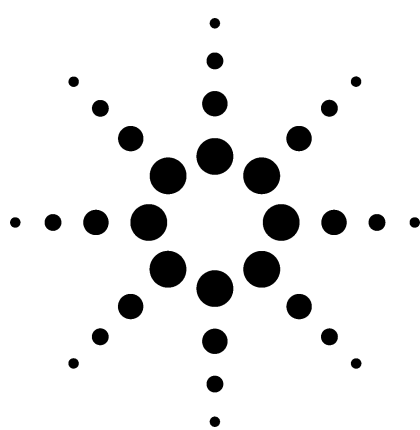




リテンションタイムロッキング (RTL) およびGC/MSを用いたpptレベルの農薬 に関する同定および定量 アプリケーション

環境、食品

著者

C. Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

概要

スキャンモードで農薬を質量分析する場合の典型的な定量限界はサブppmレベルである。選択イオンモニタリング法を用いると、リテンションタイムをロックしたガスクロマトグラフィー質量分析法によって対象化合物の定量限界をppb (pg/ μ L) レベルまで低下させることができる。さらに、多量に注入可能な方法にすることによって、pptレベルの対象化合物を定量することもできる。

特別に開発した567種類の化合物のリテンションタイムロッキングによる農薬マスペクトルライブラリを用いると、取り込んだサンプルのデータファイルを自動的に数秒で567種類の全化合物についてスクリーニングすることができる。さらに、ライブラリは選択イオンモニタリング法で取り込んだサンプルの迅速スクリーニングにも応用することができる。どのような分析も実行せずに、化合物ライブラリの情報を用いて80種類の対象化合物に関する選択イオンモニタリング法を2時間未満で作成した。

はじめに

大部分の農薬は典型的には元素選択検出器 (ESD) を用いたガスクロマトグラフ (GC) によって分析

される。ESDでは低ppbレベルの検出が可能で、操作も容易であるが、ESDのデータからは自信を持って化合物の存在を確認できる情報が十分には得られない。質量分析検出の普遍的な性質により、質量分析計 (MS) からは補足情報が得られ、自信を持って化合物を同定できるようになる。GC/MSのハードウェアおよびソフトウェアの最近の進歩と所有のコストの低下により、MS検出を用いて農薬残留サンプルをルーチンの分析する研究室がますます多くなっている。

GC/ESDの検出限界と一致させるため、あるいはサンプルの濃縮操作を除くためには、ユーザはMSの検出限界を2~3桁下げる必要がある。この応用では以下のアプローチを紹介して考察する。

- シングライオンモニタリング (SIM) モードでMSを運転する。
- 大量注入 (LVI) にする。
- 高い電子増倍管電圧 (EMV) にする。

化合物の同定では、特別に開発した567種類の化合物のリテンションタイムロッキング (RTL) [1] による農薬ライブラリを用い、スキャンデータによって567種類の全化合物のスクリーニングを数秒で実施することができた。ライブラリのサブセットもSIMデータから数秒でスクリーニングすることができる。

実験

農薬標準混液を用い、スプリットレス注入とLVIにてスキャンおよびSIMモードの検出限界の下限について比較した。



Agilent Technologies

スクリーニングおよび定量のシステム構成：

- 昇温気化器（PTV）の注入口がある6890 GC[2,3]
- 5973質量選択検出器（MSD）
- 7683自動液体サンプラ（ALS）トレイおよびオートインジェクタ
- HP-5MSキャピラリーカラム（30 x 0.25 mm x 0.25 mm）、P/N 19091S-433
- G1701BA バージョンB.00.00以上－MSD Chem-Stationソフトウェア
- G1049A MSD RTL農薬データベース/ライブラリ

表 1. GC法のパラメータ

オープン	70 (2)/25/150 (0)/3/200 (0)/8/280 (10)=41.87分
注入口	PTV
注入口圧	17.30 psi（16.593分にクロルピリフォスメチルに対してロックした）、定圧力モード

表 2. 注入のパラメータ

注入モード	溶媒ベント	スプリットレス
注入容量 (シリンジ)	25 μ L (50 μ Lシリンジ、P/N 6183-0318)	1 μ L (10 μ Lシリンジ、P/N 9301-0713)
注入速度	注入、100 μ L/分 ドロウ、300 μ L/分 ディスペンス、4500 μ L/分	高速
注入口温度	40 (0.36) /600/320 (3) 160/200 (終了まで維持する)	280°C
ベント	ベント時間=0.29分 ベント流量=150 mL/分 ベント圧=0.00 psi	
ページ	60 mL/分、2分	60 mL/分、2分
ライナー	不活性化、 Multi Baffled (P/N 5183-2037)	不活性化、 Multi Baffled (P/N 5183-2037)
注入口冷却	液体CO ₂	なし

表 3. MS法のパラメータ

溶媒遅延	3分
チューンファイル	Atune.u
トランスファーライン	280°C
四重極	150°C
MSイオン源	230°C
スレッシュホールド	150
サンプル#	2
スキャン範囲	35~600 amu（スキャンモードの場合）
40 SIMグループ	（SIMモードの場合）

表 4. SIM法の農薬スクリーニングにおけるパラメータ

抽出ウィンドウ	±0.100分
クオリファイアモード	絶対
クオリファイア（%）	30
ゼロクオリファイア	含まれる
減算モード	平均スタート/ストップ
スクリーン・データベース	Rtlpest.SCD

結果および考察

RTL[1]によって以下のことを行った。

- 重ね書きによりデータの比較を速める。
- より低い対象化合物の検出限界を達成する。
- RTL農薬データベース/ライブラリを用いて、迅速な農薬スクリーニングを可能にする。
- 保持時間（RT）の差で異性体を識別する際に役立てる。
- カラムのメンテナンス後に時間のかかるSIM法のRTの更新作業を省く。
- SIMイオングループの編集を簡単にする。

カリフォルニア州食品農業局（CDFA）から得た80種類の農薬がそれぞれ5000 pg/ μ L含まれる混液をこの研究のストック溶液として用いた。混液にはカーバメート系、有機塩素系、有機リン系および有機窒素系農薬が含まれていた。図1は各農薬の50、100および500 pgを注入した3つの全イオンクロマトグラム（TIC）のオフセット重ね書きを示す。この3つのTICはスキャンモードで1 μ Lのspiltless注入から得た。この80種類の農薬の定量限界は多くの場合スキャンモードでカラムに約500 pgである。

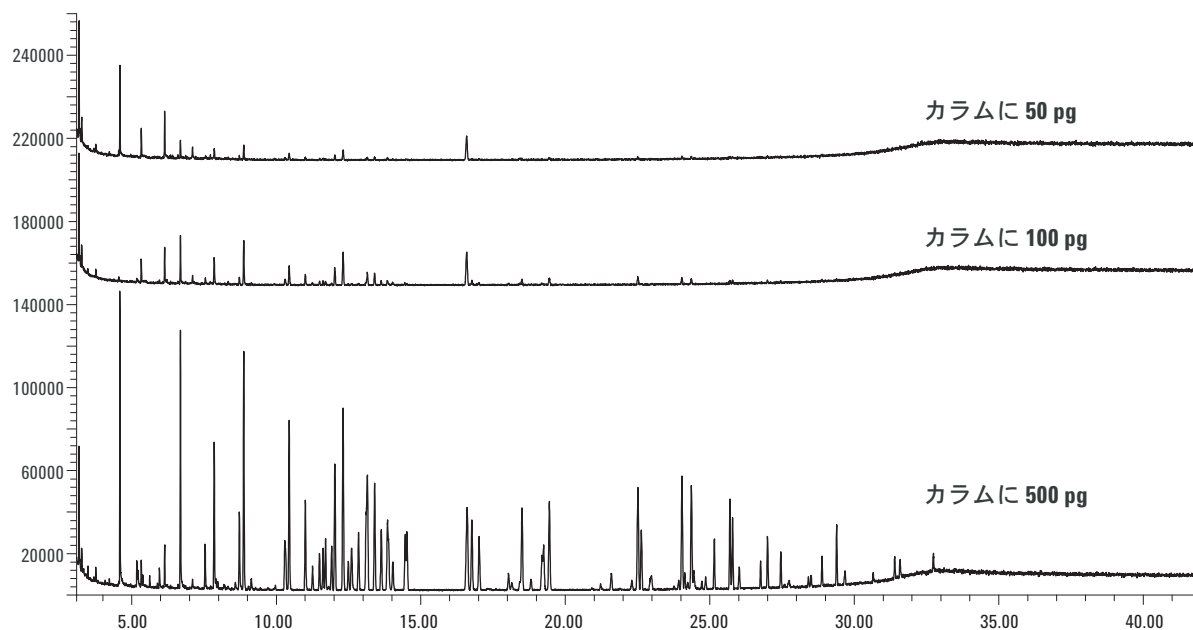


図 1. 80種類の各農薬について50、100および500 pgをそれぞれ注入する1 μ Lスプリットレス注入によって得られた全イオンクロマトグラム。

SIMモード

検出限界を低下させるために、SIM法を作成した。SIM法を作成する従来法の代わりに、ユーザはRTL農薬データベースの情報をを用い、分析を実行せずにSIM法を構築することができる。SIMイオングルー

プのパラメータを編集する操作を以下に示す。

1. ChemStationからMSDのRTL農薬データベースを表示し（図2は一部掲載したものである）、スプレッドシートに全リストをペーストする。

Scdlist.txt - Notepad

File Edit Search Help

SCD Compound List Report

Screen Database : C:\DATABASE\RTLPEST.SCD
Total SCD CpnDs : 567

Cpd#	Compound Name	Tion	Exp_RT	Q1	Q2	Q3
1	Diethylene glycol	45	3.39	75	76	44
2	Aniline	93	3.55	66	65	92
3	p-Dichlorobenzene	146	3.88	148	111	75
4	Dicyclopentadiene	66	4.00	132	67	65
5	Dimefox	44	4.01	110	154	42
6	o-Dichlorobenzene	146	4.09	148	111	75
7	2-Methylphenol	108	4.25	107	77	79
8	4-Methylphenol	107	4.42	108	77	79
9	m-Cresol	108	4.42	107	79	77
10	1,2-Dibromo-3-chloropropane	157	4.53	155	75	159
11	2,4-Dimethylaniline	121	5.19	120	106	77
12	2,6-Dimethylaniline	121	5.20	106	120	77
13	2,4-Dichlorophenol	162	5.19	164	63	98
14	1,2,4-Trichlorobenzene	180	5.29	182	184	145
15	Ethiolate	100	5.41	72	161	44
16	3-Chloroaniline	127	5.45	129	65	92
17	4-Chloroaniline	127	5.48	129	65	92
18	2-Ethyl-1,3-hexanediol	56	5.51	55	73	57
19	p-Nitrotoluene	91	5.57	137	65	107
20	Methamidophos	94	5.66	95	141	47
21	Dichlorvos	109	5.83	185	79	187
22	Allidochlor	41	6.18	56	138	132
23	2,3,5-Trichlorophenol	196	6.63	198	200	160
24	2,6-Dichlorobenzonitrile	171	6.75	173	136	100

図 2. 農薬スクリーナー・データベースの一部を掲載。この部分には化合物番号、化合物名、ターゲットイオン、予想保持時間およびクォリファイイオンが含まれる。

2. スプレッドシートにおいて、今回のメソッドに不要な化合物の列を削除する。
3. 以下の判定基準を用いて対象化合物を分類する（図3に追加した「グループ#」の欄を参照）。
 - 各グループに1~3種類の化合物、
 - 隣接したグループの隣接した化合物のRTには少なくとも0.2分の間隔がある。たとえば、化合物42と51の間隔は0.2分以上であることから、この2種類の化合物は異なるグループに属している。化合物51と55の間隔は0.2分未満であることから、この2種類の化合物は同じグループに属している。
4. SIMのグループRTとして、隣接したグループの隣接した化合物の平均RTを用いる（図3に追加した「グループRT」の欄を参照）。たとえば、化合物42（7.91分、2グループ）と51（8.78分、3グループ）の平均保持時間は8.35分であり、これを3グループの保持時間の開始とする。すべてのグループ番号とそれぞれの保持時間の開始が決定されたら、次の操作の「MS SIM/スキャンパラメータ」への入力を容易にするためにスプレッドシートのハードコピーを取る。
5. すべての化合物のターゲットイオンおよびクオリファイアイオン（Q1、Q2あるいはQ3）をそれぞれのChemStationのSIMグループに入力する（図4）。SIMグループを構築するための情報はすべて図3から得ていることに注意する。

#	Compound Name	MSD RT	T	Q1	Group #	Group RT
24	2,6-Dichlorobenzonitrile	6.75	171	173	1	3.00
35	Mevinphos	7.60	127	192		
42	Propham	7.91	93	179	2	7.75
51	o-Phenylphenol	8.78	170	169	3	8.35
55	Pentachlorobenzene	8.95	250	252		
76	Propoxur	10.35	110	152	4	9.60
82	Diphenylamine	10.52	169	168		
92	Chlorpropham	11.05	127	213	5	10.76
98	Ethalfuralin	11.28	276	316		
102	Bendiocarb	11.54	151	126	6	11.41
103	Trifluralin	11.64	306	264		
104	Benfluralin	11.73	292	264		
111	Phorate	11.96	75	121	7	
113	BHC alpha isomer	12.09	181	219		
117	Hexachlorobenzene	12.38	284	286		
120	Dicloran	12.56	206	176		
122	Demeton-S	12.63	88	60		
124	Dimethoate	12.68	87	93		
129	Simazine	12.91	201	186		

図 3. 0.2分間隔で隣接したグループの隣接した化合物のRTによって各SIMグループに分類した対象化合物のスプレッドシート。各グループの保持時間の開始は隣接したグループの隣接した化合物の平均RTを計算することによって決定した。

SIM法で用いるクオリファイアイオンの数は分析対象物質の数に依存する。20~30の化合物をモニタリングするメソッドでは、3つのクオリファイアイオンをすべてSIM法で用いる必要がある。対象化合物のリストが多くなるにつれて、同メソッドで用いるクオリファイアイオンを少なくし、妥当かつ同等なイオン・デュエルタイムとサンプリング速度が維持されるようにする。

一般に、定量目的では1ピークあたり10スキャン（サイクル）が望ましい。たとえば、分析対象物質のピークが6秒の幅である場合には、約1.7サイクル/秒をそのSIMイオングループで維持する。いったんサイクル数/秒を決定すると、イオンのデュエルタイムはそれに合うように変えられる。デュエルタイムが各イオンに入力されると、ChemStationにサイクル数/秒が自動的に表示される。図4の6グループは3.03サイクル/秒である。

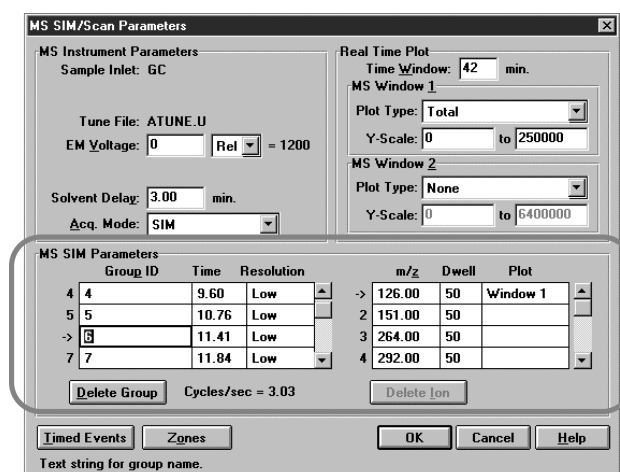


図 4. MSおよびSIMのパラメータを示すMSD ChemStationのスクリーンキャプチャ。SIMのパラメータ（グループのID、グループの保持時間およびイオン）はすべて図3より得た。

図5はスキャンおよびSIMモードを用い、50 pg/ μ Lの1 μ Lスプリットレス注入によって得られた2つのクロマトグラムを示す。スキャンモードではSIMモードよりもベースラインのノイズが著しく高い。化合物によっては、特に遅い溶出液はスキャンモードで検出されなかった。この濃度でスキャン法をSIM法に変更した場合では、S/N比が100倍増加した。SIM法ではサンプルのマトリックスからのバックグラウンドイオンが記録されないことから、ベースラインのノイズが最小限になり、S/Nが改善されることを知っておくと有益である。

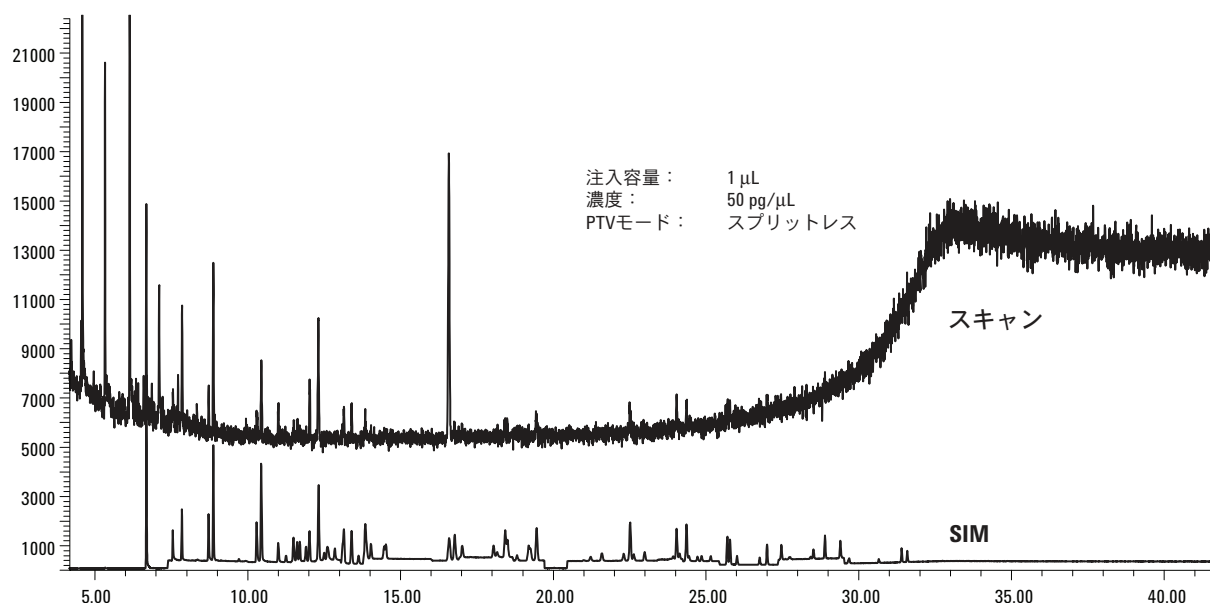


図 5. スキャンモードおよびSIMモードによって得られた50 pg/μLの1 μLスプリットレス注入によるクロマトグラム。

SIM法では、イオングループの保持時間は通常カラムのメンテナンス後に更新する必要がある。RTLを用いることによって、ユーザは時間のかかるRT更新作業を省けるだけでなく[4]、検出限界を下げることもできる。対象化合物の再現性のある既知のRTを用いて、各イオングループの開始および終了時間を最適に決定することができる。一度に1つまたは2つの化合物のみがモニターされるようにイオングループの時間ウィンドウを狭くすることによって、MSの各ウィンドウではより少ないイオンがモニターされ、ターゲットイオンのサンプリング時間を長くすることが可能になる。

理想的なSIM法ではイオングループが最大数となり、各グループのイオンが最小数となる。このように、各イオングループは単位時間により多くのスキャンを得ることができ、その結果、より良好なピーク形状と正確な定量がもたらされる。

LVI

検出限界をさらに低下させるために、ユーザはLVI法を用いてカラムへのサンプル量を増やすこともできる。典型的な「溶媒-ベント」アプローチは、溶媒の沸点より少し低い温度でPTV注入口にサンプルをゆっくり注入し、注入口の温度を上昇させる前に溶媒を蒸発させ、キャピラリーカラムに化合物を移動させることである。図6は1 μLのスプリットレス注入と25 μLの溶媒-ベント注入を比較したものである。両注入では1化合物あたりカラムに50 pgであった。溶媒-ベントのイオンクロマトグラムは、スプリットレスのイオンクロマトグラムと比較しやすくするために上下逆さまにプロットされていることに注意されたい。図から明らかなように、両方法ではひじょうに類似した結果が得られる。このことは、溶媒-ベント法がサンプルの導入に実行可能なアプローチであることを示している。

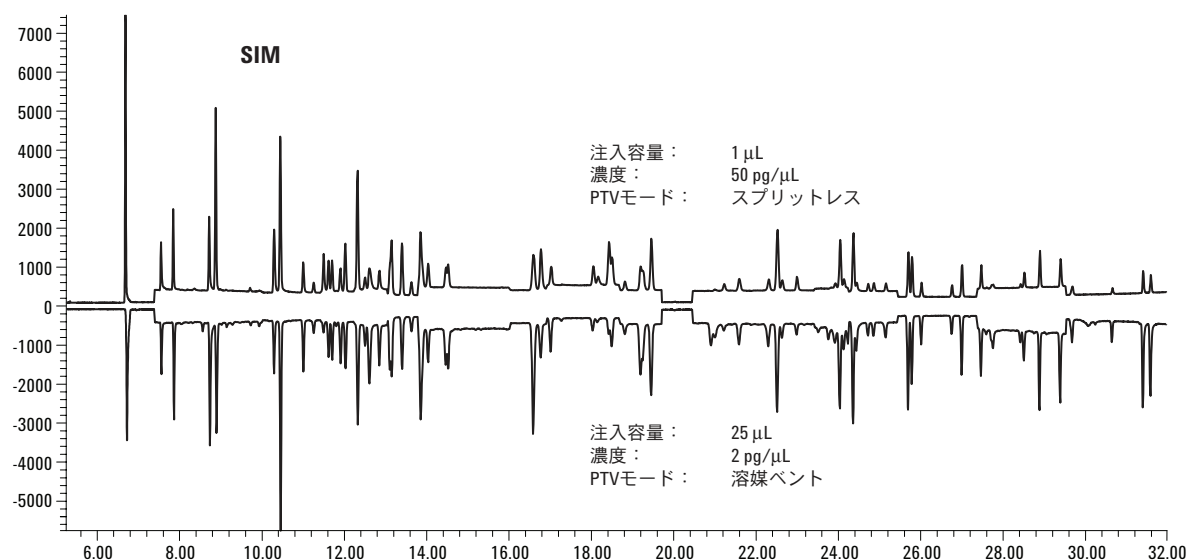


図 6. 1 μ L スプリットレス注入または25 μ L 溶媒-ベント注入を用いてカラムに50 pgを適用した場合のSIMの結果。

高EMV

MSのEMVが増加するにつれて、信号が強まることが知られている。図7では、上の信号は10倍に拡大したもので、チューン電圧における0.5 pg/ μ Lの25 μ L LVIである。下の信号はチューン+400Vに設定した電子増倍管を用いた同じ注入である。EMVに400Vを追加することによって信号が10倍増強し、

積分がより正確になる。しかし、ベースラインのノイズも10倍増強するため、S/Nは同じ状態である。

EMVを増加させることは小さいピークを検出閾値よりも大きくするのに役立つが、増倍管の寿命が短くなる。一般に、EMVはチューン電圧で維持すべきである。

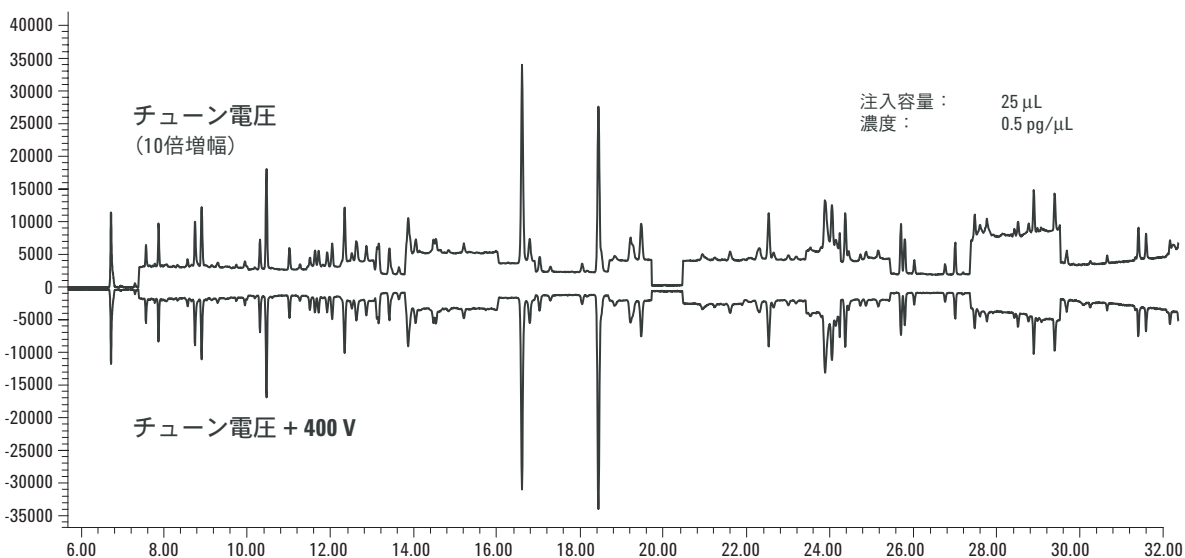


図 7. チューン電圧のEMVあるいはチューン+400Vを用いてカラムに12.5 pgを適用した場合のSIMの結果。

SIM法と組み合わせたLVI

図8および9はLVIとSIMの組み合わせたもので、カラムに少量の5 pgを適用した3種類の化合物の定量可能なピークを示す。図8では、0.2および500 pg/ μL のエンドスルファンサルフェートおよびp,p'-DDTのイオンクロマトグラムを示す。上のクロマトグラムは25 μL 溶媒ベントのSIM法で得られ、下のクロマトグラムは1 μL スプリットレスのスクリーン法で得られたものである。LVIとSIMを用いることによって、サンプル濃度が2500倍減少した場合

(500から0.2 pg/ μL)でも同様のS/N比が達成されていることが分かり、興味深い。

注入容量を100 μL に増加させることによって、図9に示すように0.05 pg/ μL の低濃度のサンプルでも定量することができる。上の部分は100 μL のフルスキャン測定によって得られた質量299および301のクロルタル-ジメチルの抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示す。下の部分は100 μL のSIM測定で得られた同じイオンを示す。SIM法ではより良好なピーク形状とより低いベースラインノイズが認められる。

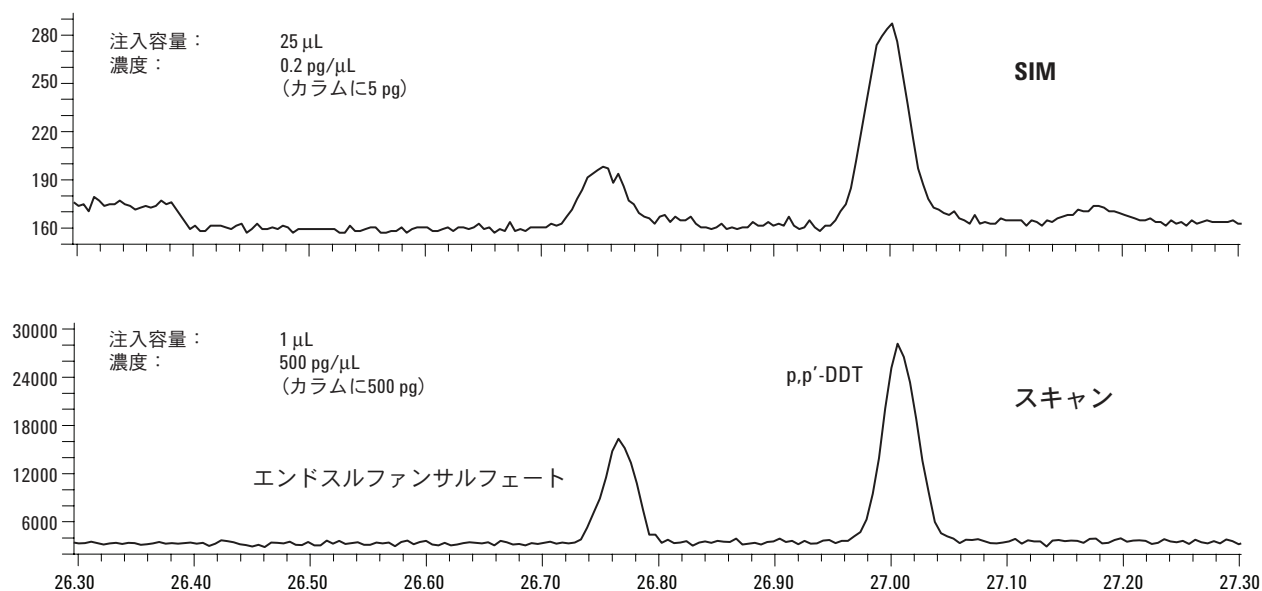


図 8. 0.2および500 pg/ μL のエンドスルファンサルフェートおよびp,p'-DDTのイオンクロマトグラム。上のクロマトグラムは25 μL 溶媒ベントのSIM法で得られ、下のクロマトグラムは1 μL スプリットレスのスクリーン法で得られた。

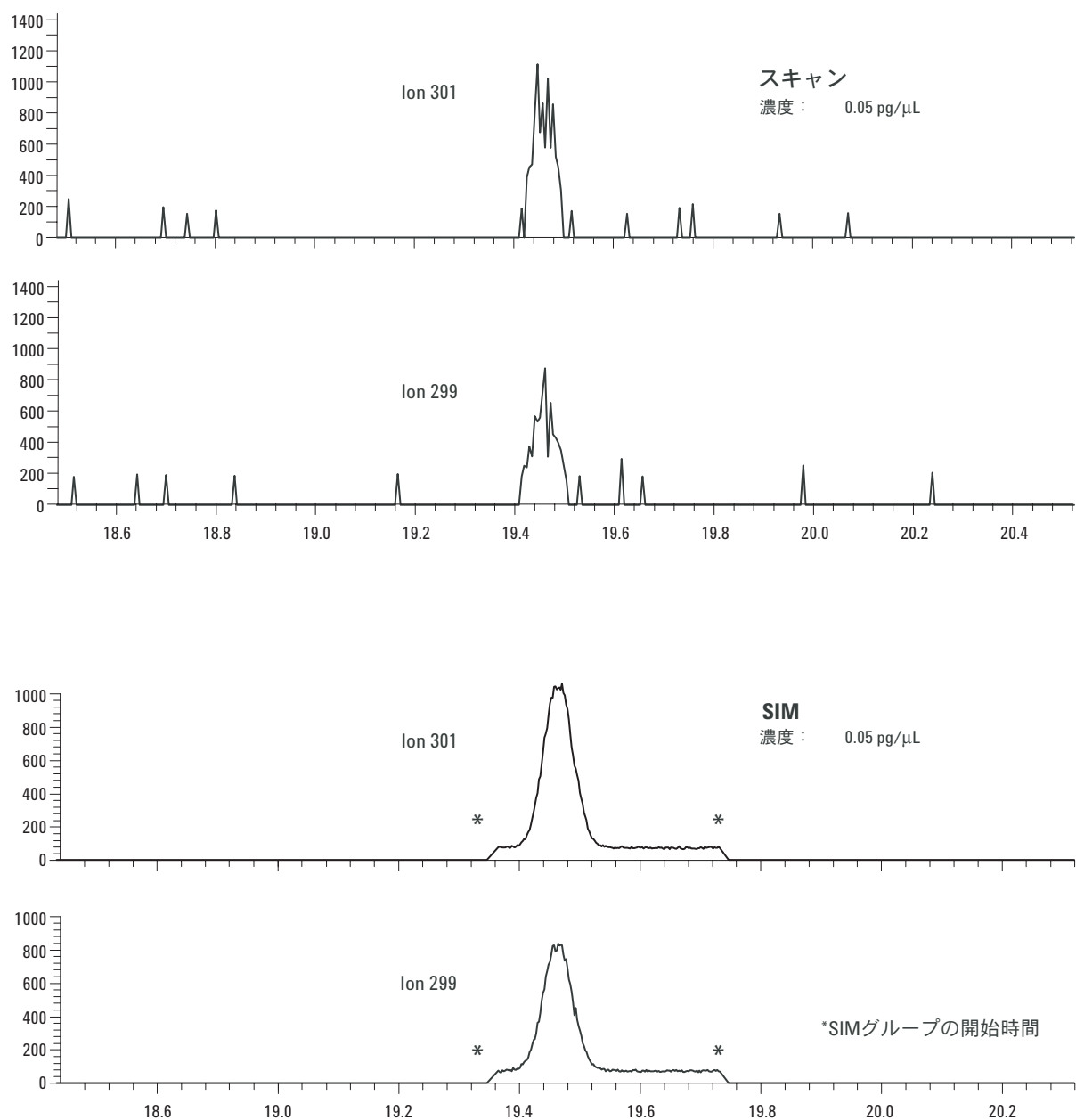


図 9. 0.05 pg/ μ Lを100 μ L注入したクロルタル-ジメチルのイオンクロマトグラム。上の部分はフルスキャンで得られ、下の部分はSIM測定で得られた。

対象化合物のスクリーニング

RTLとG1049A MSD RTL農薬データベース/ライブラリを組み合わせると、ユーザはどのようなスキャン測定からでも567種類の農薬と疑わしい内分泌攪乱物質についてスクリーニングすることができる[5]。ユーザはSIM法を用い、改善された感度によりライブラリのサブセットについてスクリーニングす

ることができる。MSD ChemStationでは、567化合物のスクリーニングレポートが30秒未満で自動的に作成される。図10は0.5 pg/ μ Lサンプル（SIMモードで25 μ Lを注入）に関するレポートで、「probable hit」（xの符号を付したもの）および「possible hit」（?の符号を付したもの）が列挙されている。カラムへ導入されたこの12.5 pgの対象化合物はすべてソフトウェアによって見出された。

MultiVu - [C:\SYS_X\DATA\80MIX\0403SIM\0_5PG2.D\scrntemp.txt]

File Edit Search Window

Screen Report (Not Reviewed)

Data File : C:\SYS_X\DATA\80MIX\0403SIM\0_5PG2.D Vial: 16
 Acq On : 3 Apr 2001 10:26 Operator: 40 SIMgrps, 40gr
 Sample : CDFA 80 mix 10000:1 Inst : GC/MS Ins
 Misc : CDFA 80 mix = 5 ng/μL Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: events.e

Screen File: Rtlpest.RES Extraction Window: +/- 0.100 min
 Screen Database: Rtlpest.SCD Qualifier Mode : Absolute
 Qualifier % : 30
 Zero qualifiers : Included
 Subtraction Mode : Sub Average Start/Sto

Compound	Status	ExpRT	Delta	Target m/z	Resp.	Qualifiers Out of Range	XCR
16 3-Chloroaniline	?	5.453	+0.034	127	11386	129	0.92
17 4-Chloroaniline	?	5.478	+0.009	127	17984	129	0.92
24 2,6-Dichlorobenzonitrile	x	6.752	-0.031	171	171652		0.97
35 Mevinphos	x	7.595	-0.035	127	101291		0.96
42 Propam	?	7.908	-0.039	93	107866	119,137	0.76
51 o-Phenylphenol	?	8.782	-0.038	170	204523	141	0.94
55 Pentachlorobenzene	?	8.947	-0.048	250	121353	248	0.85
76 Propoxur	x	10.353	-0.050	110	212997		0.99
82 Diphenylamine	x	10.516	-0.056	169	257621		0.94
92 Chlorpropham	?	11.045	-0.034	127	81328	153,154	0.75
102 Bendiocarb	?	11.540	-0.040	151	94050	166	0.85
103 Trifluralin	x	11.637	-0.011	306	41880		0.93
104 Benfluralin	x	11.725	-0.013	292	62933		0.96
111 Phorate	?	11.962	-0.042	75	63143	121,260	0.88
113 BHC alpha isomer	?	12.084	-0.045	181	46666	219,183,217	0.60
117 Hexachlorobenzene	?	12.377	-0.055	284	91832	282,288	0.00

図 10. 「probable hit」(x符号) および 「possible hit」(?符号) を示すGC/MS農薬スクリーナーの典型的なレポート。他の情報としては、ライブラリの保持時間とこれに続いてこのクロマトグラムでのRTの差、ターゲットイオン、そのアバンドンス、範囲外のクオリファイアおよびライブラリスpekトルとの相互相関値が含まれる。

結論

RTL農薬データベースの情報（化合物名、保持時間およびイオン質量）を用いると、80種類の対象化合物のSIM法をどのような分析も実行せずに2時間未満で作成することができる。実例に示されるように、LVIおよびSIMはいずれも対象化合物の定量限界をsub-ppmからpptまで低下させる有効な方法である。

どのような研究室でもハードウェアの変更を何ら行うことなく定量限界を100倍低下させることができる。SIM法およびRTLを用いて、カラムで500 pgから5 pgに定量限界を低下させることができる。システムにLVIを追加することによって、フェムトグラム (fg) / μLの対象化合物を定量することもできる。

謝辞

この研究で用いた農薬混液を提供されたCDFAのAlex ChungおよびMark Leeに謝意を表します。

参考文献

1. Vince Giarrocco, Bruce Quimby, and Matthew S. Klee, *Retention Time Locking: Concepts and Applications*, Agilent Technologies Application note, 5966-2469E, printed March 2000, www.agilent.com/chem
2. Bill Wilson, Philip L. Wylie, and Matthew S. Klee, *Large Volume Injection for Gas Chromatography Using a PTV Inlet*, Agilent Technologies Application note, 5965-7770E, printed February 2000, www.agilent.com/chem

3. Philip L. Wylie, *Trace Level Pesticide Analysis by GC/MS Using Large-Volume Injection*, Agilent Technologies Application note, 5966-1214E, printed April 2000, www.agilent.com/chem
4. Prest, H. and P. Cormia, *Retention Time Locking: Advantages in GC/MS SIM Analysis*, Agilent Technologies Application Note, 5968-3797E, printed December 1999, www.agilent.com/chem
5. Harry Prest, Philip L. Wylie, Ken Weiner, and Doug Agnew, *Efficient Screening for Pesticides and Endocrine Disrupters Using the 6890/5973 GC/MSD System*, Agilent Technologies Application note, 5968-4884E, printed December 1999, www.agilent.com/chem

詳細情報

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

Agilentはここに含まれる大きなミスや欠落あるいは材料の供給、運用成績あるいは使用に関して生じた大きな付帯的または間接的な損害について責任を負いません。

ここに記載される情報、説明および仕様は予告なしに変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2001

Printed in the USA
2001年11月14日
5988-4392JAJP



Agilent Technologies