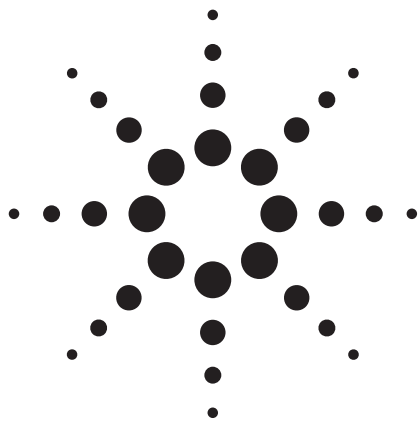




# Agilent 7000A GC/MS/MS による 漢方薬に含まれる低 ppb レベル農薬の スクリーニング

Wei Luan、Melissa Churley、Mike Szelewski

## アプリケーション

残留農薬濃度の規制に対する関心は、世界的に高まっています。複数の国際機関や各国政府が最大残留基準値 (MRL) を定めていますが、その対象となる農薬の種類は増加の一途をたどり、使用される製品範囲も広がっています。残留農薬モニタリングラボの主要業務は、限られた時間内に多数の微量化合物をスクリーニングできる分析メソッドを開発することです。こうした分析の一般的な手法としては、ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) が用いられています。日本や欧州連合 (EU) の規制で残留農薬の MRL が引き下げられているため、近年では、複雑なマトリックスに含まれる数百種類の農薬を ppb レベルで分析できることが求められるようになってきました。そうしたことから、農薬スクリーニングの感度と効率を高める必要性が生じています。トリプル四重極質量分析計をマルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードで使用するれば、マトリックス干渉をきわめて効果的に除去し、シグナル/ノイズ比 (S/N) を大幅に向上させることが可能です。本書では、トリプルガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS/MS) を用いて、1 ppb という低濃度で漢方薬 (TCM) に含まれる農薬をスクリーニングする方法を紹介します。分析対象の農薬および関連する MRM 条件を表 1 に示しています。

## 要旨

- 幅広い直線範囲における一貫したイオン比と、超低濃度での優れたピーク面積再現性により、農薬スクリーニングの信頼性が向上します。
- Agilent コリジョンセルにより、わずか 5 ms のドウェルタイムでのマトリックス中濃度 2 ppb の農薬分析においても、優れた再現性が実現しています。1 つのタイムセグメントで多くの MRM トランジションに対応し、生産性を高めることが可能です。
- MRM モードを使用してマトリックス干渉を低減することで、農薬スクリーニングの検出下限を大幅に引き下げることが可能です。



**Agilent Technologies**

表 1. 分析対象化合物リストと MRM 条件

| セグメント | 化合物名        | R.T.  | 定量        | コリジョン<br>エネルギー | 定性 1      | コリジョン<br>エネルギー | 定性 2      | コリジョン<br>エネルギー |
|-------|-------------|-------|-----------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
| 1     | ジクロロボス      | 6.00  | 185 → 93  | 15             | 185 → 109 | 15             | 109 → 79  | 5              |
| 1     | メタミドホス      | 6.10  | 141 → 95  | 5              | 95 → 80   | 5              |           |                |
| 1     | アセフェート      | 7.82  | 136 → 94  | 10             | 142 → 96  | 5              |           |                |
| 1     | ジメトエート      | 8.53  | 125 → 79  | 5              | 125 → 93  | 15             |           |                |
| 1     | オメトエート      | 9.53  | 156 → 110 | 5              | 156 → 79  | 20             |           |                |
| 2     | ジメチビン       | 11.12 | 118 → 90  | 5              | 118 → 73  | 5              |           |                |
| 2     | シアノホス       | 11.41 | 243 → 109 | 10             | 243 → 116 | 5              |           |                |
| 3     | ホスファミドン-E   | 12.41 | 264 → 127 | 15             | 127 → 109 | 10             |           |                |
| 3     | パラチオンメチル    | 12.58 | 263 → 109 | 10             |           |                |           |                |
| 3     | ホスファミドン-Z   | 13.13 | 264 → 127 | 15             | 127 → 109 | 10             |           |                |
| 3     | キノクラミン      | 13.23 | 207 → 172 | 15             | 207 → 179 | 12             | 172 → 128 | 10             |
| 3     | クロルピリホス     | 13.52 | 314 → 258 | 15             | 314 → 286 | 5              | 197 → 169 | 15             |
| 3     | シアナジン       | 13.52 | 225 → 189 | 15             | 240 → 225 | 5              | 198 → 91  | 10             |
| 3     | パラチオン       | 13.54 | 291 → 109 | 10             | 291 → 81  | 10             |           |                |
| 3     | ホスチオゼート 1-2 | 13.85 | 195 → 103 | 5              | 195 → 139 | 5              |           |                |
| 4     | フィプロニル      | 14.33 | 367 → 225 | 25             | 367 → 224 | 20             |           |                |
| 4     | キナルホス       | 14.36 | 146 → 118 | 10             | 157 → 129 | 15             |           |                |
| 4     | エンドスルファン-α  | 14.83 | 241 → 206 | 15             | 229 → 194 | 10             | 195 → 159 | 10             |
| 4     | クロルフェナピル    | 15.77 | 247 → 227 | 15             | 247 → 197 | 20             | 408 → 59  | 10             |
| 4     | エンドスルファン-β  | 15.90 | 241 → 206 | 15             | 229 → 194 | 10             | 195 → 159 | 10             |
| 5     | トリアゾホス      | 16.38 | 161 → 134 | 5              | 161 → 106 | 10             | 257 → 162 | 5              |
| 5     | ブロモプロピレート   | 17.64 | 341 → 183 | 20             | 341 → 185 | 20             |           |                |
| 5     | アジンホスメチル    | 18.31 | 160 → 77  | 20             | 160 → 132 | 5              | 132 → 77  | 15             |
| 6     | カフェンストール    | 19.92 | 100 → 72  | 5              | 188 → 119 | 25             | 188 → 82  | 20             |
| 6     | シフルトリン 1-4  | 20.03 | 163 → 127 | 5              | 163 → 91  | 15             | 206 → 151 | 25             |
| 7     | フルシトリネート 1  | 20.46 | 199 → 157 | 5              | 199 → 107 | 30             | 157 → 107 | 15             |
| 7     | フルシトリネート 2  | 20.64 | 199 → 157 | 5              | 199 → 107 | 30             | 157 → 107 | 15             |
| 8     | フェンバレレート 1  | 21.14 | 167 → 125 | 10             | 225 → 119 | 15             |           |                |
| 8     | フェンバレレート 2  | 21.33 | 167 → 125 | 10             | 225 → 119 | 15             |           |                |
| 8     | ジフェノコナゾール 1 | 21.53 | 323 → 265 | 15             | 265 → 202 | 20             |           |                |
| 8     | ジフェノコナゾール 2 | 21.60 | 323 → 265 | 15             | 265 → 202 | 20             |           |                |
| 8     | デルタメトリン     | 21.85 | 181 → 152 | 30             | 253 → 172 | 5              | 253 → 93  | 20             |

## 実験手法

微量化合物の定量はマトリックスの存在により複雑化し、クオリファイアイオンが範囲外になったり、ターゲットイオンが複雑なバックグラウンドに埋もれたりする結果につながります。シングル四重極質量分析の場合、一般に選択イオンモニタリング (SIM) により、検出下限と定量の再現性を向上させます。SIM モードの MS では、各ターゲット化合物について、カラムからターゲットが溶出するリテンションタイム (RT) 範囲内で数個のイオンのみがモニタリングされます。数個の特定イオンのみをモニタリングすることで、シグナル/ノイズ比 (S/N) が劇的に向上します。しかし、SIM 中の干渉がスキャンモードと同様に存在するため、マトリックス中の微量化合物については、SIM では効果的に分析できません。トリプル四重極質量分析では、選択したプリカーサイオンがヘキサポールコリジョンセルでさらにフラグメンテーションされるため、マトリックス干渉が大幅に低減し、場合によっては完全に排除できることもあります。マルチプルリアクションモニタリング (MRM) と呼ばれるこのプロセスは、プリカーサイオンを採取し、マトリックス成分のフラグメンテーションからは生じる可能性のないプロダクトイオンにトランジションす

ること成り立っています。プリカーサイオンの選択性は SIM と同じですが、生成されるプロダクトイオンのうち少なくとも 1 つは、きわめて高い確率で、マトリックス成分からは生成されないプリカーサイオン固有の解離生成物となります。

このプロセスのおもな利点は、幅広い濃度範囲で一貫したクオリファイアイオン比が得られるため、きわめて複雑なマトリックスに含まれる超微量化合物の分析でも S/N が向上することです。図 1 に、Agilent GC/MS/MS ワークステーションの定量画面を示しています。赤枠に囲まれた数字は、TCM中濃度 0.1 ppb から約 1,000 ppb の範囲におけるシアノホスのクオリファイアイオン比です。この数字を見れば、マトリックスにおいてきわめて高い精度が得られていることがわかります。緑枠に囲まれた数字は、検量線の精度を示しています。この図には、検量線下端の拡大図も示されています。表 2 では、TCM マトリックス中に濃度 1 ppb で含まれる農薬について、6 回の繰り返し注入により得られたピーク面積再現性を示しています。

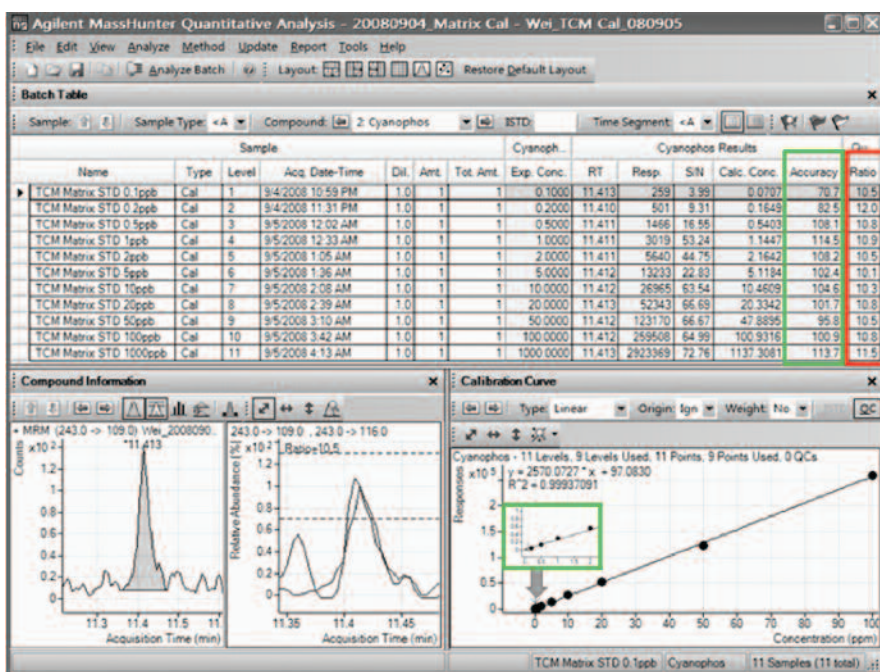


図 1. TCM マトリックス中シアノホスの検量線とクオリファイアイオン比

表 2. TCM マトリックスに添加した農薬 1 ppb のピーク面積再現性

| ピーク面積の RSD (%) (n = 6) |      |
|------------------------|------|
| シアノホス                  | 4.83 |
| プロモプロピレート              | 5.12 |

リニア加速度設計を備えた Agilent ヘキサポールコリジョンセルは、イオンゴーストやクロストークを生じずにハイスピード性能を実現できるように最適化されています。500 MRM/sec のハイスピード MRM 機能により、トランジション数が最大化するとともに、1 つのタイムセグメントにおける各トランジションのドウェルタイムが最小化します。これにより、1 回の分析でより多くの化合物をスクリーニングすることが可能になります。プロモプロピレート 2 ppb を添加した TCM を用いたドウェルタイム実験の結果を、表 3 に示しています。ドウェルタイムが短くなっても、5 ms までは各分析のピーク面積の RSD が 5.0 % 未満に保たれています。2 ms の結果は精度が低くなっていますが、複雑なマトリックス中に含まれる濃度 2 ppb の化合物を分析した結果としては、許容範囲にあるといえます。

表 3. ドウェルタイム実験結果：TCM マトリックス中 2 ppb プロモプロピレート

|      | 100 ms     | 50 ms    | 10 ms    | 5 ms     | 2 ms     |
|------|------------|----------|----------|----------|----------|
| 面積 1 | 5849       | 5910     | 6265     | 6704     | 6747     |
| 面積 2 | 5712       | 6167     | 6189     | 6728     | 6279     |
| 面積 3 | 5895       | 5941     | 5966     | 6131     | 6523     |
| 面積 4 | 5921       | 6471     | 6551     | 6243     | 6397     |
| 面積 5 | 5999       | 6299     | 6119     | 6504     | 4831     |
| 面積 6 | 5999       | 6524     | 6415     | 6796     | 4737     |
| 合計   | 35375      | 37312    | 37505    | 39106    | 35514    |
| 平均   | 5895.83333 | 6218.667 | 6250.833 | 6517.667 | 5919     |
| 標準   | 107.618617 | 260.1528 | 209.5638 | 276.2496 | 893.2359 |
| RSD  | 1.83       | 4.18     | 3.35     | 4.24     | 15.1     |

図 2 には、TCM 抽出液 1  $\mu$ L を注入し、MRM モードの GC/MS/MS で分析して得られたトータルイオンクロマトグラムを示しています。表 4 に示すように、11 種類の農薬が ppb レベルで同定されています。

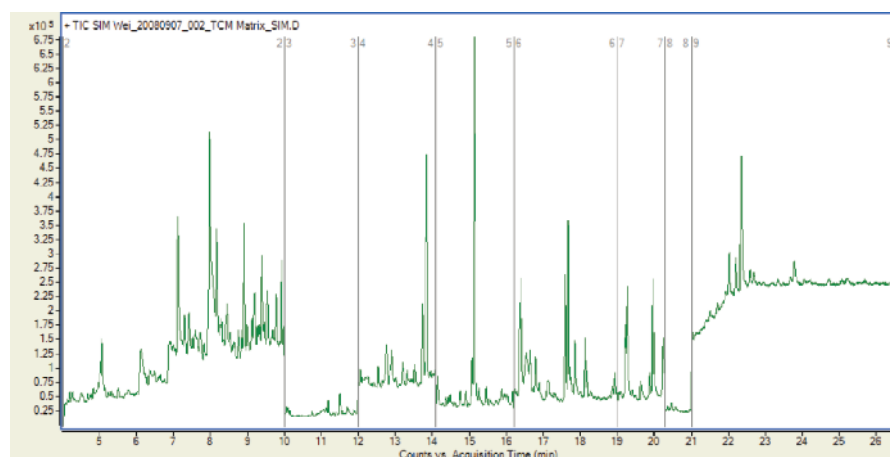


図 2. MRM モードの GC/MS/MS で分析した TCM 抽出液のトータルイオンクロマトグラム

表 4. GC/MS/MS による TCM ブランクのスクリーニング結果

| RT     | 化合物名        | 定量<br>トランジション | マトリックス面積<br>(無添加) | 計算結果  |
|--------|-------------|---------------|-------------------|-------|
| 5.995  | ジクロロボス      | 185.0 → 93.0  | 68                | —     |
| 6.100  | メタミドホス      | 141.0 → 95.0  | 0                 | —     |
| 7.760  | アセフェート      | 136.0 → 94.0  | 0                 | —     |
| 8.526  | ジメトエート      | 125.0 → 79.0  | 0                 | —     |
| 9.478  | オメトエート      | 156.0 → 110.0 | 0                 | —     |
| 11.100 | ジメチピン       | 118.0 → 90.0  | 0                 | —     |
| 11.414 | シアノホス       | 243.0 → 109.0 | 0                 | —     |
| 12.390 | ホスファミドン-E   | 264.0 → 127.0 | 0                 | —     |
| 12.560 | パラチオンメチル    | 263.0 → 109.0 | 1227              | 6.21* |
| 13.200 | キノクラミン      | 207.0 → 172.0 | 38                | —     |
| 13.500 | シアナジン       | 225.0 → 189.0 | 16                | —     |
| 13.510 | クロルピリホス     | 314.0 → 258.0 | 1224              | 1.99* |
| 13.520 | パラチオン       | 291.0 → 109.0 | 3950              | 5.62* |
| 13.840 | ホスチオゼート     | 195.0 → 103.0 | 0                 | —     |
| 14.320 | フィプロニル      | 367.0 → 255.0 | 0                 | —     |
| 14.340 | キナルホス       | 146.0 → 118.0 | 3970              | 1.11* |
| 14.820 | エンドスルファン-α  | 241.0 → 206.0 | 156               | 1.89* |
| 15.750 | クロルフェナビル    | 247.0 → 227.0 | 0                 | —     |
| 15.880 | エンドスルファン-β  | 241.0 → 206.0 | 208               | 1.61* |
| 16.360 | トリアゾホス      | 161.0 → 134.0 | 531               | 1.63* |
| 17.620 | プロモプロビレート   | 341.0 → 183.0 | 63                | —     |
| 18.290 | アジンホスメチル    | 160.0 → 77.0  | 0                 | —     |
| 19.900 | カフェンストロール   | 100.0 → 72.0  | 1260              | 3.37* |
| 20.026 | シフルトリン      | 163.0 → 127.0 | 0                 | —     |
| 20.439 | フルシトリネート 1  | 199.0 → 157.0 | 0                 | —     |
| 20.624 | フルシトリネート 2  | 199.0 → 157.0 | 0                 | —     |
| 21.122 | フェンバレレート 1  | 167.0 → 125.0 | 4188              | 1.79* |
| 21.326 | フェンバレレート 2  | 167.0 → 125.0 | 13070             | 1.79* |
| 21.520 | ジフェノコナゾール 1 | 323.0 → 265.0 | 0                 | —     |
| 21.574 | ジフェノコナゾール 2 | 323.0 → 265.0 | 0                 | —     |
| 21.840 | デルタメトリン     | 181.0 → 152.0 | 2078              | 3.53* |

\*検出の可能性のあるサンプル

## まとめ

残留農薬モニタリングにおいては、きわめて限られた時間内に、数百種類の超微量化合物をスクリーニングできるメソッドの開発が求められています。。トリプル四重極ガスクロマトグラフィー質量分析なら、きわめて選択性の高い MRM を実行することで、マトリックスに由来する化学ノイズを劇的に低減し、S/N と検出下限を向上させることが可能です。本アプリケーションでは、TCM に含まれる ppb レベルの残留農薬をスクリーニングする手法を開発しました。超微量レベルの残留農薬スクリーニングの性能を向上させるうえで、GC/MS/MS はきわめて大きな威力を発揮します。

## 参考文献

1. Wei Luan, and Zhixiu Xu, "Screening for 430 Pesticide Residues in Traditional Chinese Medicine Using GC/MS: From Sample Preparation to Report Generation in One Hour," Agilent Technologies publication 5989-9341EN

Wei Luan はアジレント・テクノロジー (上海、中国) のアプリケーションケミストです。Melissa Churley はアジレント・テクノロジー (サンタクララ、米国カリフォルニア州) のアプリケーションケミストです。Mike Szelewski はアジレント・テクノロジー (ウィルミントン、米国デラウェア州) のアプリケーションケミストです。

## 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](http://www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

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

© Agilent Technologies, Inc., 2009  
Printed in Japan  
February 6, 2009  
5990-3568JAJP



**Agilent Technologies**