

# 高分解能と精密質量精度： 複雑なマトリクスを含む食品・飼料分析のための 完璧なコンビネーション

Markus Kellmann, Andreas Wieghaus, Helmut Muenster, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany  
Lester Taylor, Dipankar Ghosh, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社 クロマトグラフィー&MS営業本部 応用技術部  
編集発行：マーケティングコミュニケーションズ

LCMS09001

## Key Words

- Exactive
- 食品分析
- 農薬スクリーニング
- 高分解能MS

## 概略

**目的:**最新のベンチトップ型Thermo Scientific Orbitrap 検出器を用い、複雑なマトリクス中の農薬スクリーニング分析を行う際、高分解能 (>40,000) を使用することの利点を明らかにする。

**実験法:**超高压液体クロマトグラフ (U-HPLC) とOrbitrap™検出器 (Thermo Scientific Exactive™) を高分解能モードで使用。

**結果:**農薬およびマイコトキシンの検出には精密質量を測定可能な検出器を用い、高分解能モードで分析を行うことが必要不可欠である。

## はじめに

法的に規制のある食品中の残留農薬、カビ毒、動物医薬品のスクリーニングは非常に重要な分析である。従来、この種の分析にはトリプル四重極型質量分析計によるSRMでの高感度分析が行われてきたが、この手法には以下に挙げる限界がある：

- 設定SRM以外のイオンを確認したい場合に再度測定が必要

- 1分析あたりのSRM設定数の制限

- 未同定の未知化合物については検出不可能

これらを回避するため、現在のところは、フルスキャンMSで残留分析を行う傾向がある。現行の手法ではスクリーニングは高性能ToF型質量分析計と超高压液体クロマトグラフ (U-HPLC) を組み合わせて行われ、分解能は15,000、質量精度は<5ppmである。

複雑なサンプルマトリクス (例: 食品、飼料、毛髪、蜂蜜など) を含む分析において、現行の手法における分解能では要求される質量精度が得られない場合がある。それは、サンプル中のマトリクスとターゲット化合物の分離が不十分な時に起こりうる。本研究では、最大分解能100,000と安定した質量精度を提供できるシングルステージOrbitrap 質量分析計とU-HPLCを組み合わせたフルスキャンスクリーニング手法を提案する。

また、分析における高分解能の大きな利点である以下の二点についても述べる：

- 共溶出するアイソバリックなターゲット化合物の分離
- 元素組成の帰属

## 方法

新しいノンハイブリッド型シングルステージOrbitrap 質量分析計 (Exactive, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) とU-HPLC (Thermo Scientific Accela™, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) の組み合わせにより、農薬、カビ毒、植物性毒素の116種の化合物を異なる濃度で含む、非常に複雑な混合物の分析を行った。U-HPLCメソッドとして、ODSカラム (Thermo Scientific Hypersil GOLD™ 50 x 2 mm, 1.9 um particles, Thermo Fisher Scientific, Madison, USA) を用い移動相に水/アセトニトリルを使用した12分間のグラジエント測定を採用した。また質量測定では、ToF型質量分析計で得られたデータと比較し、高分解能を使用した優位性を明らかにするためにR=15,000及びR=50,000の2通りの設定分解能を採用した。上記のメソッドを用いて、標準溶液と動物飼料抽出液を測定し、感度、選択性、直線性の評価を実施した。Orbitrapによるイオン量の制御は、AGC機能 (Automatic Gain Control, target value = 10<sup>6</sup>) を用いた。

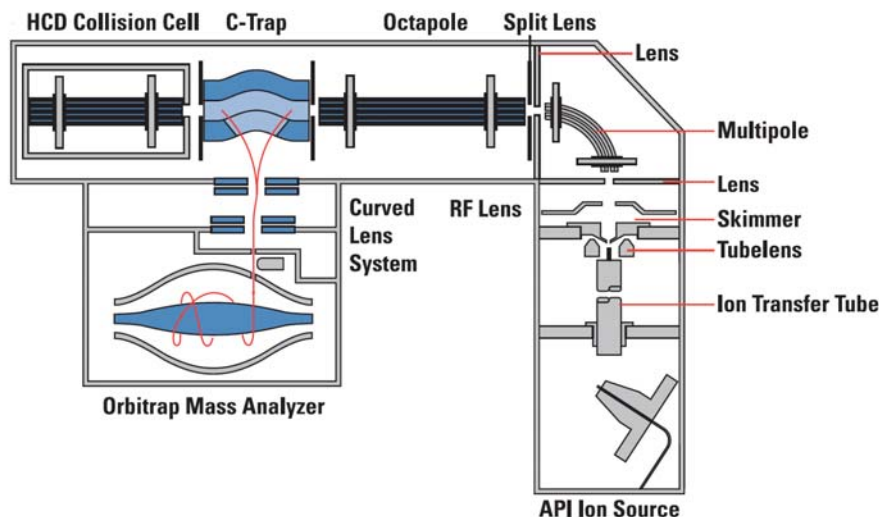


図1: 新型ベンチトップ型Orbitrap質量分析計の模式図、“All Ion Fragmentation”用のHCDコリジョンセルを含む。

## 結果

### アイソバリックな農薬の分離

アイソバリックな化合物が共溶出する場合、質量分析計の分解能が十分高くなければ、これらのピークを分離できず、質量精度や元素組成帰属が不正確になる。図2はプロトン化分子[M+H]<sup>+</sup>が、それぞれ292.02656と292.04031に検出される2種類の農薬、Thiamethoxam (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S) とParathion (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>PS)のマススペクトルである。これら2つのプロトン化分子を完全に分離するには40,000以上の分解能が必要であった。含有量が大幅に異なるアイソバリックな化合物を分離分析するためには、高分解能が必須条件である。図2に示した例では、約1:3の割合で混ざっている2つの農薬について測定値とシミュレーションの比較を行った。

### 元素組成帰属への影響

分離ができないアイソバリックなイオンの検出は、検出器が仕様として保証する質量精度から有意に外れた誤差の原因となる。低い分解能での分析は、元素組成を帰属する際、考慮すべき質量範囲を広げなければならない、その結果、多くの元素組成候補が提示されてしまう。これは図3の m/z 239.1503のPirimicarbの例に見ることができる。m/z 239のピークは、高質量側にアイソバリックな夾雑ピークが存在する。そのため、分解能15,000では高質量側にシフトし、質量誤差6.5ppmを示す。分解能80,000ではアイソバリックな夾雑イオンを十分に分離可能であり、質量精度はExactiveの仕様範囲内となる。

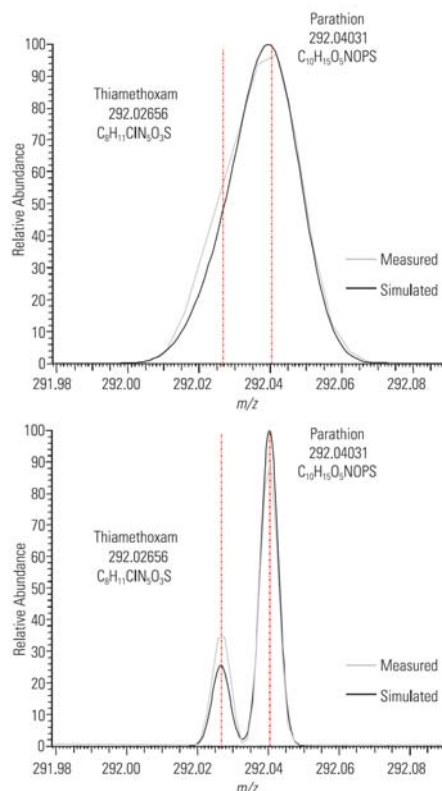


図2: 分解能15,000(上)、50,000(下)で測定された2つのアイソバリックな農薬のマススペクトル。それぞれの分解能における質量のシミュレーション結果を重ねて示す。

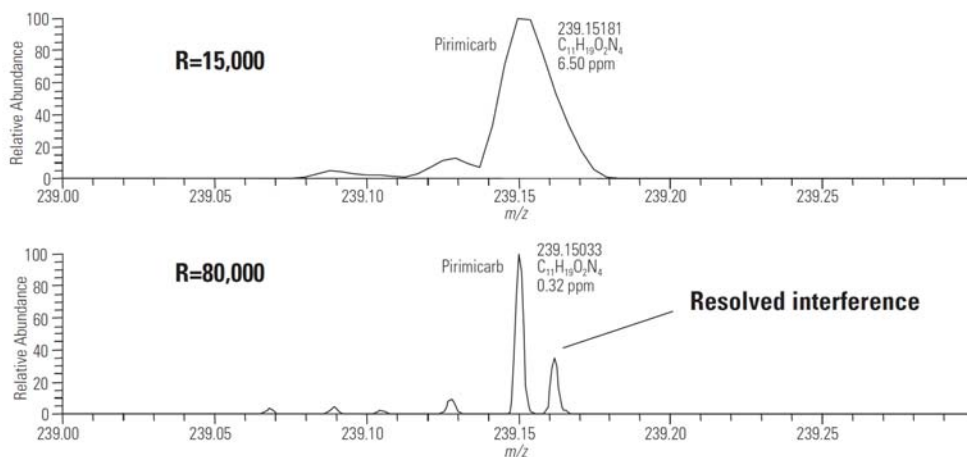


図3: 分解能の差によるアイソバリックなイオンピークの違い。分解能15,000でのピークは分解能を80,000にあげるにより2つに分離した。

モノアイソトピックなピークとその同位体に関し、各ピークの高さと精密質量を考慮したアルゴリズムを有する最新のソフトウェアを用いれば、元素組成の候補をより信頼性が高い候補へと絞り込むことができる。しかし、正しい結果を出すためには全ての精密質量値を規格精度範囲におさめなくてはならない。夾雑ピークを分離するためには、高分解能で分析を行う必要がある(図4)。ここでは、分解能15,000と80,000での防カビ剤Azoxystrobinの分析例を示す。中程度の分解能スペクトルではモノアイソトピックなピークに対して非常に良い質量精度を得られるものの、その同位体である $m/z$  405、406のイオンについては、それぞれ5ppm、3ppmと著しく大きな質量誤差が生じている。これは中程度の分解能では分離できない $m/z$  405.1452による干渉のためである。一方、高分解能スペクトルでは測定した3つの同位体全てについて非常に良好な質量精度を示した。~15,000の分解能で得られた結果は、いずれも紛らわしいか間違ったものであった。十分高い分解能の場合のみ、完全な分子イオン集団の精密質量の決定が可能であり、その結果、高い信頼性による元素組成の自動帰属が可能となる。

食品や動物飼料などの抽出物のような複雑なサンプルの分析、そして農薬、カビ毒、動物薬といった規制された物質のスクリーニングは質量分析における大きな課題である。大量に存在するマトリクスイオン中の低濃度化合物の検出のために広いスペクトル間ダイナミックレンジが必要となる一方で、false positive もしくは更に悪い状況としてfalse negative となることを避けるために高選択性と高感度が必要である。今回の方法では複雑なマトリクスの1例として馬飼料抽出物を用い、そこに116種の農薬およびカビ毒を添加し分析を行った。2~250ppb(各化合物あたり)の希釈段階のサンプルは2つの異なる分解能条件で2回ずつ分析を行った。更に100ppbのサンプルに関しては本法における最大検出可能物質数を決めるため分解能50,000で分析を行った。

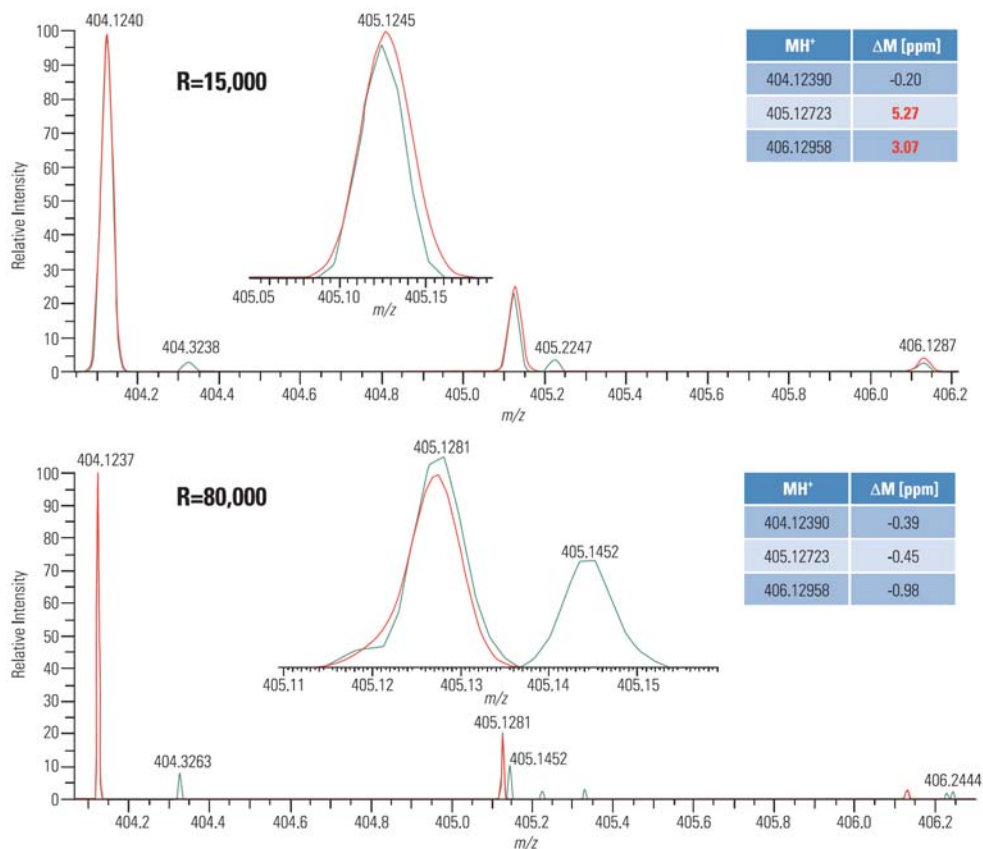


図4: 分子イオンとその同位体の分離における分解能の重要性。高分解能では正しい同位体パターンが得られる。

添加した抽出物サンプルのLC-MS分析では100ppb濃度において、116種中95種の物質が検出された。図5に116種の化合物のイオンクロマトグラムを重ね合わせたクロマトグラム(50ppb濃度、マトリクス中、質量範囲 3ppm)を示す。このデータから、より高い分解能設定での 3ppmの質量範囲ではより多くの化合物が検出(より高感度)されていることがわかる。図6にSulcotrionの場合を例として、濃度 50 ppbのサンプルを分解能 15,000及び、50,000で測定したマススペクトルを示す。より高い分解能ではスペクトルは2つのピークとして表れ、そのうちの小さいほうのピークがSulcotrionである。

低分解能ではSulcotrionのシグナルは完全に覆われてしまっている。ピーク形状がブロードであること、ショルダーピークがあること、そして干渉による高質量側へのシフトが起こっていることが、Sulcotrionの存在を示唆している。このことは、もし分析が分解能15,000でのみ行われたとしたらfalse negativeな結果となってしまふことを意味し、高分解能の場合と比べ分解能15,000では同定される化合物数が大きく減少する主な理由である。

上記の理由により、段階的に希釈されたサンプルを高分解能条件で測定した。例 (Metabenthiazuron)を図7に示す。2 ppb (2 ng/mL)レベルにいたるまで、優れた直線性と感度を示した。

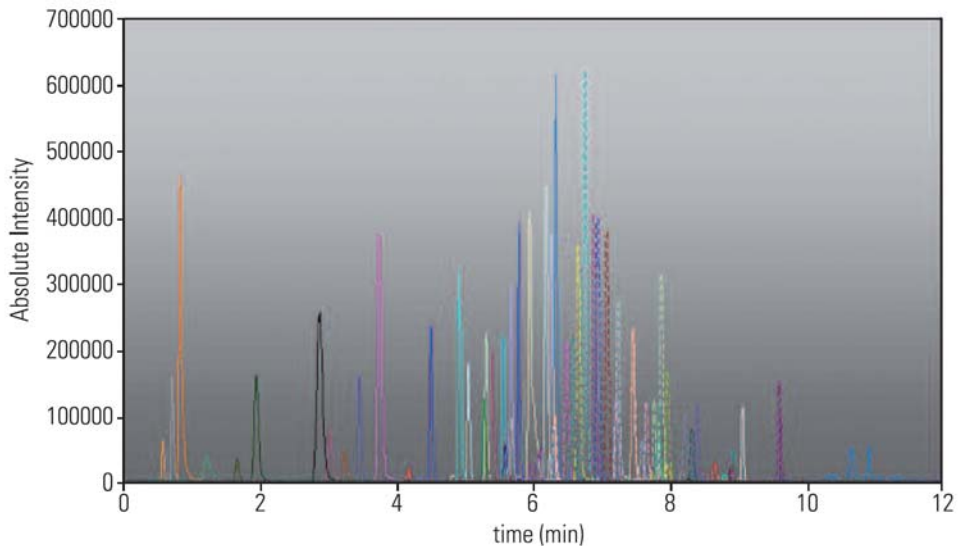


図5: 116種の農薬およびカビ毒の混合物(濃度 50ppb)より得られたイオンクロマトグラム(重ね合わせ表示)。ピーク抽出は3ppmの質量範囲で行った。

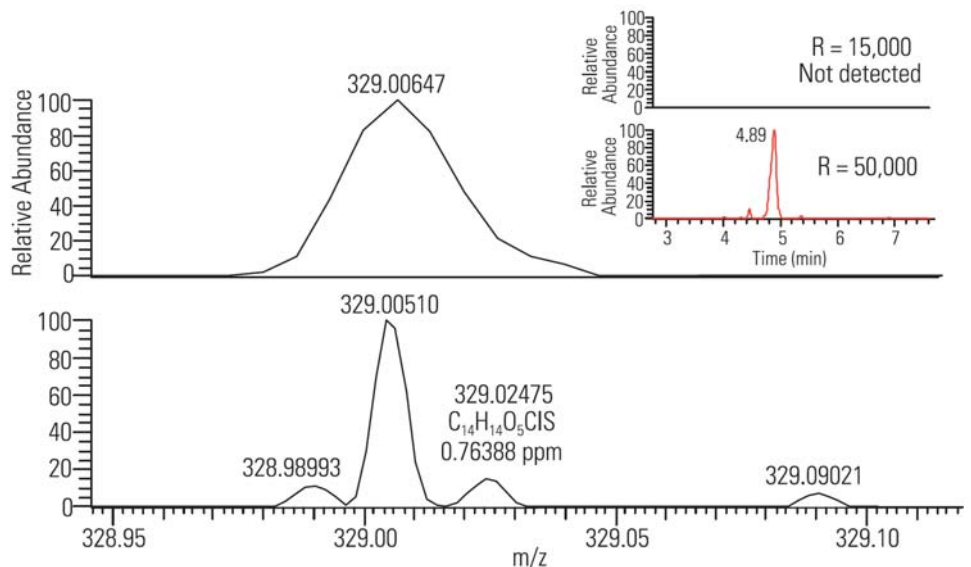


図6: 異なる分解能設定で分析した農薬混合物の拡大スペクトル(上: 15,000、下: 50,000)。Sulcotrion ( $m/z$  328.02475) は分解能15,000ではバックグラウンドに隠れてしまっているが、分解能50,000では確実に検出される(挿入図のマスキングも参照)。

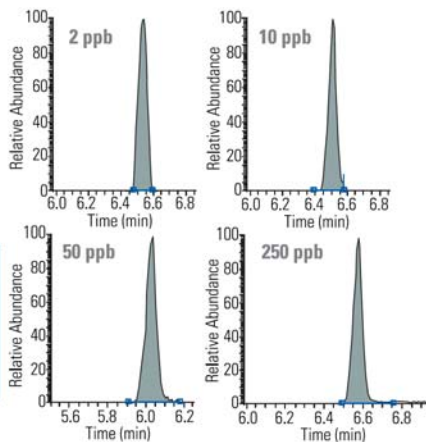
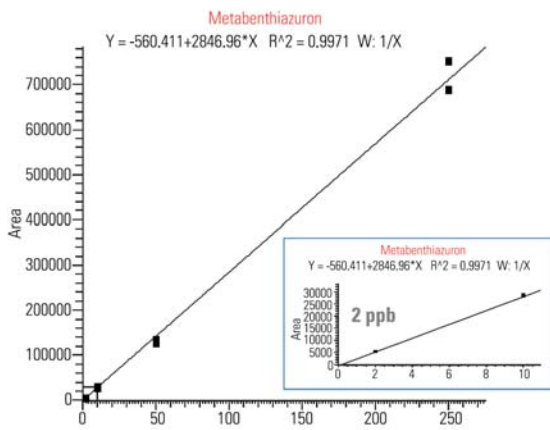


図7:2~250ppbまでのMetabenthiazuronの検量線。各々の濃度で定量されるピークは最低濃度にいたるまで精度が良い。

## 結論

- 最新のベンチトップ型Orbitrap質量分析計はToF型質量分析計と比べはるかに高い質量分解能を有する。
- 高分解能(最大100,000)により、複雑なサンプル分析においても高い質量精度を提供することが可能である。
- 複雑なマトリクス中の残留農薬スクリーニングにおいて、高分解能により優れた感度、直線性、選択性が得られる。
- 高速スキャン(10Hz)はU-HPLCに十分対応可能である。

非常に複雑なサンプル分析を行う際、適切なスキャン速度と分解能を選択することで、アイソバリックなマトリクスイオンを化合物から分離し、かつ微量なイオンを確実に検出する目的において、Exactiveは優れた性能を示す。

## 謝辞

サンプルをご提供いただいたRIKILT Institute for Food Safety (Wageningen、オランダ)のPaul Zomer、Hans Mol両氏に心から感謝する。



LCMS09001

サーモフィッシャー  
サイエンティフィック株式会社

クロマトグラフィー&MS営業本部  
応用技術部

横浜本社  
045-453-9197

大阪支店  
06-6863-1551

E-mail  
info-jp@thermo.com

www.thermofisher.co.jp  
(日本)  
www.thermofisher.com  
(グローバル)

©2006 Thermo Fisher Scientific Inc. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

Specification, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.