

オービトラップ質量分析計 Q Exactiveによる ごま中の農薬スクリーニングと定量分析

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

キーワード

Q Exactive、オービトラップ、TraceFinder、スクリーニング、農薬、ごま

概要

本アプリケーションノートでは、ベンチトップ型オービトラップ質量分析計 Thermo Scientific™ Q Exactive™ (四重極とオービトラップアナライザーを搭載したシステム*)と解析用ソフトウェア Thermo Scientific TraceFinder™ 3.1を使用したスクリーニングから定量までのフローを、データを交えて解説します。

*詳細はアプリケーションノート LCMS08009参照

はじめに

現在、食品中の農薬や動物用医薬品の残留分析に対しては、トリプル四重極 LC-MS によるターゲット定量分析が幅広く行われています。しかし、この手法では、ターゲットとしていない汚染物質が食品中に混入した際に、それを検知することができません。また、トリプル四重極 LC-MS で網羅的に測定しようとしても、測定できる項目数に限りがあり、スクリーニングという観点での使用には限界があります。

それを補う手法として近年注目が集まっているオービトラップ質量分析計を用いた、高分解能/精密質量 (High Resolution/Accurate Mass: HR/AM) によるスクリーニング分析についてご紹介します。

サンプル調製

ごまサンプル 10 g は、水で浸潤させた後、アセトニトリルで

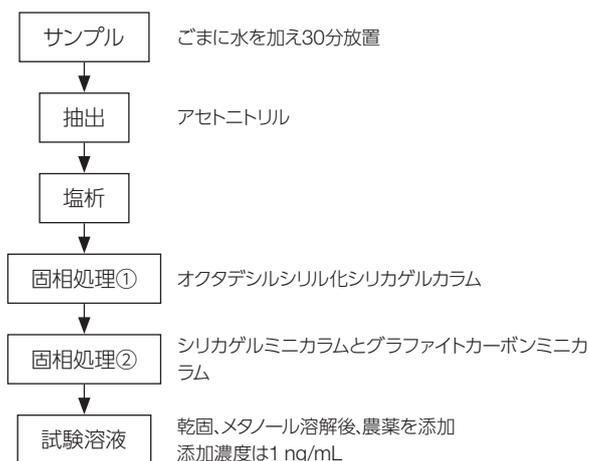


図1: サンプル前処理フロー

抽出しました。その後、塩析を行い、①オクタデシルシリル化シリカゲルカラム、②シリカゲルミニカラムとグラファイトカーボンミニカラムで固相処理を行った後、減圧乾固、メタノールで溶解し、試験溶液としました (図1)。

スクリーニングにより食品中の農薬を検出することが可能かを評価するために、添加された農薬の項目や濃度を伏せた状態 (ブラインド試験) で、測定および解析を行いました。

分析条件

A) HPLC条件

カラム	Thermo Scientific Acclaim™ 120 C18 (2.1×150 mm, 3µm)							
移動相A	5 mM酢酸アンモニウム水溶液							
移動相B	5 mM酢酸アンモニウム/メタノール							
流速	200 µL/min							
注入量	5 µL							
カラム温度	40°C							
グラジエント条件								
時間(分)	0	1	3.5	6	8	17.5	25	30
A%	85	60	60	50	45	5	5	5
B%	15	40	40	50	55	95	95	95

*30分経過後、B100% (5 min) で洗浄、10分間初期化

B) MS条件

イオン化法	Positive /Negative ESI (同時測定)
スプレー電圧	3500 V
ペーポライザー温度	400°C
ソースガス	50 arb
Auxガス	15 arb
イオントランスファーチューブ温度	250°C
S-Lens レベル	50
【FullMS】	
分解能	70,000
測定範囲	m/z 100 ~ 1,000
【Data Dependent-MS ² 】	
分解能	17,500
アイソレーションウインドウ	0.4 m/z
イオン強度しきい値	3.3e ⁴
コリジョンエネルギー	50

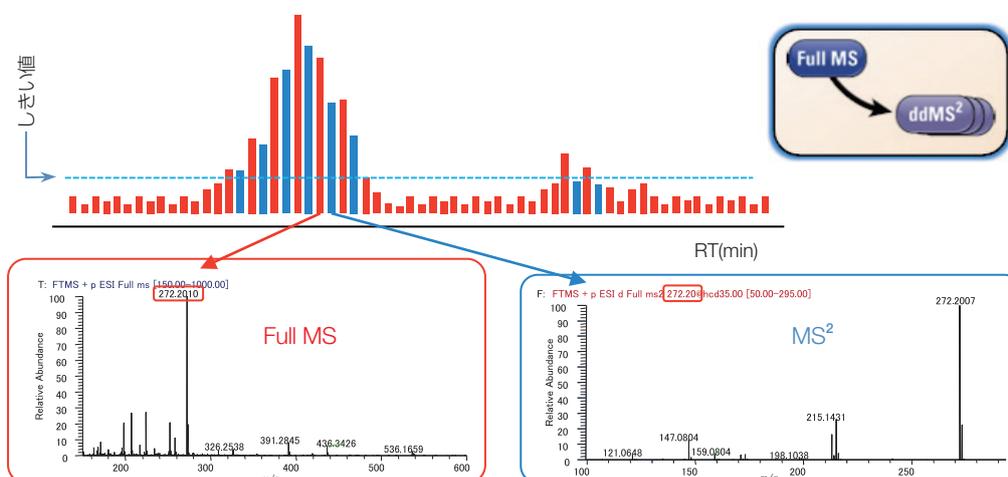


図2 : Data Dependent MS²の概念図

測定モードについて

今回は、Full MSと同時に、イオン強度が設定したしきい値を超えると自動的にMS²を取得する、Full MS/Data Dependent MS/MS (dd-MS²) という手法を使用しました (図2)。

dd-MS²測定では、しきい値を超えたm/zについて、強度の高いものから順にMS²スペクトルを取得します。通常設定では濃度の低い化合物のMS²を取得しないため、低濃度でも確実にMS²が取得されるように、特定のプリカーサーイオンをInclusion Listに登録し、それらがしきい値を超えて検出されるとMS²を行うような条件を用いました。Inclusion Listには、弊社のHR/AMライブラリ*に登録がある農薬1,428種(アダクト含む) を登録しました。

*農薬や動物用医薬品のCompound Database (CDB) およびHR/AMライブラリは、随時更新されています。

解析に用いたデータベース

Full MS/dd-MS²でデータを取得することにより、MSスペクトルとMS²スペクトルの2種類のデータが、1回の測定で取得できます。データ解析に用いたTraceFinderは、オービトラップ質量分析計によるスクリーニングから定量までを幅広くサポートするソフトウェアです。スクリーニング分析に際して、CDBとHR/AMライブラリを用いました。

CDBとは、化合物の名前や組成式を登録したデータベースで、TraceFinderはこれをもとにFull MSから化合物の精密質量を算出し、設定されたアダクト ([M+H]⁺, [M+NH₄]⁺など) の理論m/zで抽出イオンクロマトグラムを作成します。またMS²の情報として、任意のフラグメントイオンのm/zを登録しておくことも可能です。これにより、ターゲット化合物のMS²フラグメントイオンの有無を確認することもできます。これはプリカーサーイオンを選択しないAIF (All Ion Fragmentation) のデータ解析に有用です。

HR/AMライブラリとは、精密質量のMS²スペクトルを登録し

たデータベースのことです。TraceFinderは、指定したライブラリの中に、得られたMS²スペクトルと相同性の高いスペクトルが存在するか否かを検索を行います。

スクリーニング解析の結果

スクリーニング解析の結果、以下の農薬がリストアップされました (図3)。

MZ	RT	IP	FI	LS	Flag	Compound Name
●	▼	▼	f ▼	▼	▼	Mepronipirim
●	▼	▼	▼	▼	▼	Carpropamid
●	▼	▼	▼	■	▲	Flufenoxuron

判定項目 (左から順に)

- MZ: 理論m/zにしきい値以上のピークが検出
- RT: 保持時間が一致 (今回は使用していません)
- IP: 同位体パターンが理論値と高い相同性で一致
- FI: HR/AMライブラリのMS²スペクトルに登録されたm/zのフラグメントイオンを検出
- LS: HR/AMライブラリのMS²スペクトルと高い相同性で一致
- Flag: すべての項目がクリアされている場合に、●のフラグを表示します。

図3 : スクリーニング結果の表示画面と判定項目

メパニピリム、カルプロパミドは、高い確率でサンプル中に含まれていると考えられます。フルフェノクスロンについては強度が低く、MS²スペクトルがシンプルでフラグメント情報が少なかったため、HR/AMライブラリのヒット率が20でした。そのため、ライブラリサーチ (LS) 結果が設定基準を下まわり (■)、トータルの結果 (Flag) が▲ (基準以下の項目が1~3つある) になりました。個々の結果については、解析画面で確認することが可能です (図4-a, b)。

実際に、これら3種の農薬がサンプルに添加されていました。添加濃度は1 ng/mLと低濃度にもかかわらず、スクリーニング分析で正確に検出することが可能でした。

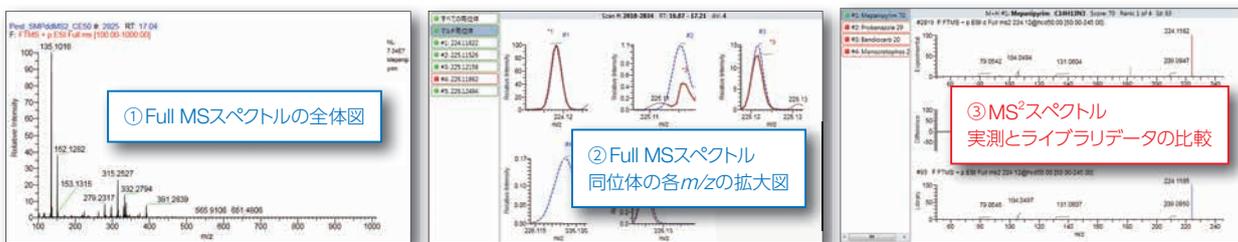
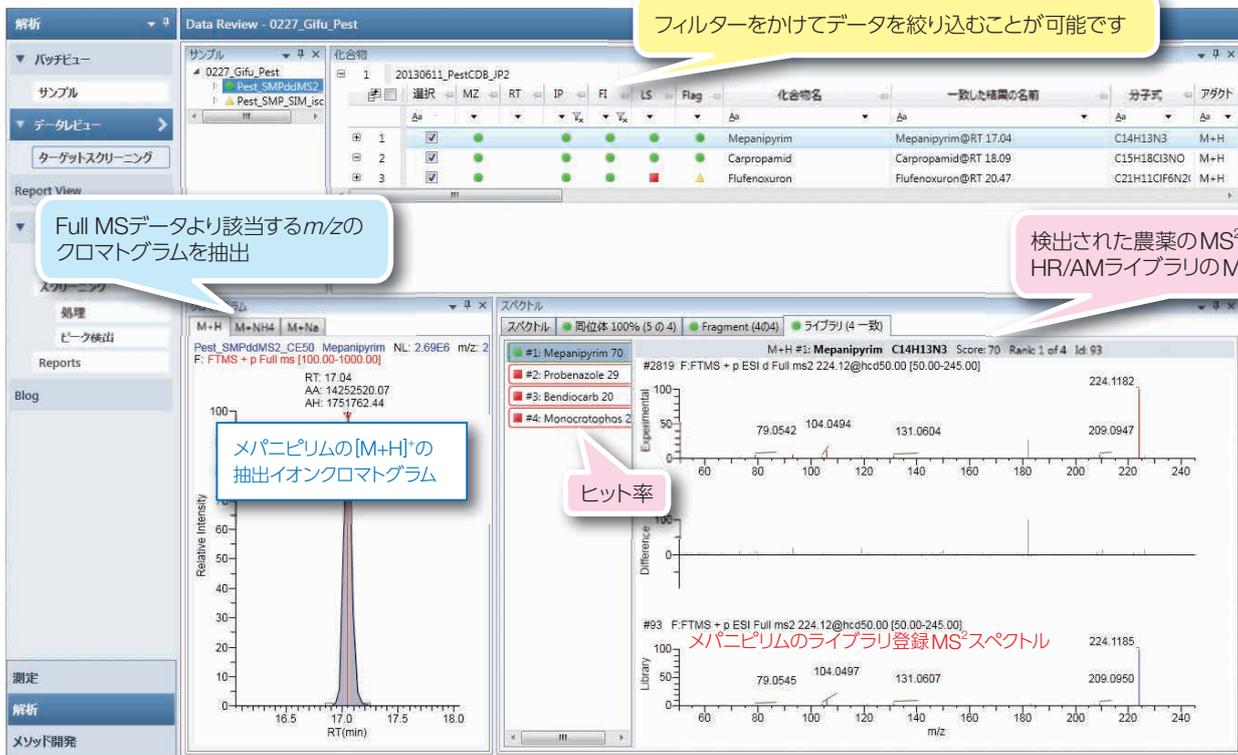


図4-a : スクリーニング解析画面例 (Full MSに関するデータを青、MS²に関するデータを赤で示しています)

- ①や②のFull MSデータを、組成式から算出されるマススペクトルと一致しているかどうかを確認します。
- ③のMS²データより、MS²のフラグメントパターンを比較して、その農薬であるかどうか確認します。

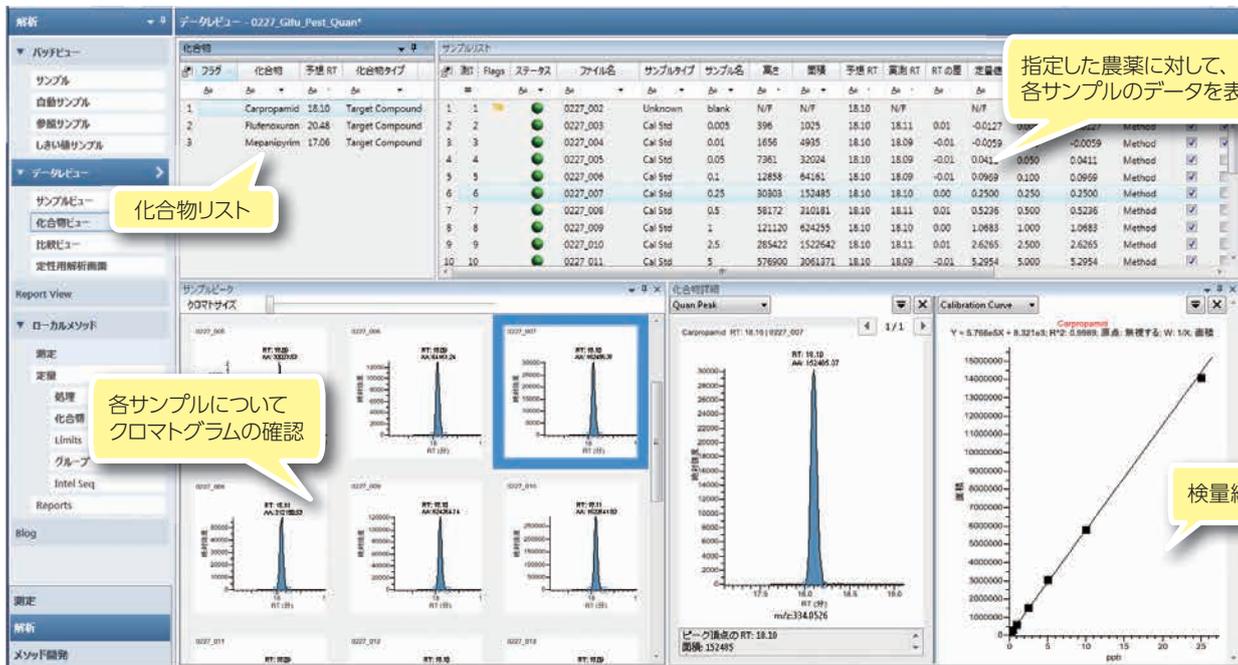


図4-b : 定量解析画面例 (サンプルごとに検出された化合物の結果を表示できます。)

スクリーニングで検出された農薬について、次に定量を行いました。TraceFinderでは、スクリーニングで検出された農薬を定量用メソッドにエクスポートできるので、定量用のメソッドも簡単に作成できます。

定量解析の結果

測定は、Targeted SIMモードで行いました。このモードでは、四重極でターゲット化合物の*m/z*を選択することにより、設定した*m/z*のイオンをより多くオービトラップ検出器に注入できるため、より高感度な分析が可能になります。定量結果を以下に示します。

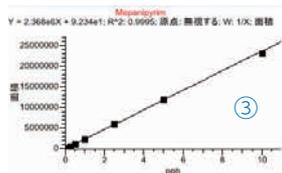
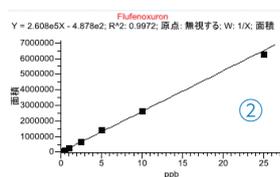
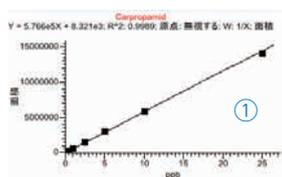
a) 定量結果

添加農薬	添加濃度 (ng/mL)	定量値 (ng/mL)
メパニピリム	1.0	1.0
フルフェノクスロン	1.0	1.0
カルプロパミド	1.0	0.4

メパニピリム、フルフェノクスロンは添加濃度どおりの濃度で検出できました。カルプロパミドはイオン化抑制の影響を受けており、これは、別途測定したトリプル四重極質量分析計の結果と同様の傾向でした。

b) 直線性

検量線	相関係数	検量線レンジ (ng/mL)
メパニピリム	0.9995	0.005 ~ 10
フルフェノクスロン	0.9972	0.05 ~ 25
カルプロパミド	0.9989	0.005 ~ 25

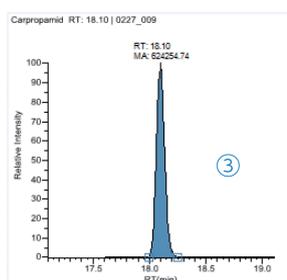
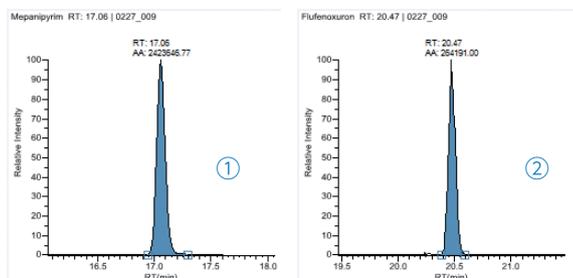


- ① メパニピリム
- ② フルフェノクスロン
- ③ カルプロパミド

Q Exactiveでは、トリプル四重極とほぼ同等の、直線性の良い検量線を作成することが可能でした。

c) 再現性

再現性	CV%
メパニピリム	2.0
フルフェノクスロン	2.0
カルプロパミド	1.3



- ① メパニピリム(1 ng/mL)
- ② フルフェノクスロン(1 ng/mL)
- ③ カルプロパミド(1 ng/mL)

標準 1 ng/mL (n=3) の再現性の結果です。低濃度でも、再現性良く測定することが可能でした。

これらの結果より、Q Exactiveは、トリプル四重極質量分析計と比べて遜色ない定量性能を有していることが確認できました。

まとめ

食品のような複雑なマトリックスのサンプルであっても、Q ExactiveとTraceFinderを使用することで、正確かつ簡単に農薬のスクリーニングを実行できました。スクリーニングに続けて行った定量分析では、トリプル四重極質量分析計と同等の定量結果を得られました。このことから、Q ExactiveとTraceFinderは、実サンプルのスクリーニングと定量のいずれにも適用できることがわかりました。

謝辞

本研究に際し、サンプルをご提供頂きました岐阜県保健環境研究所の南谷臣昭先生に厚く御礼申し上げます。

©2015 Thermo Fisher Scientific K.K. 無断複写・転載を禁じます。

ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。
ここに記載されている内容は、予告なく変更することがあります。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671

〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: Analyze.jp@thermofisher.com

www.thermoscientific.jp

LCMS029_A1505SO

Thermo
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand