

高分解能 GC/Q-TOF と農薬および 環境汚染物質の精密質量ライブラリによる 汚染物質のスクリーニング

著者

Sofia Nieto,
Anastasia Andrianova,
Jessica Westland, Kai Chen,
and Bruce Quimby
Agilent Technologies, Inc.

概要

複雑な食品マトリックス中の農薬などの汚染物質の広範囲なスクリーニングにおいて、高分解能、精密質量 GC/Q-TOF の使用が過去数年間で増加しています。GC/Q-TOF から得られる複雑な高分解能データにより、スクリーニングと定量の両方のワークフローで信頼性が向上しますが、以前はこの価値を十分に活用するには長い時間を要していました。このアプリケーションノートで紹介するソフトウェアにより、このようなデータを容易にレビューしながらその価値を最大限に活かし、優先ターゲット化合物の定量とより多くのサスペクト化合物の信頼性の高いスクリーニングが可能になり、これらすべてを 1 つの環境で同時に実現できます。ワークフローでは、先ごろ更新された農薬および環境汚染物質の GC/Q-TOF 精密質量ライブラリも使用します。

はじめに

食品中の残留農薬のテストは、食品の安全性を確保するために重要です。食品マトリックス中の汚染物質のスクリーニングには、最大残留基準値 (MRL) に関する厳しい規制要件に適合する高い感度、および包括的な範囲が要求されます。高分解能 GC/Q-TOF システムの利点の 1 つは、感度を保持したまま、事実上無限の数の化合物を 1 回の分析でスクリーニングできることです。しかし、従来より、複雑な高分解能データの処理はこの手法の最も手間と時間のかかる部分でした。理想的には、この目的のために使用されるデータ処理ソフトウェアで、このタイプのデータについて多面的な評価を自動化できるようにする必要があります。それによって、他のテクノロジーでは以前は見逃されていた化合物を見つけることができます (つまり偽陰性が低減します)。そして、ユーザーは陽性サンプルの同定を高い信頼性のもとで容易に確認し、偽陽性の可能性により確認が必要な場合はデータに確実に目印を付けることができます。このような機能は、バッチ中にキャリブレーションされる優先化合物と、パーソナル化合物データベースおよびライブラリ (PCDL) から純粋にスクリーニングされるサスペクト化合物の両方で、信頼できるものである必要があります。最終的に、このようなソフトウェアによってこれらの機能のためのデータ処理時間を短縮する必要もあります。また、ユーザーの介入がほぼ不要になるほど十分に信頼性の高いものとなることが重要です。

このアプリケーションノートでは、データのレビュープロセスに高度の柔軟性を提供しつつ、SANTE/11945/2015 ガイドライン¹ に準拠するように設計された農薬のスクリーニングのための最新のワークフローについて説明します。

USDA がイチゴを最も一般的な汚染された食品の 1 つとみなしているため、イチゴ抽出物を用いてワークフローを実証しました。²

実験方法

イチゴサンプルは、一般的な果物や野菜用の dSPE クリーンアップを用いた EN QuEChERS メソッドで抽出しました (部品番号 5982-6650 と 5982-5056)。詳細情報については、Agilent アプリケーションノート「デコンボリュートしたスペクトルのライブラリ検索によるイチゴ中の農薬の許容レベルでの GC/MSD スクリーニング」³ を参照してください。

サンプルは、Agilent 8890 GC を 15 m × 15 m ミッドカラムバックフラッシュで構成 (図 1) し、40 分のリテンションタイム

ロック (RTL) メソッドにより、クロロピリホスメチルに 18.111 分の RT でロックして分離しました。サンプルは、Agilent 7250 GC/Q-TOF およびフルスペクトル採取モードの Agilent 5977B GC/MSD で分析しました。表 1 に GC/Q-TOF の条件を示します。このメソッドのバックフラッシュにより、一貫性のある RT の保持、キャリアオーバーの回避、カラム寿命の延長、イオン源の汚染の低減が可能になりました。5977 GC/MSD の実験条件は、別の資料で説明しています。³

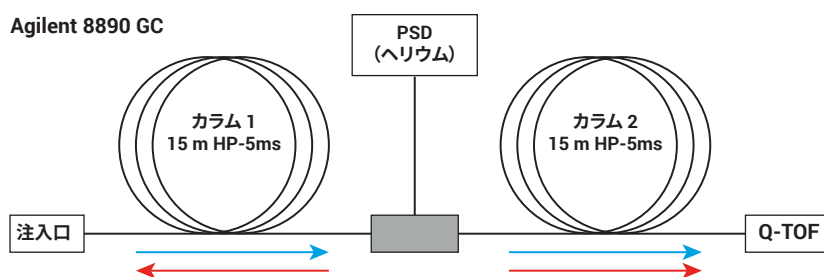


図 1. ミッドカラムによるバックフラッシュの構成。分析最後のバックフラッシュ中のヘリウム流路を赤色の矢印で示しています。パージ付きユニオンの圧力は上昇し、注入口の圧力は低下します。この結果、最初のカラムの流れが逆流し、高沸点の化合物がスプリットベントから排出されました。ニューマティクス切り替えデバイス (PSD) は Agilent 8890 GC ニューマティクス制御モジュールです。PSD にはバックフラッシュ機能があり、パージフローが一定であるためキャリアガス消費量を大幅に減らすことができます。

表 1. GC/Q-TOF パラメータ

パラメータ	設定値
GC/Q-TOF	Agilent 7250 Q-TOF
GC	Agilent 8890 GC
カラム	2 × Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート、15 m、0.25 mm、0.25 μm
注入口	MMI、4-mm UI ライナシングルテーパー、ウール付き
注入量	1 μL
注入モード	バルブドスプリットレス
注入口温度	280 °C
オープン温度プログラム	60 °C で 1 分、40 °C/min で 120 °C まで昇温、5 °C/min で 310 °C まで昇温
キャリアガス	ヘリウム
カラム 1 流量	~ 1.2 mL/min
カラム 2 流量	~ 1.4 mL/min
バックフラッシュ条件	5 分 (ポストラン)、310 °C (オープン)、50 psi (AUX EPC 圧力)、2 psi (注入口圧力)
トランスファーライン温度	280 °C
四重極温度	150 °C
イオン源温度	280 °C
イオン化エネルギー	70 eV
スペクトル採取レート	5 Hz
質量範囲	m/z 45 ~ 650

GC/Q-TOF データの処理には、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 の GC/Q-TOF スクリーニングワークフローと、1,000 種類以上の化合物を含む農業および環境汚染物質の精密質量パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) を用いました (図 2A)。一時的に、GC/Q-TOF データを Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアにインポートし、ダウンストリームデータ解析の速度と品質の向上のために、SureMass フォーマットに変換しました。GC/Q-TOF 精密質量ライブラリ (図 3) から、スクリーニングと定量を組み合わせたメソッドが自動的に作成されました。これにより、更新された GC/Q-TOF PCDL に含まれる化合物の数が増加しています。また、各化合物は、PAH、アミン類、有機リン系、フタレート類、ニトロアニリン類、クロロニトロベンゼン類に該当しています (図 3)。

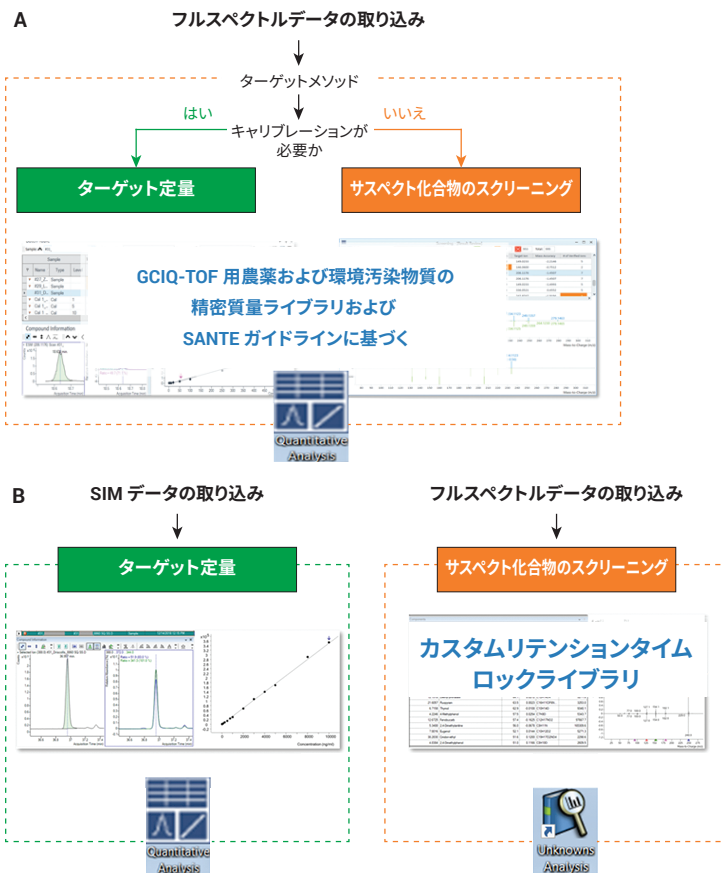


図 2. A) GC/Q-TOF 用の農業と環境汚染物質の PCDL に基づく、汚染物質のスクリーニングとターゲット定量ワークフローの組み合わせ。B) GC/MSD 用のカスタムリテンションタイムロックのユニット質量ライブラリを使用した、スクリーニングとターゲット定量ワークフロー。

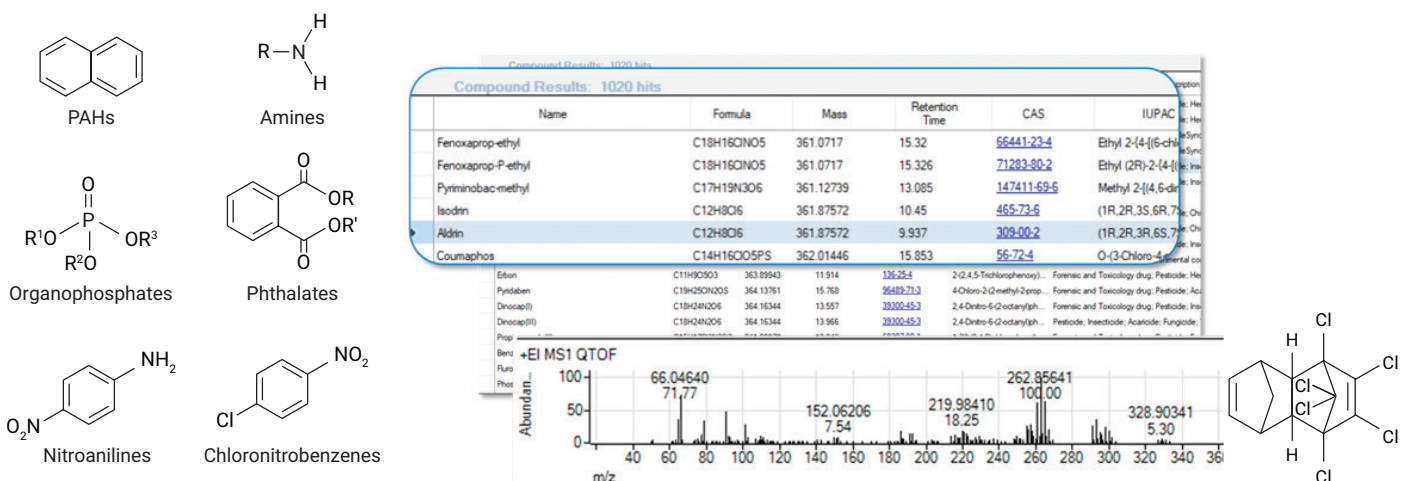


図 3. 1,000 種類以上の化合物の精密質量スペクトルを含む、農業および汚染物質の最新の GC/Q-TOF 精密質量ライブラリ

スクリーニングメソッドパラメータが SANTE ガイドラインに従って設定され、偽陽性と偽陰性の数を減らすために、さらに最適化されました。パラメータには、RT ウィンドウ、質量精度、共溶出スコア、ライブラリー一致スコアが含まれます。例えば、質量精度を 5 ppm に設定し (SANTE ガイドラインに準拠)、RT ウィンドウを 0.05 分に設定しました。RT ロッキングとバックフラッシュは優れた RT 精度および再現性を得られ、この設定により偽陽性が低減します。ライブラリー一致スコアは 75 に設定しました。後者の設定はこのアプリケーション用に最適化されたもので、偽陽性を排除する上で重要なパラメータの 1 つと考えられます。大半の確認済み化合物で、ライブラリー一致スコアは 90 を超えていました。統合されたスクリーニングメソッドを適用した後、マニュアルでレビューして化合物が本当にヒットしたかどうかを判断する必要があったケースは、ごく少数でした。これらの化合物は、自動的に橙色で強調表示されます。

GC/MSD データの処理には、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 および MassHunter Unknowns Analysis とカスタマイズされたユニット質量農業ライブラリーも用いました (図 2B)。³

結果と考察

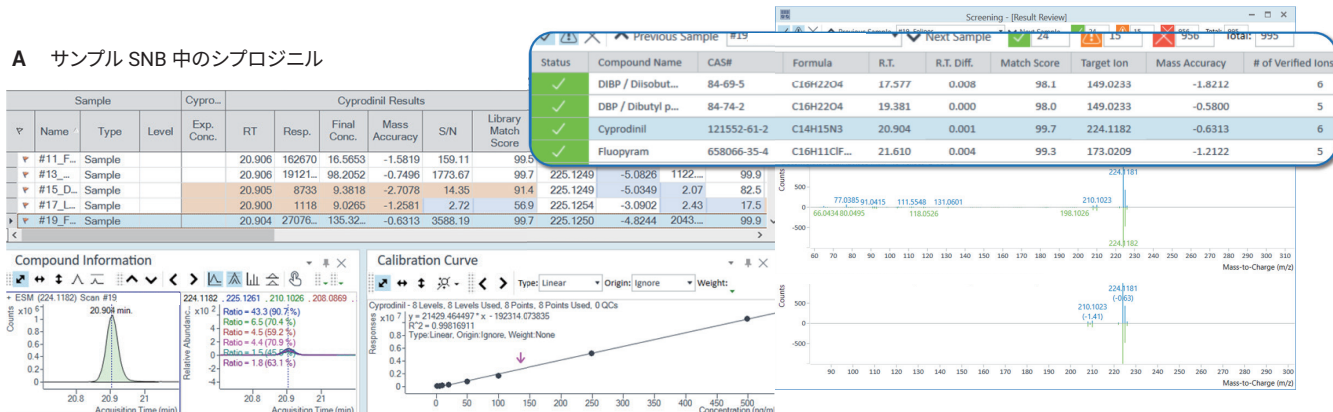
GC/Q-TOF によるサスペクトスクリーニング

GC/Q-TOF 精密質量スクリーニングワークフローをテストするために、14 種類の有機および非有機栽培イチゴサンプルをカリフォルニア州北部の複数の小売店やファーマーズマーケットで購入し、前述の方法で抽出物を準備しました。GC シングル四重極装置で農薬が検出されなかった有機栽培イチゴの抽出物のプールされたサンプルに、非有機のイチゴの栽培でよく散布される 40 種類の優先農薬を 1 ~ 500 ppb でスパイクしました。⁴ このワークフロー (図 2A) を、選択した優先農薬の定量分析および、Agilent PCDL 中の多くの他の農薬および環境汚染物質の高速サスペクト化合物のスクリーニングで使用しました。

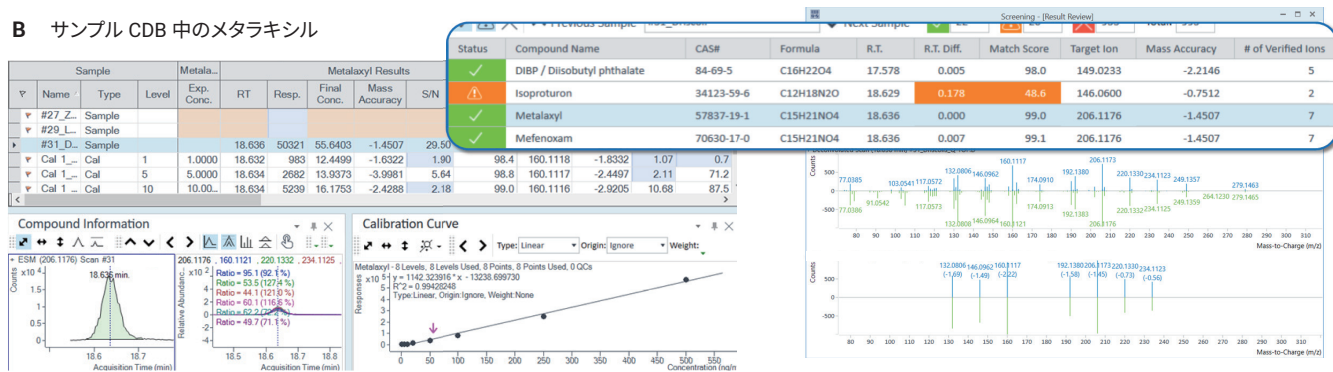
データ解析メソッドを作成するために使用される PCDL 内の全化合物に、サスペクト化合物のスクリーニングメソッドを適用しました。同定された化合物用にキャリブレーション標準が提供されている場合は、濃度が報告されました。汚染物質スクリーニングのこのワークフローにより、従来のワークフロー⁵ と比べて大幅に効率が向上し、1 つのツール内でさまざまな機能を組み合わせて、ターゲット定量とサスペクト化合物スクリーニングの両方に対応できるようになります。

図 4A ~ 4C に、サスペクト化合物スクリーニングワークフローを用いて、GC/Q-TOF によって同定されたイチゴ抽出物中の汚染物質の例を示します。微量レベルを超えて抽出物中に EI スペクトルが豊富に存在する化合物は、一般的に容易に同定でき、70 % 以上の選択性イオンが確認され、質量誤差が約 2 ppm 以内、ライブラリー一致スコアが 90 台後半、RT 差が無視できるほど小さくなっています (図 4A)。ライブラリー一致スコアが低く、RT 差が大きい組み合わせは、レビューアーに提示され、特定のライブラリー農薬の異性体の可能性について確認できます。しかし、通常はマニュアルでの検討の後に、この組み合わせは多くの場合偽陽性であることが明らかになりました (図 4B と 4C)。事実、低いライブラリー一致スコア (このスコアの閾値はユーザー調整可能なパラメータ) は多くの場合、偽陽性を示唆するものでした。比較対象となる標準の分析がない場合でも、良い同定を悪い同定と区別できるこの能力は、複雑なマトリックス中でも正確なフラグメントイオン比を保持できる 7250 の高分解能および精密質量性能の能力を反映しています。

A サンプル SNB 中のシプロジニル



B サンプル CDB 中のメタラキシル



C サンプル HSD 中のピリメタニル

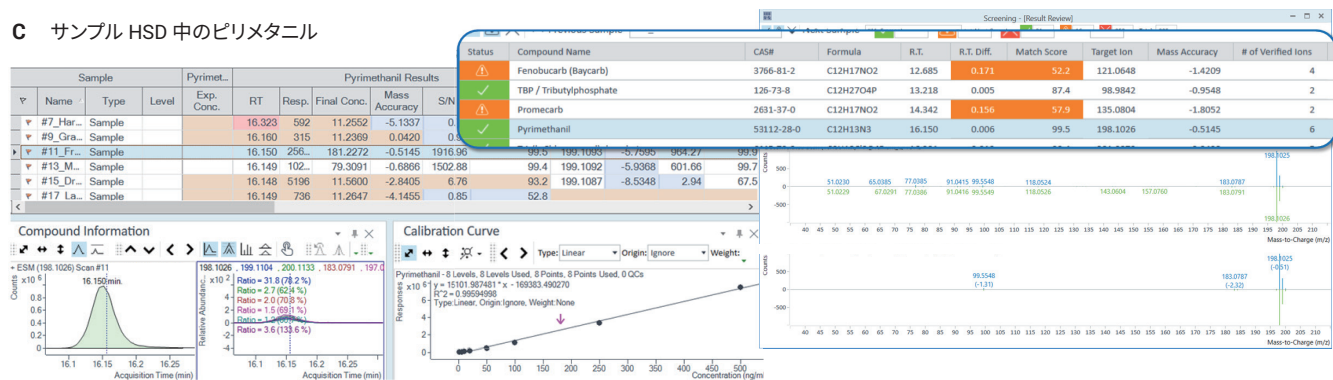


図 4. スクリーニング結果

表 2 に示したように、各非有機抽出物中で 10～20 種類の農薬が同定されました。フロニカミド、ピリメタニル、シプロジニル、フルオピラム、フルジオキシニル、キャプタン、ピフェントリンは、特に頻繁に検出された農薬です。大半の有機抽出物中に、従来の汚染物質を含

め、ごく少数の微量の農薬が含まれていました。イチゴ抽出物から検出された農薬の最低濃度はピリメタニルの 1 ppb、次いでシプロジニルの 1.2 ppb でした。

表 2. ターゲット化合物の定量とサスペクト化合物のスクリーニングの結果のサマリ。標準の利用が可能な場合にはイチゴ抽出物中の汚染物質の濃度が表内に示されています。利用できない場合、その項目には N/A と記されます。最初の 6 つのサンプルは有機栽培です。

化合物	RT	抽出物のサンプル/濃度、ppb													
		CVQ	ZTV	BRV	RST	RCH	NMT	CDB	NMP	DPR	NMJ	RSN	HSD	RTP	SNB
イソホロン	4.83	N/A		N/A				N/A							
ノバルロン	8.28					117.8		119	122.8	101	159.8	182	17.2		
ジフェニルエーテル(ジフェニルオキシド)	8.61									N/A	N/A				
テトラヒドロフタルイミド, cis-1,2,3,6-	9.90			55.3		197.9		615*	893*	37.8	520*	54.9	715*	347.8	
フロニカミド	12.42			48.8		18		62.8	519.7	157	70.8	83.2		50.2	40.7
ピリメタニル	16.16			1.2	11.4			<LOQ	79.3		233.5	1	181.2		
ダイアジノン(ジムピラート)	16.42					14.71									
ペンタクロロアニリン	17.33				N/A										
クロルピリフォスメチル	18.11				N/A									N/A	
カルバリル	18.23					34.8									
メタラキシル	18.64							55.6					28.9		<LOQ
アントラキノン	19.56										N/A				
マラチオン	19.64					36.2				44	<LOQ	39.7	3.5		
テトラコナゾール	20.37							68.1	36.2		27.9				
フサライド(テトラクロロフタリド)	20.45							N/A							
シプロジニル	20.91			1.6	1.2				111.8		179.6	1.2	11.2	20.6	153.7
キャプタン	21.43					151		3,294*	16,598*	58.7	5,188*	92.9	105.3	3,600*	
フルオピラム	21.62								N/A	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A
フォルベット	21.67								N/A						
ヘキシチアゾックス	21.98										46				
フルトリアホル	22.75									17.3		18.2	21.6		
フルジオキシニル	23.41			28.2					101.5		200.2		28.7	36.2	147.9
p,p'-DDE	23.44		<LOQ	<LOQ			<LOQ	<LOQ						<LOQ	<LOQ
マイクロブタニル	23.73							2	1.6		18.2	18		1.6	127.6
キノキシフェン	26.05							30.6				14.3	<LOQ		
フェンヘキサミド	26.20								90.2		242.5				41.8
トリフロキシストロビン	26.50										20.1		21.2		52
ピベロニルプトキンド	27.22					273.9	19.7								
アセタミプリド	27.99								<LOQ						
フルキサピロキサド	28.32														N/A
ピフェントリン	28.34								229.2	220		96.5	36.8	40.7	230.7
ピフェナゼート	28.35								52		44				
エトキサゾール	28.62														45.7
ボスカリド(ニコピフェン)	33.36			N/A											
アゾキシストロビン	37.00							<LOQ							

■ 自動的に照合

■ レビュー後に照合

* キャリブレーションから逸脱した計算済み濃度値

偽陰性の低減

精密質量スクリーニングアプローチを用いた GC/Q-TOF では、GC/MSD と比べて、各サンプル中でより多くの農薬を同定できました (図 5)。紫色のバーは GC/MSD によって各サンプル中で検出された農薬の数に相当し、緑色および橙色のバーは GC/Q-TOF スクリーニングで確認された農薬の数に相当します。ただし、有機栽培イチゴの抽出物では検出された農薬のレベルが非有機抽出物のものに比べるとかなり低く、GC/MSD および GC/Q-TOF によって報告される農薬の数における大きな違いが特に明らかになりました。

偽陽性の排除

GC/Q-TOF スクリーニングワークフローでは、機器の高分解能と精密質量の性能に加え、評価用に容易にレビューできる機能を持つスクリーニングソフトウェアの複数パラメータがあるために、擬陽性が報告されることが少ないことも分かりました。

多くの場合、GC/MSD と GC/Q-TOF の両方で、一致した同定および近似した濃度値が得られました。図 6 に、このケースの代表的な例を示します。シプロジニルを GC/MSD で定量した場合は 18 ppb (ステンレス製イオン源) および 23 ppb の濃度 (エクストラクタイオン源)、GC/Q-TOF では同一化合物が 21 ppb と報告されました。

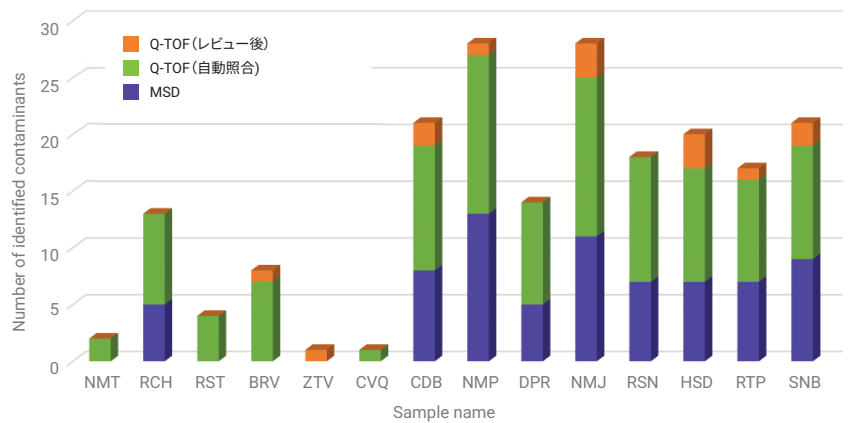
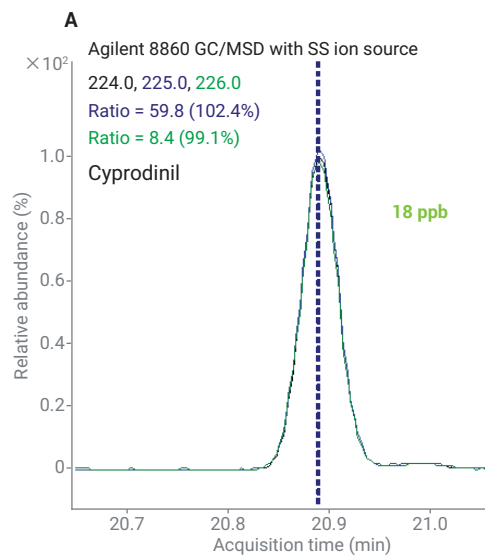


図 5. Agilent 7250 GC/Q-TOF と Agilent 5977B GC/MSD で比較した、イチゴ抽出物中で同定された汚染物質の数



B Sample: RTP

分析システム	測定値 (ppb)
Agilent 8860 GC/MSD と SS イオン源	18
Agilent 8890 GC/MSD とエクストラクタイオン源	23
Agilent 8890 GC/Q-TOF	21

図 6. A) シプロジニルの定量および定性イオンの重ね表示 (GC/MSD)、B) GC/MSD と GC/Q-TOF による、サンプル RTP 中のシプロジニルの計算された濃度

しかし、低分解能の GC/MSD 装置ではすべてのケースが報告されたわけではなく、GC/Q-TOF によって確認されました。図 7 および 8 に、この例を示します。エチオフェンカルブが GC/MSD による同定として報告されましたが、GC/Q-TOF スクリーニングワークフローでは検出されませんでした (図 7A)。精密質量 EIC (168.0603 ± 20 ppm、図 7B) が GC/Q-TOF データから抽出され、ピークはまったく検出されませんでした。Q-TOF スペクトルが、エチオフェンカルブが溶出されたと推定されたクロマトグラフィー領域から抽出され、 m/z 168 ユニットと一致する 2 個の精密質量イオンが観察されましたが (図 7C)、いずれのイオンの精密 m/z もエチオフェンカルブフラグメントの理論 m/z の 168.0603 とは一致しませんでした。

図 8 に示すように、化合物の精密質量スペクトルのイオン比はエチオフェンカルブの精密質量ライブラリスペクトルから大きく逸脱しています。このような不一致は、20 という低いライブラリー一致スコアにも反映されています。この例は、GC/Q-TOF が他のシステムの質量分

解能技術によってレポートされる偽陽性をいかに低減するかについて、明確な証拠を示しています。

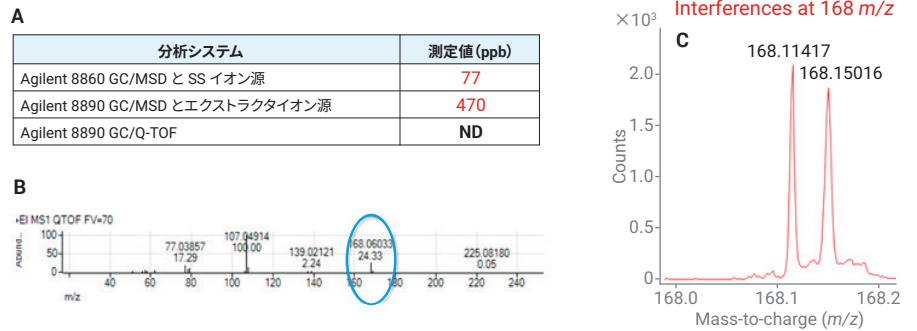


図 7. GC/Q-TOF では GC/MSD と異なり、偽陽性エチオフェンカルブは報告されませんでした。A) エチオフェンカルブの測定濃度。B) GC/Q-TOF PCDL からの精密質量エチオフェンカルブのスペクトル。C) エチオフェンカルブの RT に相当するクロマトグラム領域の GC/Q-TOF スペクトルのフラグメント

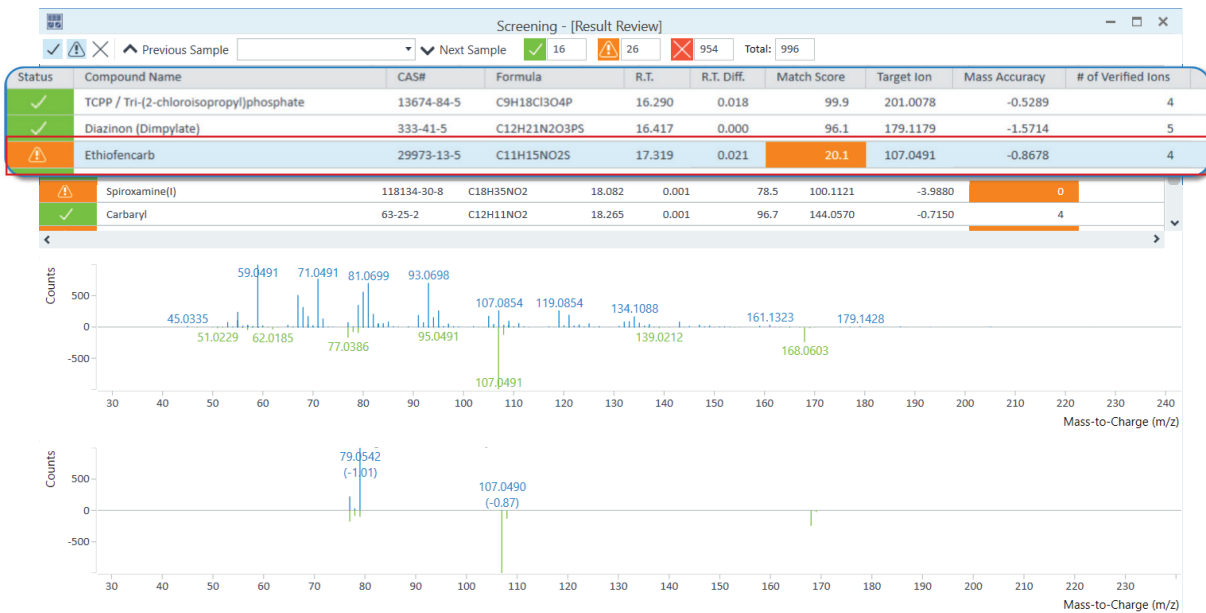


図 8. GC/Q-TOF でサスペクト化合物のスクリーニングワークフローを使用して、エチオフェンカルブを偽陽性として正しく判断しています。低いライブラリー一致スコアと、低いスペクトルマッチから明らかです。

結論

高分解能 GC/Q-TOF と精密質量ライブラリによる農薬および環境汚染物質のスクリーニングおよび定量の効率的なワークフローを、有機および非有機栽培のイチゴ抽出物を使用して説明しました。定量とスクリーニングの両方を 1 つのソフトウェア、Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1 で実行しました。これにより、実際にキャリブレーションする化合物よりも多くの化合物が評価されました。

GC/Q-TOF と GC/MSD でのスクリーニング結果の比較においては、GC/Q-TOF スクリーニングワークフローは、GC/MSD と比べて偽陰性と偽陽性の発生が少ないことが示されました。

参考文献

1. SANTE/11945/2015. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed **(2015)**.
2. United States Department of Agriculture (USDA). Pesticide Data Program (PDP) Annual Summary Reports **(2016)**.
3. Andrianova, A. A.; Quimby, B. D.; Westland, J. L. GC/MSD Pesticide Screening in Strawberries at Tolerance Levels Using Library Searching of Deconvoluted Spectra. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0915EN.
4. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. Index to Pesticide Chemical Names, Part 180 Tolerance Information, and Food and Feed Commodities (by Commodity) **(2012)**.
5. Chen, K.; Nieto, S.; Stevens, J. GC/Q-TOF MS Surveillance of Pesticides in Food. A Combined Workflow for Quantitative and Qualitative Screening of Pesticides Using the Agilent MassHunter GC/Q-TOF Pesticide Personal Compound Database and Library. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7691EN.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

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. 2019

Printed in Japan, September 18, 2019

5994-1346JAJP

