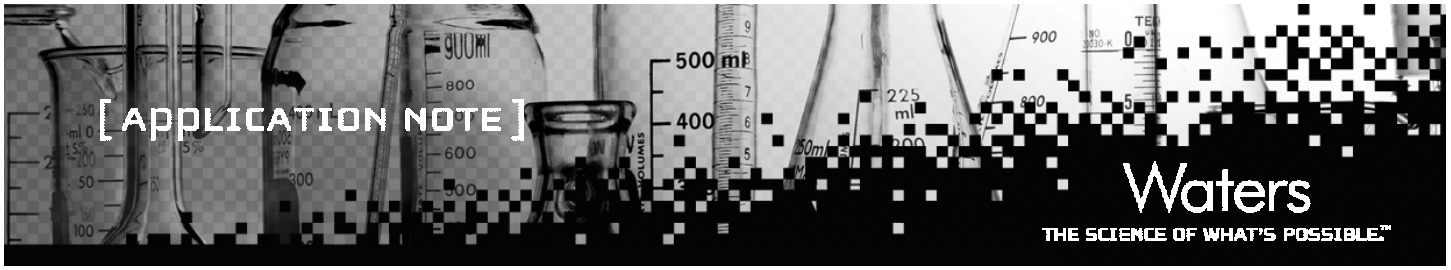


ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XEを用いた ポジネガ同時測定による食品中残留農薬の分析

No.720001995J

概要

European Union residue monitoring program 2005-2007 は、じゃがいも、オレンジ、ベビーフードなどを含む食品中の55化合物について働きかけています。[1)]それらのうち20種の農薬はLC/MS分析法が適した化合物です。ほとんどの化合物はポジティブ検出によって測定されますが、ただ1つFludioxonilはネガティブモードで検出されます。このような場合、通常はポジティブ検出とネガティブ検出の2回の測定が行われますが、ポジティブ/ネガティブ同時検出が可能な装置を使用すれば、分析に要する時間と消費する溶媒量も1測定分であり、時間とコスト削減につながります。また、固相抽出法を利用した食品試料の前処理も、MS分析におけるイオン抑制効果を低減し高感度化に貢献することが期待され、果物や野菜への適用が報告されています。[2)3)]

このアプリケーションノートでは、Waters ACQUITY UPLC™/Quattro Premier™ XEを用いて、じゃがいも、オレンジと、シリアルベースのベビーフード中の農薬の固相抽出による前処理からポジティブ/ネガティブ同時分析までの条件を検討し、測定を行った内容について説明します。

Acquity™
Ultra Performance LC

サンプル前処理

遠心分離管に試料10gを量り取り、アセトニトリル9.9mL、酢酸0.1mL、無水硫酸マグネシウム4g、酢酸ナトリウム1.66gを加えてただちによく混ぜ合わせました。4300gで5分間遠心分離したあと、上澄み液1mLをPSA(Primary Secondary Amine)吸着剤50mgと硫酸マグネシウム150mgが入った遠心分離用マイクロバイアルに移しました。これを30秒間ボルテクスミキサーにかけた後5000gで1分間遠心分離しました。上澄み液を10倍に希釈し、LC/MSMS分析しました。

分析条件

ACQUITY UPLC™ システム
カラム：ACQUITY UPLC™ BEH C_{18}
　　2.1×50 mm , 1.7 μm
カラム温度：40℃
移動相：A）0.1%酢酸/水
　　B）0.1%酢酸/メタノール
グラジェント：10%B(0分)→100%B(4分)→(5分)
　　サイクルタイム7分
流速　：0.6 ml/min
注入量：20 μl

Quattro Premier™ XEタンデム四重極型質量分析計
イオン化　：ESIポジティブ/ネガティブ
極性切り替え：0.02s
イオンソース温度：120℃
キャピラリー電圧：1.0kV
脱溶媒温度：400℃
脱溶媒ガス：800L/hr
コーンガス：50L/hr
コリジョンガス圧：4.0x10^{-3}mBar

ソフトウエア
MassLynx™4.1
TargetLynx™アプリケーションマネージャー

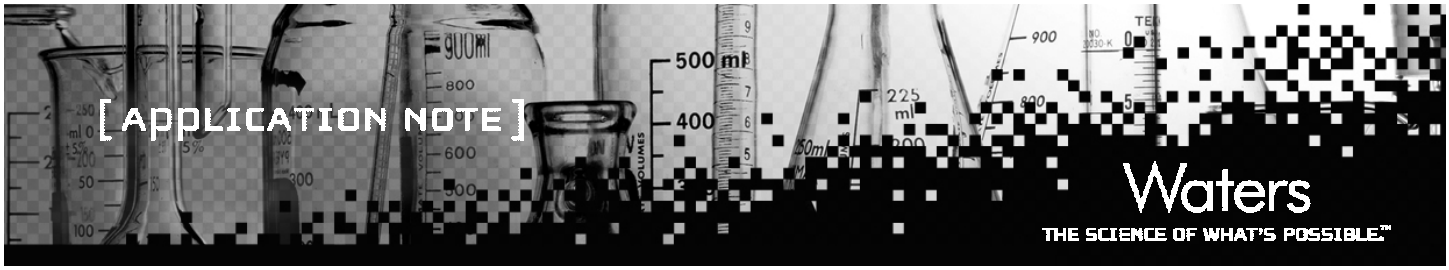
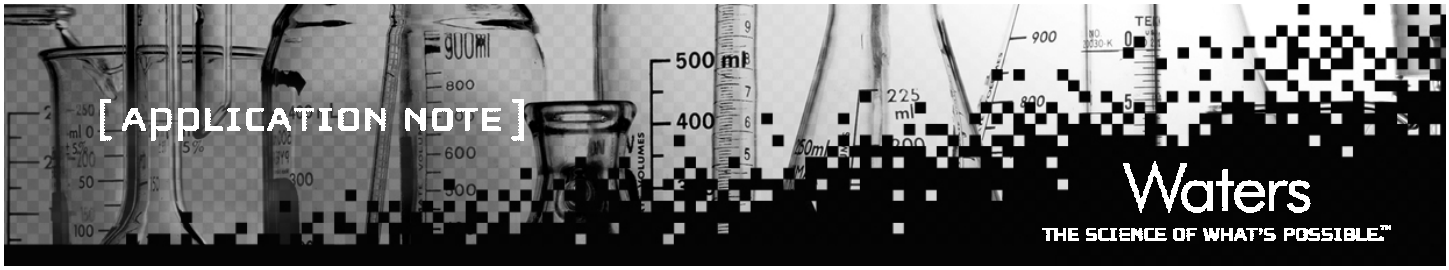


表1. MRMパラメータ

Pesticide	RT	MRM Transitions	Dwell time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
Methamidophos	0.41	142>94	0.015	22	14
		142>125			13
Acephate	0.50	184>143	0.015	16	8
		184>125			18
Omethoate	0.58	214>183	0.015	20	12
		214>155			15
Butocarboxim sulfoxide	0.59	207>75	0.015	17	12
		207>132			6
Pymetrozine	0.61	218>105	0.015	25	17
		218>79			36
Aldicarb sulfoxide	0.64	207>89	0.015	16	14
		207>132			10
Butoxycarboxim	0.68	223>106	0.015	17	10
		223>166			7
Aldicarb sulfone	0.72	223>86	0.015	23	12
		223>76			7
Methomyl	0.85	163>88	0.025	15	8
		163>106			10
Oxydemeton-methyl	0.86	247>169	0.025	20	14
		247>109			28
Demeton-S-methyl sulfone	0.90	263>169	0.025	26	17
		263>121			17
Carbendazim	1.01	192>160	0.025	25	18
		192>132			30
Imidacloprid	1.15	256>209	0.020	22	16
		256>175			20
Thiabendazole	1.18	202>175	0.020	40	25
		202>131			32
Dimethoate	1.27	230>125	0.020	17	20
		230>199			10
Methiocarb sulfoxide	1.26	242>185	0.020	22	13
		242>168			24
Acetamiprid	1.32	223>126	0.020	27	20
		223>56			15
Cymoxanil	1.41	199>128	0.020	17	8
		199>111			18

Pesticide	RT	MRM Transitions	Dwell time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
Methiocarb sulfone	1.40	258>122	0.020	22	20
		258>107			37
Thiacloprid	1.49	253>126	0.020	28	20
		253>90			37
Butocarboxim	1.61	213>75	0.020	24	15
		213>156			10
Aldicarb	1.64	208>116	0.020	7	7
		208>89			7
Carbaryl	2.08	202>145	0.020	18	10
		202>127			28
Thiodicarb	2.19	355>88	0.020	15	16
		355>108			16
Phorate sulfoxide	2.25	277>97	0.020	18	32
		277>143			20
Lenacil (-ve)	2.30	233>151	0.030	44	24
		233>107			32
Phorate sulfone	2.29	293>97	0.020	18	30
		293>115			24
Azinphos-methyl	2.46	318>160	0.020	14	8
		318>261			8
Imazalil	2.52	297>159	0.020	30	20
		297>69			20
Linuron	2.56	249>160	0.020	28	16
		249>182			15
Methiocarb	2.63	226>169	0.020	16	10
		226>121			19
Azoxystrobin	2.60	404>372	0.020	22	15
		404>329			30
Fludioxonil (-ve)	2.65	247>180	0.030	45	28
		247>126			35
Triadimefon	2.77	294>69	0.015	22	21
		294>197			15
Iprovalicarb	2.84	321>119	0.015	15	18
		321>203			8

表1に各化合物の保持時間、MRMトランジション、Dwellタイム、コーン電圧とコリジョンエネルギーを示します。(表1は次のページまで続きます)
表中に赤字で示された化合物はネガティブモードで測定するものです。Dwellタイムは、クロマトグラム上の1つのピークが10から15のデータポイントを得られるように最適化されました。ひとつの化合物に対し、2つのMRMトランジションを設定しました。定量用と確認用で、この2つのトランジションの比は標準サンプルと実サンプルで一定になります。この確認基準はQuality Control Precudure for Pesticide Residue Analysis[4)]を踏まえて、選択されました。



（表1の続き）

Pesticide	RT	MRM Transitions	Dwell time (s)	Cone Voltage (V)	Collision Energy (eV)
Triadimenol	2.85	296>70	0.015	14	10
		296>99			16
Dichlofluanid	2.86	333>123	0.015	22	24
		333>224			10
Fenhexamid	2.86	302>97	0.015	35	25
		302>55			35
Flufenacet	2.88	364>152	0.015	17	20
		364>194			10
Cyprodinil	2.95	226>93	0.015	45	33
		226>108			25
Diflubenzuron (-ve)	2.96	309>156	0.100	20	11
		309>289			9
Fenoxycarb	3.00	302>88	0.015	21	20
		302>116			12
Spiroxamine	3.04	298>144	0.015	32	20
		298>100			32
Tolylfluanid	3.06	347>137	0.015	19	28
		347>238			10
Zoxamide	3.11	336>187	0.015	25	24
		336>159			41
Phorate	3.15	261>75	0.015	11	12
		261>97			32
Hexaflumuron (-ve)	3.31	459>276	0.020	22	22
		459>175			39
Teflubenzuron (-ve)	3.47	379>196	0.020	18	25
		379>339			15
Fluazinam	3.50	463>416	0.020	26	21
		463>398			17
Lufenuron (-ve)	3.49	509>175	0.020	22	40
		509>326			22
Flucycloxuron (-ve)	3.58	482>156	0.020	34	14
		482>462			13
Flufenoxuron (-ve)	3.62	487>156	0.020	27	16
		487>329			22

表2. ベビーフードでの平均回収率と%RSD

Pesticide	% Recovery (% RSD)	Pesticide	% Recovery (% RSD)
Methamidophos	79 (4)	Phorate sulfone	106 (5)
Acephate	89 (6)	Azinphos-methyl	113 (19)
Omethoate	88 (8)	Linuron	104 (3)
Butocarboxim sulfoxide	90 (5)	Imazalil	105 (6)
Pymetrozine	76 (7)	Methiocarb	103 (5)
Aldicarb sulfoxide	93 (6)	Azoxystrobin	104 (5)
Butoxycarboxim	101 (6)	Fludioxonil	107 (5)
Aldicarb sulfone	103 (8)	Triadimefon	104 (9)
Methomyl	100 (3)	Iprovalicarb	100 (7)
Oxydemeton-methyl	91 (5)	Triadimenol	93 (6)
Demeton-S-methyl sulfone	96 (2)	Dichlofluanid	73 (14)
Carbendazim	97 (4)	Fenhexamid	93 (8)
Imidacloprid	100 (9)	Flufenacet	99 (8)
Thiabendazole	87 (4)	Cyprodinil	95 (6)
Dimethoate	103 (3)	Diflubenzuron	100 (11)
Methiocarb sulfoxide	95 (4)	Fenoxycarb	102 (7)
Acetamiprid	97 (4)	Spiroxamine	98 (7)
Cymoxanil	93 (11)	Tolylfluanid	85 (13)
Methiocarb sulfone	100 (6)	Zoxamide	100 (8)
Thiacloprid	101 (3)	Phorate	96 (6)
Butocarboxim	106 (6)	Hexaflumuron	124 (9)
Aldicarb	104 (7)	Teflubenzuron	107 (6)
Carbaryl	101 (5)	Fluazinam	99 (4)
Thiodicarb	99 (3)	Lufenuron	109 (5)
Phorate sulfoxide	102 (6)	Flucycloxuron	105 (9)
Lenacil	94 (3)	Flufenoxuron	114 (3)

表2に、シリアルベースのベビーフードをマトリクスとした場合の平均回収率と%RSD値をまとめました。0.01mg/kgをスパイクし、5回試験を行った結果です。回収率は73%-124%、%RSDは19%以下で、良好な結果となっています。

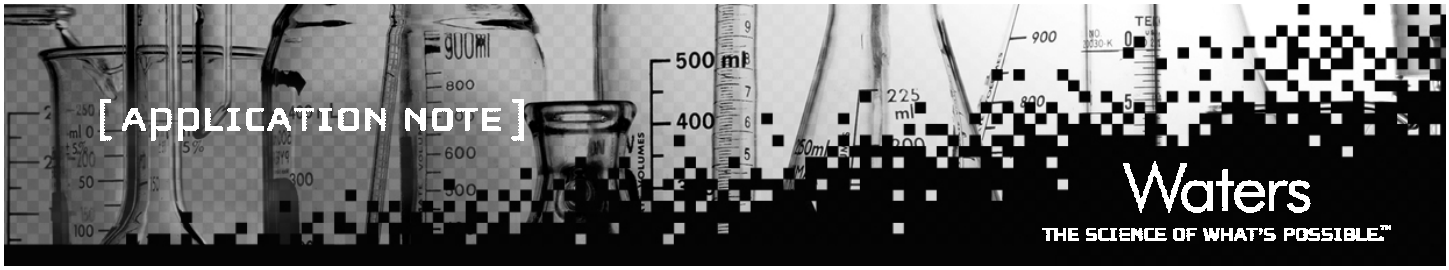


図1. UPLC™/Quattro Premier™ XEによるクロマトグラム

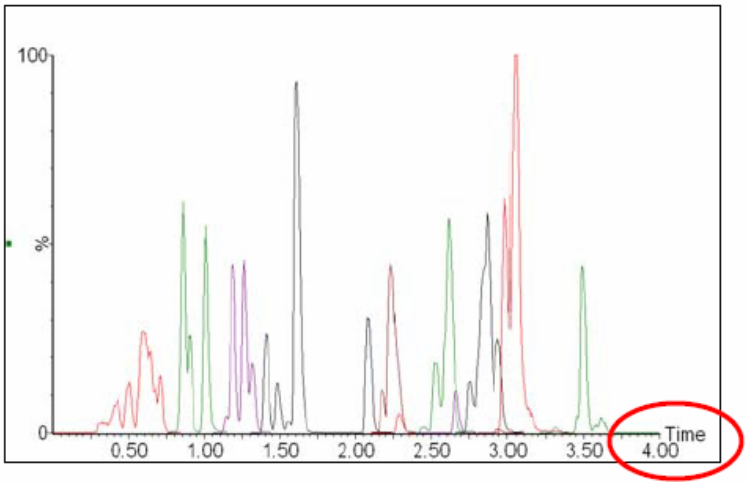
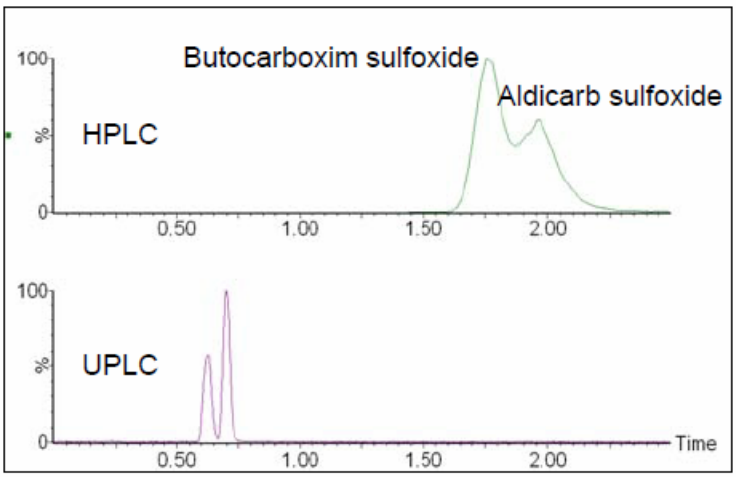


図1に52化合物のクロマトグラムを示します。全成分が4分以内に溶出しています。従来法では50種の農薬の分析には50-60分を要したので、分析時間は約1/10に短縮されたことになります。

図2. HPLCとUPLC™の分離度の比較



Butocaboxim sulfoxide と Aldicarb sulfoxideは構造異性体なので確認用の同じMRMトランジション(m/z207>132)を使用しますが、定量用のMRMトランジションは異なります。しかしながら、これらのピークが共溶出すると、1つの確認用MRMトランジションでは不十分な可能性があります。このような場合には2つのピークの分離度を改善することが重要です。図2にはHPLCとUPLC™の分離度の比較を示します。HPLCでは分離度Rs=0.9であったのに対し、UPLC™では分離度Rs=1.3となっています。

図3. ポジティブ/ネガティブ切り替えの効果

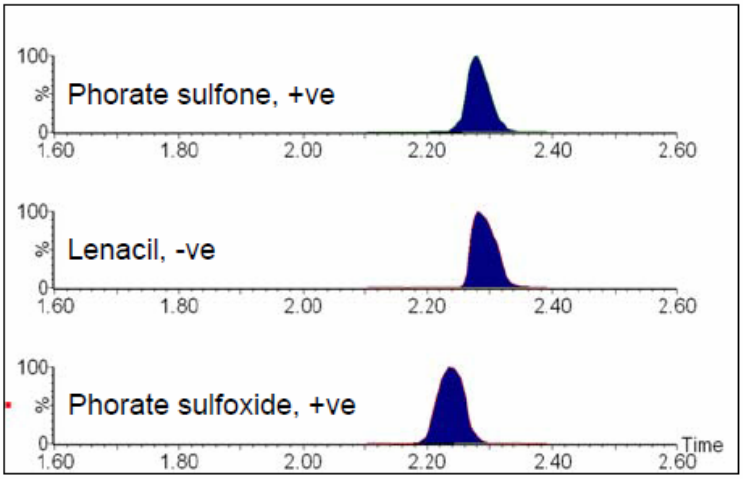


図3にベビーフード中のPhorate sulfone、Lenacil、Phorate sulfoxide各0.01μg/mLをポジティブ/ネガティブ切り替えで測定したときのクロマトグラムを示します。1つのピークが15程度のデータポイントを得るためには、Dwellタイム、インタースキャンディレイ、インターチャンネルディレイが100msである必要があります。古い装置では、ポジティブ/ネガティブの切り替えに最低200msを要したので、十分なデータポイントが得られずピーク形状も良好ではありませんでした。

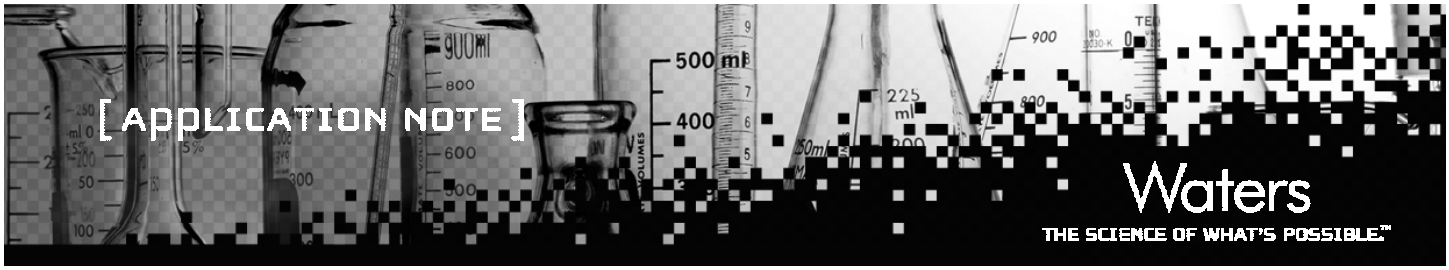
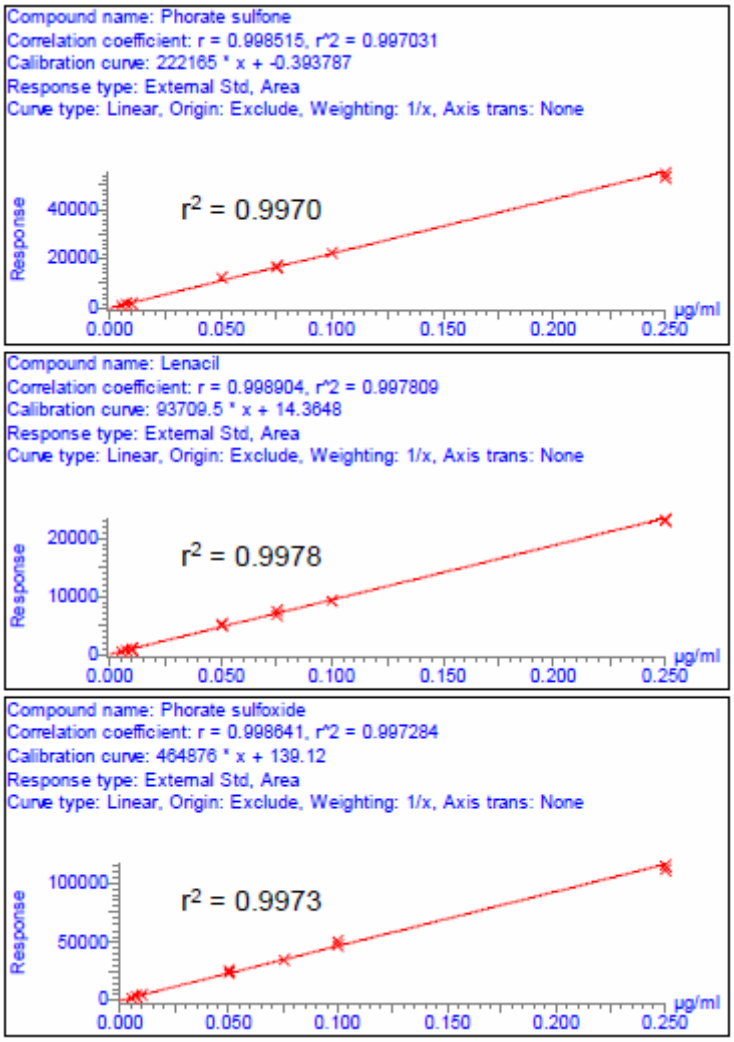


図4. ポジティブ/ネガティブ切り替え測定での検量線



インタースキャンディレイ20ms、ポジティブ/ネガティブ切り替えで作成した検量線を図4に示します。ベビーフード中のPhorate sulfone、phorate sulfoxide、lenacil 0.005-0.250mg/kgに対応します。直線性はいずれも良好です。

表3. UPLC™/MSMSとHPLC/MSMSによる定量結果の比較

Sample	Residue	UPLC/MS/MS Amount, mg/kg	HPLC/MS/MS Amount, mg/kg
A	Aldicarb sulfoxide	0.020	0.02
	Aldicarb sulfone	0.017	<0.02
B	Aldicarb sulfoxide	0.034	0.030
	Aldicarb sulfone	0.002	<0.02
C	Aldicarb sulfoxide	0.021	0.025
	Aldicarb sulfone	0.011	<0.02

表3にUPLC™/MSMSとHPLC/MSMSによる定量結果の比較を示します。じゃがいも3種のサンプルを2回ずつ測定した平均値です。aldicarb sulfoxideとaldicarb sulfoneは0.002mg/kg以上の値で検出されましたが0.035mg/kg以下でした。これはUK、EUあるいはCodex maximum residue limitsである0.500mg/kgより低い結果でした。

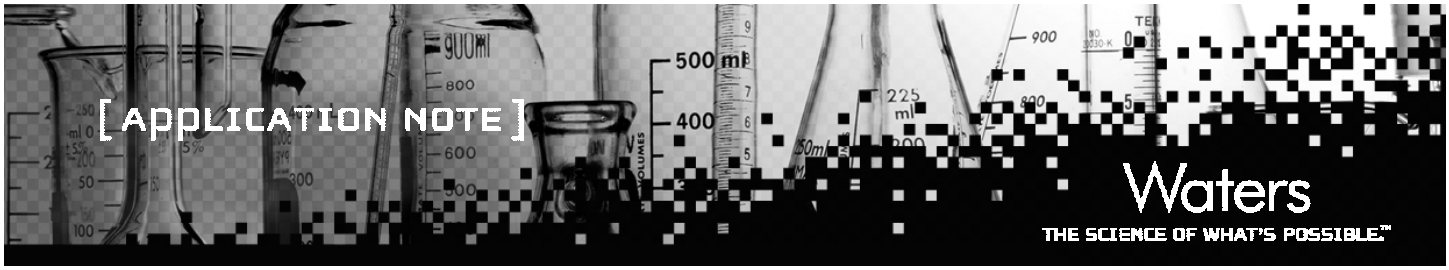


図5. TargetLynxブラウザの例

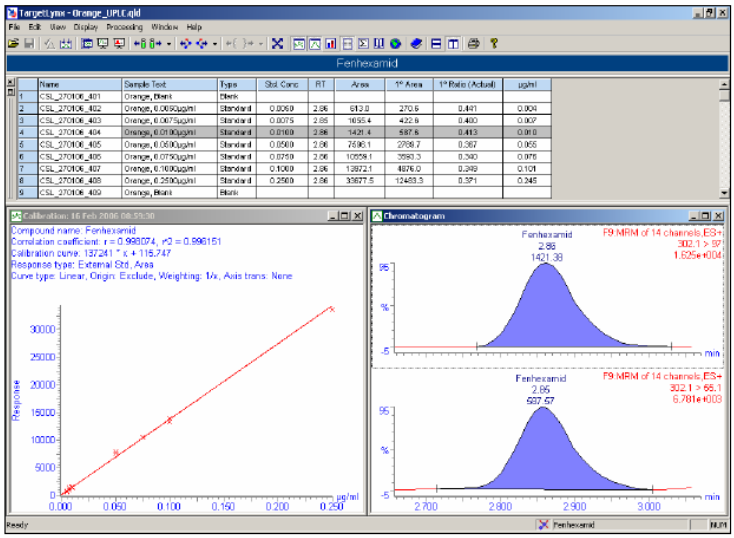


図５に、オレンジに fenhexamid を 0.01μg/mL スパイクしたときの結果を示します。TargetLynxソフトウエアは自動定量と自動確認のために使用され、各ピークごとに検量線や積分の結果などを表示できます。

図6. TargetLynxブラウザの例

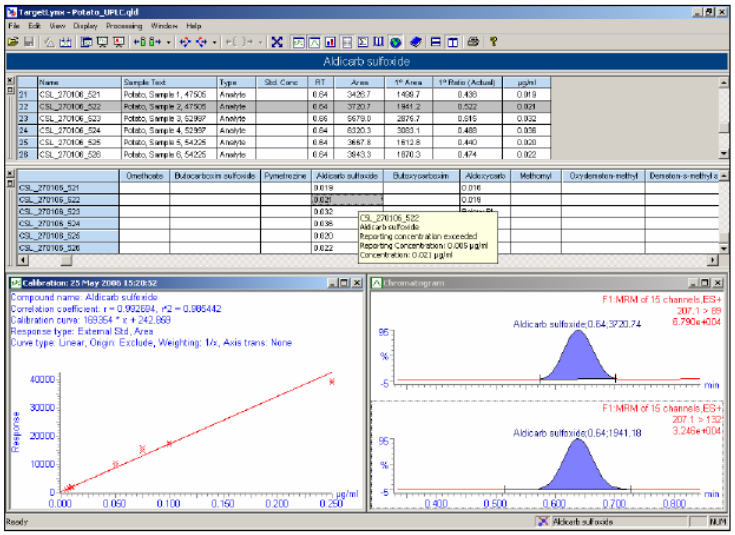


図6にはじゃがいも中のaldicarb sulfoxideを検出した結果を示します。
定量結果は0.021mg/kgでした。

※このアプリケーションノートの内容は、University of York(UK)、Central Science Laboratory(UK)、Waters Corporation(UK)の共同研究によるものです。

THE UNIVERSITY of York

参考文献

1. AGROW Magazine **468** (2005) 9.

2. M. Anastassiades, S. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck, *J. AOAC Int.* **86** (2003) 412.

3. S.J. Lehotay, K. Maštovska, S.J. Yun, *J. AOAC Int.* **88** (2005) 630.

4. Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis of 24 March 2006, Document Number SANCO/10232/2006.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™
日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 カトキチ新大阪ビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 静岡