

Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システムおよび iReflex を用いた 水道水中ハロ酢酸類測定における効率化 および信頼性の向上

著者

滝埜昌彦

アジレント・テクノロジー
株式会社

要旨

本アプリケーションノートでは、Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS (LC/TQ) および intelligent reflex (iReflex) と呼ばれる intelligent ワークリスト再注入ロジックを使用した水道水中ハロ酢酸類測定における効率化および信頼性の向上について紹介します。

iReflex とは連続分析において、試料測定完了後直ちに結果を解析し、その結果を反映して再測定する手法です。この手法を用いることで、以下の再測定が可能です。

- ① ブランク測定で測定対象化合物が指定した設定値以上検出された場合、ブラン試料を再測定。
- ② 定量値が検量線の範囲を超えた場合、オートサンプラーで試料を希釈して再測定。
- ③ 高速スクリーニング測定で測定対象化合物が設定値以上検出された場合、通常の測定で再測定。

水道水中ハロ酢酸類分析を例に iReflex の有用性を紹介します。

実験

ハロ酢酸類標準液は関東化学株式会社製ハロ酢酸混合標準原液 II (9 種) を使用しました。ハロ酢酸類はジクロロ酢酸 (DCAA)、モノクロロ酢酸 (MCAA)、ブromクロロ酢酸 (BCAA)、モノブrom酢酸 (MBAA)、ジブrom酢酸 (DBAA)、トリクロロ酢酸 (TCAA)、ブromジクロロ酢酸 (BDCAA)、ジブromクロロ酢酸 (DBCAA)、トリブrom酢酸 (TBAA) の 9 種です。検量線用標準液は原液を使用してメタノールで 1 µg/mL 溶液を調製し、さらにボトル超純水で適宜希釈しました。水道水および標準液添加水道水は直接分析を行いました。試料バイアルはポリプロピレンバイアルを使用しました。

測定条件

システム

- 1260 Infinity II Flexible Pump (G7104C)
- 1260 Infinity II Multisampler (G7167A)
- 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat (G7116A)
- 6475 Triple quadrupole LC/MS system (G6475A)

ハロ酢酸類の LC/TQ による測定条件は表 1 に示した通り、C18 カラムを用いた 0.1 % ige酸を含む LC/MS 用超純水 (移動相 A) とメタノール (移動相 B) によるグラジエント分析で行いました。イオン化は、Agilent Jet Stream (AJS) テクノロジーによるエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) を使用しました。多重反応モニタリング (MRM) 方式の測定条件も表 1 に示した通りです。

表 1. ハロ酢酸類の LC/TQ 測定条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System
カラム	InertSustain C18 (3 mm×150 mm, 3 µm) (P/N:5020-14425)
流速	0.7 mL/min---高速分析 0.4 mL/min---通常分析
移動相	A : 0.1 % ige酸水溶液 B : メタノール
グラジエント	5 %--- (4 min) ---100 % B---高速分析 5 % B/1 min--- (9 min) ---100 % B---通常分析
カラム温度	40 °C
注入量	10 µL
MS	Agilent 6475A Triple quadrupole LC/MS System
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS) 負イオンモード
乾燥ガス	300 °C 10 L/min
シースガス	400 °C 12 L/min
ネブライザ圧	60 psi
フラグメンター電圧	60 V
キャピラリ電圧	2500 V
ノズル電圧	0 V
MRM イオン	下表参照

ハロ酢酸	プリカーサー	プロダクト	コリジョンエネルギー (eV)
DCAA	127	83	12
MCAA	93	35	6
BCAA	173	129	6
MBAA	137	79	6
DBAA	217	173	6
TCAA	117	35	9
BDCAA	163	81	6
DBCAA	207	79	6
TBAA	251	79	6

測定結果でハロ酢酸類の定量値が検量線を超えた場合、表 2 に示したインジェクタープログラムを用い、オートサンプラー (ALS) によって 10 倍希釈を行いました。その際、希釈試料は試料の次の行に並べた空バイアルで調製されます。

表 2. ALS による試料の希釈注入

機能	パラメータ	
希釈	容量: 90.00 µL、吸引元: ロケーション1*P1-C2、速度: デフォルト速度、オフセット: デフォルト	希釈溶媒を吸引
吸引	容量: 10.00 µL、吸引元: サンプル、速度: デフォルト速度、オフセット: デフォルト	試料の吸引
洗浄	メソッドで定義されたニードル洗浄	ニードル洗浄
吐出	容量: 最大容量、吐出先: ロケーション*(1.0)、速度: デフォルト速度、オフセット: デフォルト	試料と希釈溶媒を空バイアルに吐出
繰り返し	繰り返しの回数	
吸引	容量: 80.00 µL、吸引元: エア、速度: デフォルト速度	希釈試料の混合
吐出	容量: 最大容量、吐出先: ロケーション*(1.0)、速度: デフォルト速度、オフセット: デフォルト	
繰り返し終了	繰り返しの終了	
吸引	容量: 10.00 µL、吸引元: ロケーション*(1.0)、速度: デフォルト速度、オフセット: デフォルト	希釈試料の吸引
洗浄	メソッドで定義されたニードル洗浄	ニードル洗浄
注入	注入	希釈試料の注入

iReflex の設定は第 1 測定メソッド、第 1 定量メソッドおよびワークリストで設定します。

測定メソッドの設定を図 1 に示します。表内に示した①~⑥のステップは以下の通りです。

- ① 高速スクリーニングの追加を指定することで定量値が基準値や検量線の上限を超えた場合、再測定します。
- ② 再測定時の測定メソッドを指定
- ③ キャリーオーバーを指定することで、キャリーオーバーが認められた場合、ブランクを再測定します。
- ④ 第 1 メソッドでの定量メソッドを指定
- ⑤ 再測定メソッドでの定量メソッドを指定
- ⑥ 両測定メソッドでの定量結果のレポートテンプレートを指定

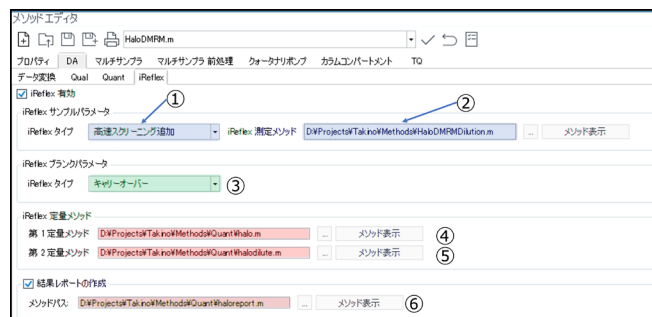


図 1. 第 1 測定メソッドによる iReflex の設定

図 2 は第 1 定量メソッドによる上限値の設定画面です。ブランク試料の上限値とサンプルアmountでハロ酢酸類の上限値を設定します。ブランク測定時にハロ酢酸類がブランク濃度上限を超えた場合、ブランク測定を繰り返します。また、試料測定時にサンプルアmountの上限を超えた場合は、試料を第 2 メソッドで再測定します。検量線超過ワークフローではサンプルアmountに検量線の上限を設定します。

化合物名	TS	トランジエン	測定モード	タイプ	アmountの下限	アmountの上限
BCAA	1 127.0 → 83.0	MRM	ターゲット	0	50	
MCBA	1 99.0 → 25.0	MRM	ターゲット	0	50	
BCAA	1 179.0 → 129.0	MRM	ターゲット	0	50	
MBAA	1 137.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0	50	
DBAA	1 217.0 → 173.0	MRM	ターゲット	0	50	
TCAA	1 117.0 → 35.0	MRM	ターゲット	0	50	
BCAA	1 169.0 → 81.0	MRM	ターゲット	0	50	
DBCAA	1 207.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0	50	
TCAA	1 251.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0	50	

化合物名	Δ	TS	トランジエン	測定モード	タイプ	ブランク濃度上限
BCAA		1 179.0 → 129.0	MRM	ターゲット	0.1000	
BCAA		1 169.0 → 81.0	MRM	ターゲット	0.1000	
DBAA		1 217.0 → 173.0	MRM	ターゲット	0.1000	
DBCAA		1 207.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0.1000	
DCAA		1 127.0 → 83.0	MRM	ターゲット	0.1000	
MBAA		1 137.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0.1000	
MCBA		1 99.0 → 25.0	MRM	ターゲット	0.1000	
TCAA		1 251.0 → 79.0	MRM	ターゲット	0.1000	
TCAA		1 117.0 → 35.0	MRM	ターゲット	0.1000	

図 2. 第 1 定量メソッドによる上限値の設定

図 3 はワークリストによる設定画面でメソッド実行範囲は測定と DA (解析) の両方を指定、iReflex ワークフローを有効にチェックを入れます。また、この設定でブランクの再測定回数の上限を設定することが可能です。

図 3. ワークリストによる iReflex の設定

表 3. 高速分析 iReflex ワークリスト測定結果

ワークリスト	ステータス	サンプル名	サンプル位置	メソッド	データファイル	サンプルタイプ	レベル名	iReflex タイプ	iReflex 測定メソッド	第 1 定量メソッド	第 2 定量メソッド
1	完了	20ppb	P1-B3	HaloDMRM.m	halo-0020.d	QC	20	①			
2	完了	ブランク	P1-C2	HaloDMRM.m	halo-0021.d	ブランク		②	キャリアオーバー	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.dilute.m
3	完了	試料1	P1-C2	HaloDMRM.m	halo-0011.d	サンプル		③	高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
4	完了	試料2	P1-C3	HaloDMRM.m	halo-0012.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
5	完了	試料3	P1-C4	HaloDMRM.m	halo-0013.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
6	完了	試料4	P1-C5	HaloDMRM.m	halo-0014.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
7	完了	試料5	P1-C6	HaloDMRM.m	halo-0015.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
8	完了	試料6	P1-C7	HaloDMRM.m	halo-0016.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
9	完了	試料7	P1-C8	HaloDMRM.m	halo-0017.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
10	完了	試料8	P1-C9	HaloDMRM.m	halo-0018.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRMDilution2.m	Quant\halo.m
11	完了 iReflex	試料5-iReflex	P1-C2	HaloDMRMDilur	halo-0015-iReflex	ブランク		④	iReflex ワークフローなし		Quant\halo.dilute.m
12	完了 iReflex	試料5-iReflex	P1-C6	HaloDMRMDilur	halo-0015-iReflex	サンプル			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.dilute.m
13	完了 iReflex	試料7-iReflex	P1-C8	HaloDMRMDilur	halo-0017-iReflex	サンプル			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.dilute.m
14	完了 iReflex	試料8-iReflex	P1-C9	HaloDMRMDilur	halo-0018-iReflex	サンプル			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.dilute.m

結果

高速分析ワークフロー

高速メソッド (第 1 メソッド) で測定を行い、ハロ酢酸類がサンプルアmountで設定した上限値を超えた試料を通常メソッド (第 2 メソッド) で測定するという iReflex ワークフローを用いた測定結果を表 3 に示します。

この測定では、①QC 測定、②ブランク測定、③標準液測定、④試料測定、⑤検出された試料の通常条件で再測定が実施された結果です。一連の測定で第 1 メソッドによる検量線は自動更新され試料の測定が実施されます。第 1 メソッドでの測定は概算値で良いので③の検量線の更新を省く事も可能です。通常条件である第 2 メソッドの検量線は予め更新しておく必要があります。

図 4 は試料 5 の測定結果のクロマトグラムを示します。

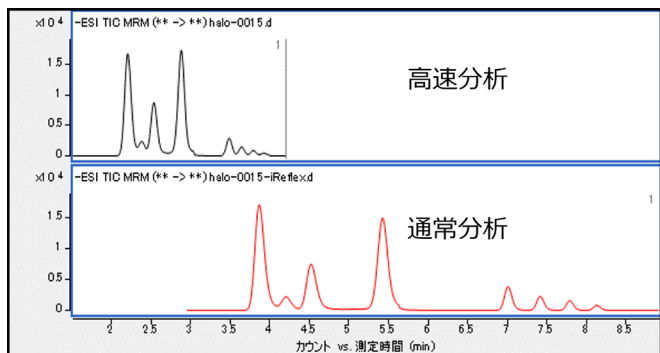


図 4. 試料 5 中ハロ酢酸類のクロマトグラム

この結果ではブランク測定中に上限を超えた化合物は無く、再測定は実施されていません。試料は 5, 7 および 8 において上限値を超えた化合物が存在したことから再測定を実施しています。また、試料の再測定は全試料測定後に追加され、試料 5 の測定前には通常メソッドでブランク測定を行います。第 1 および第 2 メソッドで測定した定量結果のバッチテーブルは自動的に作成されレポートまで自動作成されます。

図 5 に自動作成されたバッチテーブルを示します。グラフィックの結果は試料 8 中 MCAA の結果です。

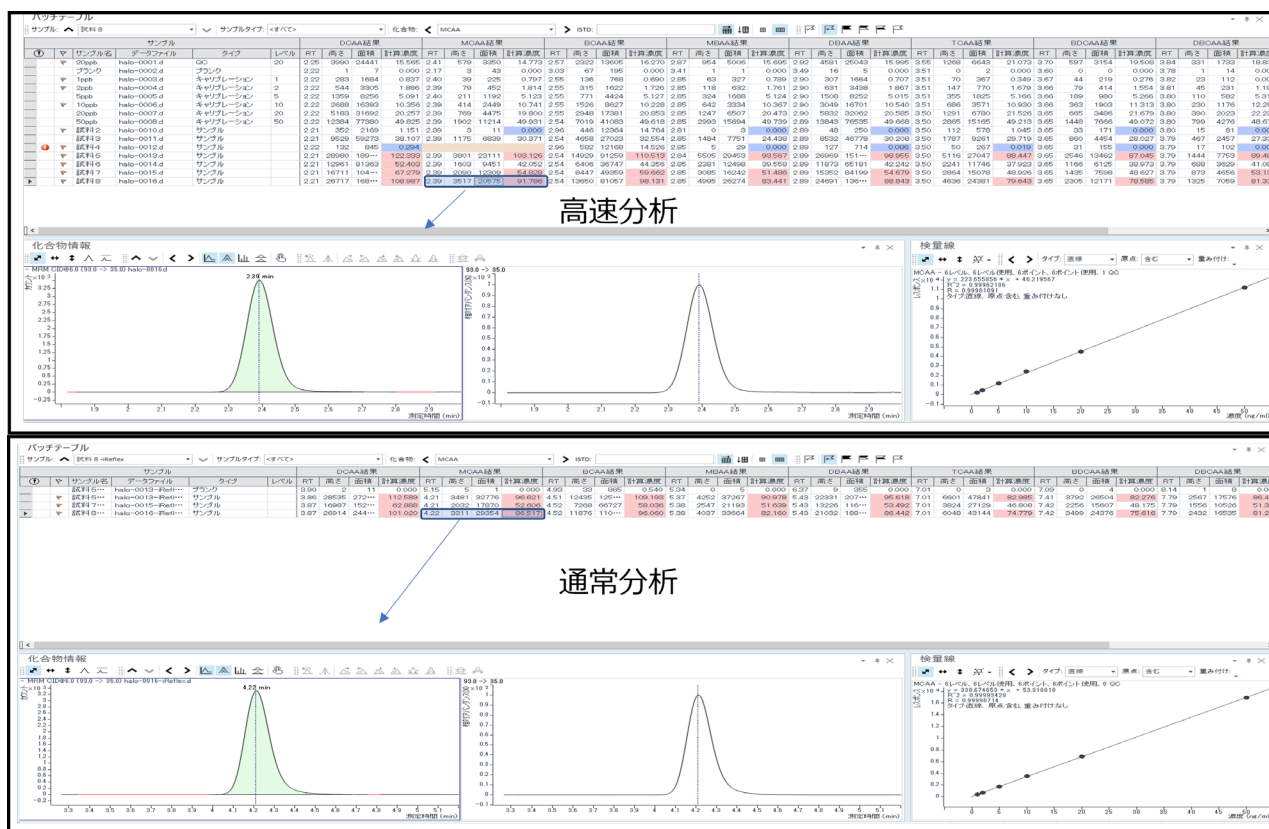


図 5. 高速分析および通常分析によるバッチテーブル

表 4 は作成されたレポートを示しましたが、第 1 および第 2 メソッドの結果が比較できるようになっています。

表 4. 高速スクリーニング結果レポート

バッチ名	halorefux231210-FirstTier-2023-12-10-11-51-26.batch.bin	halorefux231210-SecondTier-2023-12-10-11-52-05.batch.bin
サンプル名:	試料 7	試料 7-iReflex
データファイル:	halo-0015.d	halo-0015-iReflex.d
オペレーター:	SYSTEM (SYSTEM)	SYSTEM (SYSTEM)
測定メソッド:	haloDMRshort.m	HaloDMRM.m
測定日時:	2023/12/10 10:28:56	2023/12/10 11:18:09
サンプル位置:	P1-C8	P1-C8
希釈率:	1	1
サンプル情報:	-	-
スクリーニング結果		
化合物名	最終濃度 (Tier 1)	最終濃度 (Tier 2)
bcaa	59.68	59.04
bdcaa	48.63	48.17
dbaa	54.68	53.49
dcbaa	53.14	51.38
dcaa	67.28	62.89
mbaa	51.49	51.64
mcaa	54.63	52.61
tbaa	62.23	60.56
tcaa	48.93	48.81

表 5. 検量線超過 iReflex ワークリスト測定結果

ワークリスト	ステータス	サンプル名	サンプル位置	メソッド	データファイル	サンプルタイプ	レベル名	iReflex タイプ	iReflex 測定メソッド	第 1 定量メソッド	第 2 定量メソッド
1	完了	20ppb	P1-B3	haloDMRMshort.m	halo-0001.d	QC	20	①			
2	完了	ブランク	P1-C2	haloDMRMshort.m	halo-0002.d	ブランク		②	キャリアオーバー	Quant\haloshort.m	Quant\halo.m
3	完了	1ppb	P1-B7	haloDMRMshort.m	halo-0003.d	Cal	1				
4	完了	2ppb	P1-B6	haloDMRMshort.m	halo-0004.d	Cal	2				
5	完了	5ppb	P1-B5	haloDMRMshort.m	halo-0005.d	Cal	5				
6	完了	10ppb	P1-B4	haloDMRMshort.m	halo-0006.d	Cal	10				
7	完了	20ppb	P1-b3	haloDMRMshort.m	halo-0007.d	Cal	20				
8	完了	50ppb	P1-B2	haloDMRMshort.m	halo-0008.d	Cal	50				
9	完了	試料 2	P1-C3	haloDMRMshort.m	halo-0010.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
10	完了	試料 3	P1-C4	haloDMRMshort.m	halo-0011.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
11	完了	試料 4	P1-C5	haloDMRMshort.m	halo-0012.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
12	完了	試料 5	P1-C6	haloDMRMshort.m	halo-0013.d	サンプル		④	高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
13	完了	試料 6	P1-C7	haloDMRMshort.m	halo-0014.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
14	完了	試料 7	P1-C8	haloDMRMshort.m	halo-0015.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
15	完了	試料 8	P1-C9	haloDMRMshort.m	halo-0016.d	サンプル			高速スクリーニング追加	HaloDMRM.m	Quant\haloshort.m
16	完了 iReflex	試料 5-iReflex	P1-C2	HaloDMRM.m	halo-0013-iReflex	ブランク			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.m
17	完了 iReflex	試料 5-iReflex	P1-C6	HaloDMRM.m	halo-0013-iReflex	サンプル			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.m
18	完了 iReflex	試料 7-iReflex	P1-C8	HaloDMRM.m	halo-0015-iReflex	サンプル		⑤	iReflex ワークフローなし		Quant\halo.m
19	完了 iReflex	試料 8-iReflex	P1-C9	HaloDMRM.m	halo-0016-iReflex	サンプル			iReflex ワークフローなし		Quant\halo.m

検量線超過ワークフロー

通常メソッド（第 1 メソッド）で測定を行い、ハロ酢酸類が検量線の上限を超えた場合、試料を希釈するメソッド（第 2 メソッド）で再測定する iReflex ワークフローを用いた測定結果を表 5 に示します。検量線上限を超えた試料を表 2 の ALS による試料の希釈を含んだメソッドで再測定します。

この測定は、①QC 測定、②ブランク測定、③試料測定、④検量線の上限を超えて検出された試料を希釈を含む第 2 メソッドで再測定を行った結果です。このワークフローでは、標準液での検量線の自動更新は含んでいません。また、第 2 定量メソッドの検量線は第 1 定量メソッドとレスポンスは同一で濃度のみ 10 倍に設定されています。図 6 に試料 5 の測定結果であるクロマトグラムを示しました。このワークフローの結果では、ブランク測定は高速分析同様に上限を超えた化合物は無く、ブランク測定は 1 回です。試料 5, 7 および 8 には検量線の上限を超えた化合物が存在し、再測定しています。

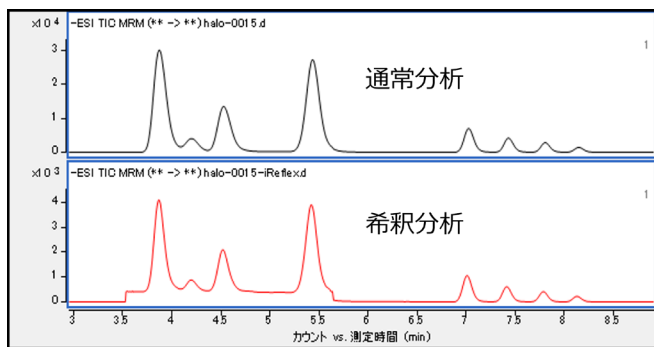


図 6. 通常分析と希釈分析による試料 5 中ハロ酢酸類のクロマトグラム

表 6 にレポートを示しました。ALS で希釈することで、検量線の直線範囲で定量が可能となり、信頼性の高い結果が得られました。

表 6. 検量線超過結果レポート

バッチ名:	haloireflex2312092-FirstTier-2023-12-09-21-24-58.batch.bin	haloireflex2312092-SecondTier-2023-12-09-21-25-13.batch.bin
サンプル名:	試料5	試料5-iReflex
データファイル:	halo-0015.d	halo-0015-iReflex.d
オペレータ:	SYSTEM (SYSTEM)	SYSTEM (SYSTEM)
測定メソッド:	HaloDMRM.m	HaloDMRMdIution2.m
測定日時:	2023/12/09 19:15:17	2023/12/09 20:37:58
サンプル位置:	P1-C6	P1-C6
希釈率:	1	1
サンプル情報:	-	-
スクリーニング結果		
化合物名	最終濃度 (Tier 1)	最終濃度 (Tier 2)
bcaa	116.13	124.19
bdcaa	90.59	120.86
dbaa	105.61	118.76
dbcaa	94.65	123.26
dcaa	119.04	120.55
mbaa	97.55	121.42
mcaa	103.51	116.15
tbaa	113.88	155.86
tcaa	88.24	122.29

まとめ

iReflex を使用した高速分析スクリーニングワークフローおよび検量線超過ワークフローについてハロ酢酸分析を実例として示しました。iReflex を用いることで、多検体のスクリーニングを効率よく実施できることが示されました。また、環境や食品分析において試料に含まれる測定対象化合物の濃度が想定より濃い場合があります。その場合は、定量値が検量線範囲外のため、試料を希釈して再測定する必要があります。iReflex 機能を用いると、ALS による試料の希釈と再測定が可能であるため、作業の効率化を図ることができます。以上より、iReflex を用いるこの方法を使用することで、分析の効率化および信頼性の向上が可能であると思われます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

DE59236975

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, January 17, 2024

5994-7082JAJP