
アルジカルブ	18.5	$C_7H_{14}N_2O_2S$	190.0776	0.05
アルジカルブスルホキシド	6.0	$C_7H_{14}N_2O_3S$	206.0725	0.05
ベンダイオカルブ	20.6	$C_{11}H_{13}NO_4$	223.0845	0.05
クロロトルロン	20.4	$C_{10}H_{13}N_2OCl$	212.0716	0.05
フルフェナセット	25.0	$C_{14}H_{13}N_3O_2SF_4$	363.0665	0.05
ヒドロキシアトラジン	11.5	$C_8H_{15}N_5O$	197.1277	0.05
ルフエヌロン	28.6	$C_{17}H_8N_2O_3Cl_2F_8$	509.9784	0.05
メタミトロン	14.0	$C_{10}H_{10}N_4O$	202.0855	0.05
メチダチオン	24.1	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	301.9619	0.05
メチオカルブスルホン	17.4	$C_{11}H_{15}NO_4S$	257.0722	0.05
モリネート	24.8	$C_9H_{17}NOS$	187.1031	0.05
パラチオンエチル	27.3	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291.0330	0.05
プロパニル	17.0	$C_9H_9NOCl_2$	217.0061	0.05
トリクロカルバン	27.5	$C_{13}H_9Cl_3N_2O$	313.9780	0.05
アルジカルブスルホン	11.4	$C_7H_{14}N_2O_4S$	222.0674	0.1
ブロマシル	18.5	$C_9H_{13}N_2O_2Br$	260.0160	0.1
ブロムコナゾール	23.8	$C_{13}H_{12}N_3OCl_2Br$	374.9541	0.1
ブチレート	15.0	$C_{11}H_{23}NOS$	217.1500	0.1
ジフルベンズロン	25.0	$C_{14}H_9N_2O_2ClF_2$	310.0321	0.1
フルフェノクスロン	29.2	$C_{21}H_{11}N_2O_3ClF_6$	488.0362	0.1
フルロキシビル	18.8	$C_7H_5N_2O_3Cl_2F$	253.9661	0.1
ヘキサフルムロン	27.2	$C_{16}H_8N_2O_3Cl_2F_6$	459.9816	0.1
イマザリル分解物	14.6	$C_{11}H_{10}N_2OCl_2$	256.0170	0.1
イプロジオン	25.4	$C_{13}H_{13}N_3O_3Cl_2$	329.0334	0.1
ペンジメタリン	25.0	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	281.1376	0.1
テフルベンズロン	27.6	$C_{14}H_6N_2O_2Cl_2F_4$	379.9742	0.1
キャプタン	24.4	$C_9H_8Cl_3NO_2S$	298.9341	0.5
クロルピリホスメチル	28.2	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	320.8950	0.5
スピロメシフェン	23.0	$C_{23}H_{30}O_4$	370.2144	0.5
チオサルタップ	3.2	$C_5H_{13}NO_6S_4$	310.9626	0.5



Experiment#: 1 Compound#: 327 Mass : 345.08553

Mass Value = 345.08553							
#	Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	* Error (ppm)	Ret. Time Error	Description
1	C15H15N3OCIF3	Triflumizol	345.08557	-0.04	-0.1	-0.02	

図3 Molecular FeatureMoMoデータベースサーチのレポート例。

スヒットのマニュアルスクリーニングに役立てるために、データベースレポートには同位体パターンと精密質量を印刷します。

化学式が A+2 原子を含まない場合 (つまり、C、H、N、O だけから構成される)、この方法で化学式の確定は簡単にはできません。理由は A+1 ピークだけが存在し、このピークは分子の炭素 13 シグナルで占められているため、それ自体は化学式の確定には十分ではありません。そのため、これらの農薬 (データベースの約 30%) にとって、より多くのデータが必要です (特に、リテンションタイムまたは解裂イオン)。

果物と野菜のスクリーニング

表 2 には、MF データベースサーチで 600 種類の農薬に関して、近くの食料品店で購入した 6 種類の果物と野菜サンプル (リンゴ、西洋ナシ、トマト、ジャガイモ、ピーマン、キュウリ) と 1 種類の市販オリーブオイルをスクリーニングした結果を示しています。MF データベースサーチにより、サンプルのクロマトグラム中に 617 ~ 2,681 本の精密質量ピークを検出しました。最も複雑ではないサンプルマトリックスは 617 本のピークを持つトマトで、リンゴは 2,681 本のピークを持つ最も複雑なサンプルでした。MF データベースサーチの感度は S/N 比 10:1 に設定しました。S/N 比を 20:1 から 10:1 に減らすことで、約倍の数のピークを検出しました。化合物の良好な同位体パターンを得るために 10:1 の値を選択しました、その値は A+1 と A+2 の同位体パターンを示す装置の最大感度です。

MF データベースサーチの精度ウィンドウは、LC/TOF MS システムの質量精度内にあうように 5 ppm に設定しますが、通常は 3 ppm 未満で操作し、1 ~ 2 ppm (約

0.3 mDa) でもよく操作します [3]。これらのサンプルについて 5 ppm の質量ウィンドウ内で検出された農薬の数は 8 ~ 41 種類となりました。この一致判定基準は、MH⁺ イオンがデータベース値の 5 ppm 以内にあることでした。そのため、1 例として、2,402 本のピークを検出したピーマンのサンプルでは、5 ppm 精度ウィンドウに適合するピークはその中の 41 本だけでした (表 2)。

これら 41 本のピークの中で、3つの化学式だけが正確な同位体パターンとリテンションタイム一致に基づいて (A+2 同位体を含まない化合物) 確認されました、それは自動データベース一致の出力だけでなく、データファイルの手動確認でも照合しました。農薬は、ジャガイモサンプルでは検出されず、オリーブオイルでは 1 種類、ピーマンとトマトでは 3 種類、キュウリとリンゴでは 5 種類を確認しました。果物と野菜のサンプル中で検出された最も一般的な化合物は、販売前の果物や野菜の輸送および貯蔵に使用される収穫後防カビ剤であるイマザリルでした。その他の化合物としては、ダイアジノン、ホスメット、マラチオン、そして農薬の分解物であるマラチオンのオキソンといった有機リン殺虫剤を含んでいました。トマトサンプル中に昆虫成長調整剤ブプロフェジン、防カビ剤であるチオフアネートメチルとカルベンダジムが検出されました。

トマトには疑陽性という興味深い問題があります。最初に分析したときのスクリーニングではベンチアズロン *m/z* 208.1234 だけが検出されました。手動でこの化合物を検証すると、保持時間が一致する、より高質量の別の化合物が示されていました。その化合物は高濃度で精密質量は 5 ppm 以上ずれていました。希釈して再分析したところ、ベンチアズロンよりもむしろブプロフェジンとして検出されました。

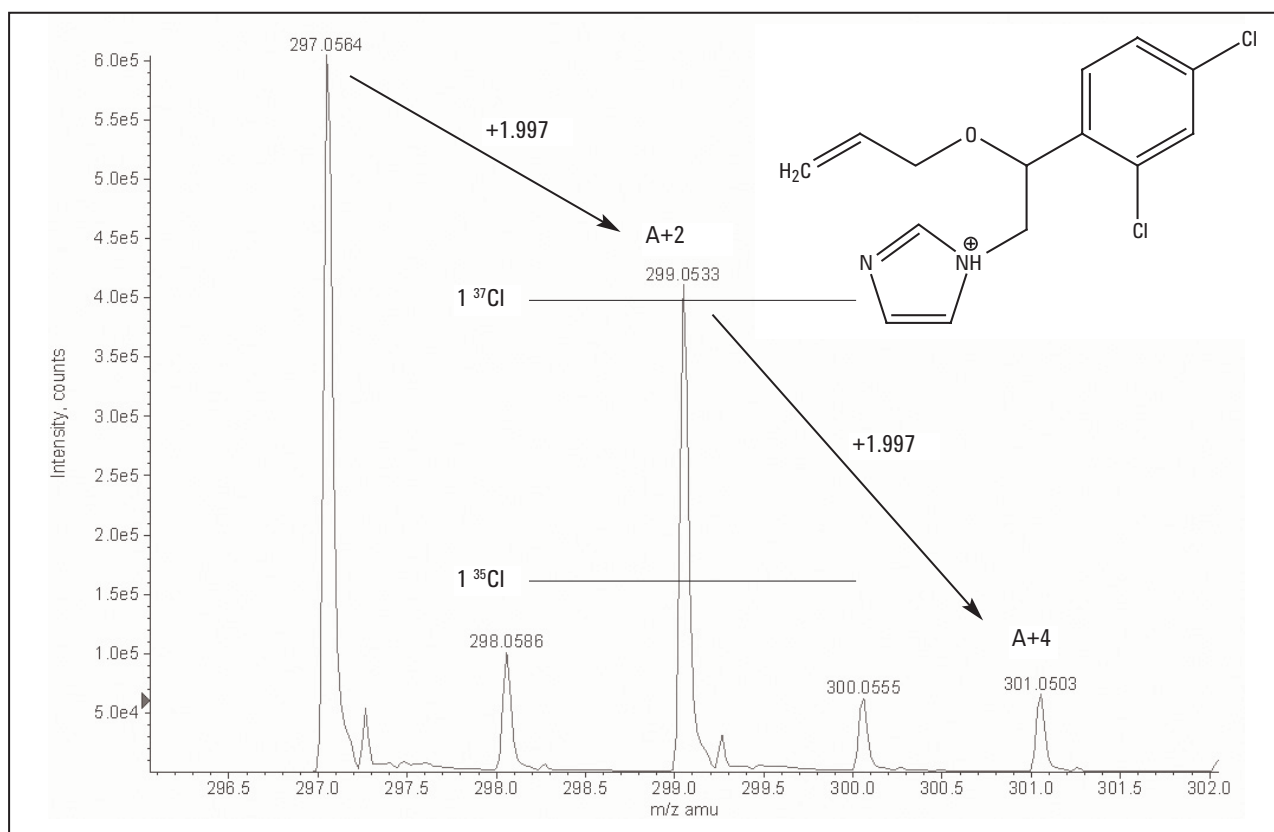


図4 西洋ナシ抽出物中の m/z 297 イオンの同位体クラスターとイマザリルの構造式。

このように、トマトはデータベーススクリーニングを行う際に、もっとも問題を抱えた試料ですが、ある意味、最も有効な試料でもあります。偽陰性の原因は農薬が高濃度であることで、質量数が5ppmの範囲外になります。この問題は試料の希釈、あるいは、農薬のA+1 ^{13}C 同位体を用いることで修正ができます。同様な偽陰性は、西洋なしのイマザリルでもありました。従って、データベースは主用な高濃度化合物に対して、 MH^+ の ^{13}C 同位体を加えて修正をおこないました。補正は表計算を使って行い、12.0000の炭素を一つ引いて、13.00335の ^{13}C 原子を加えます。

ベンチアズロンの偽陽性は興味深い結果で、元の除草剤あるいは分解物の開裂イオンと同じ計算式になる場合におきます。今回の果物や野菜から見つかった例は、ベンチアズロンだけでなくデイズプロピルアトラジン(m/z 174.05465)も含まれます。それは、テルブチラジンの開裂イオンで、 m/z 230.11725から56.0626が取れたイオンです。このように、データベースの構築には、このような問題を考慮することが重要です。特にデータベース中に入力した保持時間のない化合物、あるいは、保持時間のウィンドウ範囲が0.2分以内の化合物に対してです。

すべての確定サンプルの精度は、それぞれ 0.3 mDa (1.2 ppm) の絶対平均値と 0.25 mDa (1.0 ppm) の標準偏差を示しました (表 2)。リテンションタイム一致の絶

対平均値は 0.07 分で、0.09 分の標準偏差でした。そのため、データベース用に選択されたウィンドウは十分な誤差範囲を持ち、質量精度とリテンションタイムの平均値の2つの標準偏差に基づいて99%の化合物を検出するように選択されます。

ベビーフードサンプルのスクリーニング

テストした化合物100種類の中で、33種類がベビーフードスクリーニングレベルの0.01 mg/kgに適合しました。データベースサーチで唯一検出された化合物は、西洋ナシ、バナナ、オレンジのピューレ中の微量のイマザリルでした。さらに、イマザリルの供給源と考えられるレモンジュースもベビーフードに使用されていることが、ラベルの調査から分かります。濃度は約0.0005 mg/kgでしたが、ベビーフードの安全レベルの0.01 mg/kgよりかなり少ない数値です。イマザリルは、2つの塩素原子による特徴のあるA+2塩素パターンを含むため、簡単にスクリーニングできます。同定エラーは0.3 mD (1 ppm) でした。データベース中のその他の化合物は検出されませんでした。解裂イオンのシグナルが低く、疑わしいイマザリルの濃度が低いため(0.0005 mg/kg)、このサンプルに関して確認はできませんでした。しかしながら、ベビーフードの健康リミット値0.01 mg/kgに基づき、このサンプルは安全とスクリーニングされました。いろいろな有名ブランドの野菜や果物を含む約10種類の

表2 MF データベースを使用して食品サンプル中のスクリーニングした農薬

サンプル	スクリーニングさ ピークした	農薬 一致 < 5 ppm	確定された農薬 LC/TOF MS	エラー mDa	エラー ppm	リテンシ ョンタイム エラー(分)	偽 陰性	偽 陽性
リンゴ	2681	12	イマザリル イマザリル分解物 イプロジオン フルキンコナゾール ジフェノコナゾール	-1 0.22 0.05 -0.74	-3.9 0.7 0.1 -1.8	-0.08 -0.12	0	0
オリー ブオイル	1678	10	テルブチラジン (デインプロピルアトラジン)	0.06	0.2	0.09	0	0 1
ピーマン	2402	41	イマザリル ダイアジノン ブフロフェジン	0.3 0.11 1	1 0.3 3.3	0.07 0.12 0.1	0	
トマト	617	8	ブフロフェジン (ベンズチアズロン) カルベンダジム チオファネートメチル				0	1
キュウリ	1619	17	チアベンダゾール マラチオン異性体 1 マラチオン異性体 2 マラチオンオキソン イマザリル	0.2 0.04 0.22 0.25 -0.1	1 0.1 0.7 0.8 0.3	0.01 0.05 -0.03 0.08 0.05	0	0
西洋ナシ	1209	14	イマザリル カルベンダジム イマザリル分解物 ホスメット	-0.21 0.51 0.31	-1.1 2 1	0.05 0.03 0.04	0	0
ジャガイモ	1150	11	なし				0	0
			平均	0.30	1.20			
			標準偏差	0.25	1.00			

異なるベビーフードサンプルがスクリーニングされ、上記のイマザリルを除き、MF データベースサーチに含まれる農薬に関しては、陽性として検出されませんでした。低い LOD が要求されるため、ベビーフードサンプルはスクリーニングの最も困難なサンプルであることを示しています。

MF データベースサーチの短所と長所

データベースの唯一の短所は、マトリックス中イオンの干渉あるいは極端に高濃度の農薬により質量精度が落ちることです。この問題は、MH⁺のC13アイソトープを考慮する、あるいは2番目のイオン(解裂イオン)またはナトリウムかアンモニウムの付加イオンを追加することで、簡単に解決されます。

データベースサーチと組み合わせた精密質量 LC/TOF MS を使用することは、食品や水の中の農薬を同定する新たなモニタリング技術の強力な 1 例です。解裂パター

ンの比較に古典的な解裂ライブラリを使用することは、LC/TOF MS では必要はありません。むしろ、特に 1 つまたは 2 つの精密質量の解裂イオンを組み合わせた場合、分子式と計算した精密質量を使用することで、解裂イオンの強度や、装置毎やマトリックス毎にどのように変わるかを心配せずに化合物の身元が分かります。

たとえば、Molecular Hunter ソフトウェアは、.mhd ファイルを使用して Molecular Feature データベースと連動して機能して、正確なリテンションタイム(0.005 分以内で一致)に従ってグループ内のイオンを結び付けます。そのため、イマザリルといった農薬の解裂イオンをマトリックスのバックグラウンドイオンから検出および区別することができます。そのため、LC/MS ライブラリの大きな問題は、MH⁺ イオンと大きな解裂イオンを使用した Molecular Feature アルゴリズムを用いた食品中の農薬スクリーニング用精密質量データベースによって解決されようとしているというのが著者の見解です。

参考文献

1. PAN Europe position on the European Commission Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin COM(2003) 117 final, 2003/0052 (COD).
2. Phillip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD using Deconvolution Reporting Software, Agilent Technologies, publication 5989-1157EN.
3. Imma Ferrer, E. M. Thurman, 2005, Measuring the mass of an electron by LC/TOF MS: A study of twin ions, *Analytical Chemistry*, 77, 3394–3400.
4. E. Michael Thurman, Imma Ferrer, 2005, Identification of unknown pesticides in food using both LC/MSD TOF and ion trap MSⁿ, Agilent Technologies, publication 5989-1924EN.
5. E. M. Thurman, Imma Ferrer, J. A. Zweigenbaum, J. F. Garcia-Reyes, Michael Woodman, A. R. Fernandez-Alba, 2005, Discovering metabolites of post-harvest fungicides in citrus with liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1082, 71–80.
6. Imma Ferrer, Juan F. Garcia-Reyes, M. Mezcua, E. M. Thurman, A. R. Fernandez-Alba, 2005, Multiresidue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1082, 81–90.

Acknowledgments

We thank Dr. Amadeo R. Fernandez-Alba for his ideas and discussion on database design.

詳細情報

Agilent 製品およびサービスの詳細は、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料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。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

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。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、本資料を複製、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. 2006

Printed in Japan
September 13, 2006
5989-5496JAJP



Agilent Technologies