

Intelligent Reflex および LC スクリーナーを 使用した LC/MS による 残留農薬分析の信頼性の向上と効率化

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) を使用した作物中残留農薬分析において Intelligent Reflex および LC スクリーナーを用いた測定結果の信頼性の向上と解析の効率化について紹介します。

Intelligent Reflex は既報のアプリケーションノート¹⁾で述べた通り、連続分析において intelligent ワークリスト再注入ロジックを用いることにより、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。また、LC スクリーナーは解析結果を可視化することにより、多成分一斉分析における大量の解析データを効率良く確認できるツールです。そこで、作物中残留農薬分析において Intelligent Reflex およびスクリーナーを用いた実例を紹介します。

測定条件および解析手法

農薬混合標準液は林純薬工業製 PL2005 農薬 LC/MS Mix 4～12 を使用しました。各混合標準液を混合してメタノールで適宜希釈しました。試料バイアルは不活性ガラスバイアルを使用しました。市場で購入したぶどう、りんごおよびみかんは既報²⁾の通り前処理を行いました。

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

農薬の LC/TQ による測定条件は表 1 に示した通りです。カラムに ZORBAX Eclipse Plus C18 (第 1 メソッド) および RESTEK 製 Raptor Biphenyl (第 2 メソッド) を用いて、2 mM 酢酸アンモニウムを含む LC/MS 用ボトル超純水 (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を行いました。カラムの切り替えには 2 ポジション/10 ポートバルブを使用しました。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、測定は多重反応モニタリング (MRM) 方式で実施しました。

表 1. 農薬の LC/TQ 測定条件

LC	Agilent 1260 Infinity II Prime LC System
カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD (2.1mm×100 mm, 1.8 μm P/N:959758-902) Raptor Biphenyl (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm P/N:9309A12)
流速	0.2 mL/min
移動相	A : 2 mM 酢酸アンモニウム B : メタノール
グラジエント	10 %--- (10 min) ---100 % B/2 min
カラム温度	40 °C
注入量	1 μL
MS	Agilent 6475 Triple quadrupole LC/MS System
イオン源	Agilent Jet Stream (AJS) 正/負イオンモード
乾燥ガス	300 °C 10 L/min
シースガス	300 °C 12 L/min
ネブライザ圧	50 psi
キャピラリ電圧	3500 V
ノズル電圧	0 V

Intelligent Reflex

本 Intelligent Reflex のワークフローでは試料測定毎に定量解析を自動で実行します。それはその定量結果からブランクでキャリアオーバーが生じていないか、あるいは検体で定量値が上限を超えていないかを判断し、ブランク試料の再測定や第 2 測定メソッドによる再測定を行うかなどを判定するためです。これにより、キャリアオーバーやマトリックス成分による偽陽性が低減され、さらに、定量テーブルやレポートまで自動作成することで、解析の効率化も可能となります。これらのフローは図 1 で示すように、第 1 メソッドの他、第 1 定量メソッドによる検体の再測定を指定しておきます。図 2 では、第 1 メソッドによる上限値の設定を行います。設定した基準を超えた場合の、ブランク試料の再測定については図 3 のようにワークリストで設定することができます。

LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m

プロパティ DA マルチサンプリング マルチサンプリング 前処理 コアータナリポンブ カラムコンパートメント TQ

データ変換 Qual Quant iReflex

iReflex 有効

iReflex サンプルパラメータ

iReflex タイプ **高速スクリーニング追加** (1) iReflex 測定メソッド **c:\Methods\Pestireflex6475\LCMSDMRMBiphenylshort.m** (2) ... メソッド表示

iReflex ブランクパラメータ

iReflex タイプ **キャリアオーバー** (3)

iReflex 定量メソッド

第 1 定量メソッド **D:\Projects\Takino\Methods\Quant\pestshort.m** (4) ... メソッド表示

第 2 定量メソッド **D:\Projects\Takino\Methods\Quant\pestbiphenyl.m** (5) ... メソッド表示

結果レポートの作成

メソッドパス: **D:\Projects\Takino\Methods\Quant\fastscreening.m** (6) ... メソッド表示

- ①:高速スクリーニング追加を指定 (定量値が上限を超えた場合第 2 測定メソッドで再測定) ④:第 1 定量メソッドを指定
 ②:第 2 測定メソッドを指定 ⑤:第 2 定量メソッドを指定
 ③:キャリアオーバーを指定 ⑥: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 Intelligent Reflex の設定

メソッドタスク		定量対象化合物					
		化合物名	Δ	トランジション	測定モード	タイプ	アムountの上限
<input checked="" type="checkbox"/> クロリアア比(F)		2,4-D		219.0 → 160.9	MRM	ターゲット	1
Q値		4-Chlorophenoxyacetic acid		185.0 → 127.0	MRM	ターゲット	1
共溶出スコア		Abamectin B1a		890.5 → 567.3	MRM	ターゲット	1
検証済みイオン数		Acibenzoral-S-methyl		211.0 → 136.0	MRM	ターゲット	1
<input checked="" type="checkbox"/> ISTDレスポンス(I)		Acifluofen		360.0 → 316.0	MRM	ターゲット	1
ISTDレスポンスの % 偏差		Aldicarb		116.0 → 89.0	MRM	ターゲット	1
サンプルアムount(P)		Aldicarb-sulfoxide		207.1 → 132.0	MRM	ターゲット	1
サンプル RSD		Aldoxycarb		240.0 → 223.0	MRM	ターゲット	1
ブランクの濃度(B)		Ametryn		228.1 → 186.0	MRM	ターゲット	1
		Anilofos		368.0 → 124.9	MRM	ターゲット	1
		2,4-D		219.0 → 160.9	MRM	ターゲット	0.5000
		4-Chlorophenoxyacetic acid		185.0 → 127.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Abamectin B1a		890.5 → 567.3	MRM	ターゲット	0.5000
		Acibenzoral-S-methyl		211.0 → 136.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Acifluofen		360.0 → 316.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Aldicarb		116.0 → 89.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Aldicarb-sulfoxide		207.1 → 132.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Aldoxycarb		240.0 → 223.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Ametryn		228.1 → 186.0	MRM	ターゲット	0.5000
		Anilofos		368.0 → 124.9	MRM	ターゲット	0.5000

図 2. 第 1 定量メソッドによる上限値の設定

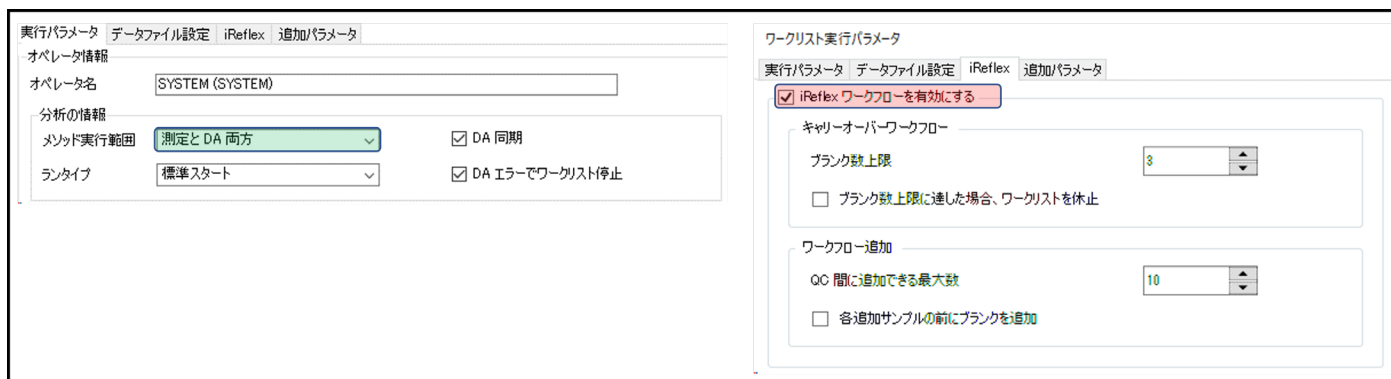


図 3. ワークリストによる Intelligent Reflex の設定

LC スクリーナー

LC スクリーナーは、測定結果を一覧表で表示し可視化するツールです。測定結果の基準値および可視化基準を図 4 に示しました。測定結果の基準値は定量イオン (T) (保持時間、S/N) および確認イオン (Q) (定量イオンとの共溶出スコア、T/Q および S/N) で設定します。これら全基準値を満たしたイオンは検証済みイオンと呼びます。この検証済みイオンの数を基準値として指定します。図 4 左の例では最小検証済みイオン数を 2 と設定したので、定量イオンと確認イオンが 1 個以上全基準を満たせば、図右側の可視化基準に従って検出 と判断され、一覧表 (表 4 参照) として示されるため、容易に判断が可能となります。

測定結果基準値の設定画面

可視化基準

検出 <input checked="" type="checkbox"/>	保持時間が基準以内 かつ 検証済みイオン数が基準以上
要検討 <input type="checkbox"/>	保持時間が基準外 又は 検証済みイオン数が基準未満
非検出 <input type="checkbox"/>	保持時間が基準外 かつ 検証済みイオン数が基準未満

図 4. LC スクリーナーの測定結果基準値 (左) および可視化基準 (右)

測定結果

本報では第2メソッド追加したワークフローの結果を紹介します。図1の第1測定メソッドで、高速スクリーニング追加を指定することにより、農薬が上限値を超えて検出された場合、第1測定メソッドで使用するC18カラムと直交選択性（保持時間が異なる）の高いカラムを使用した第2測定メソッドで再測定されます。そこで、C18カラムに対して直交選択性の高い逆相カラムとしてBiphenylカラムを評価しました。図5にC18とBiphenylで測定した各農薬のクロマトグラムと保持時間相関図を示します。特に保持時間の早い農薬で保持時間が大きく異なっていました。従ってC18カラムに対して、偽陽性を低減させ信頼性を高める確認用カラムとしてBiphenylが有用と考えられます。

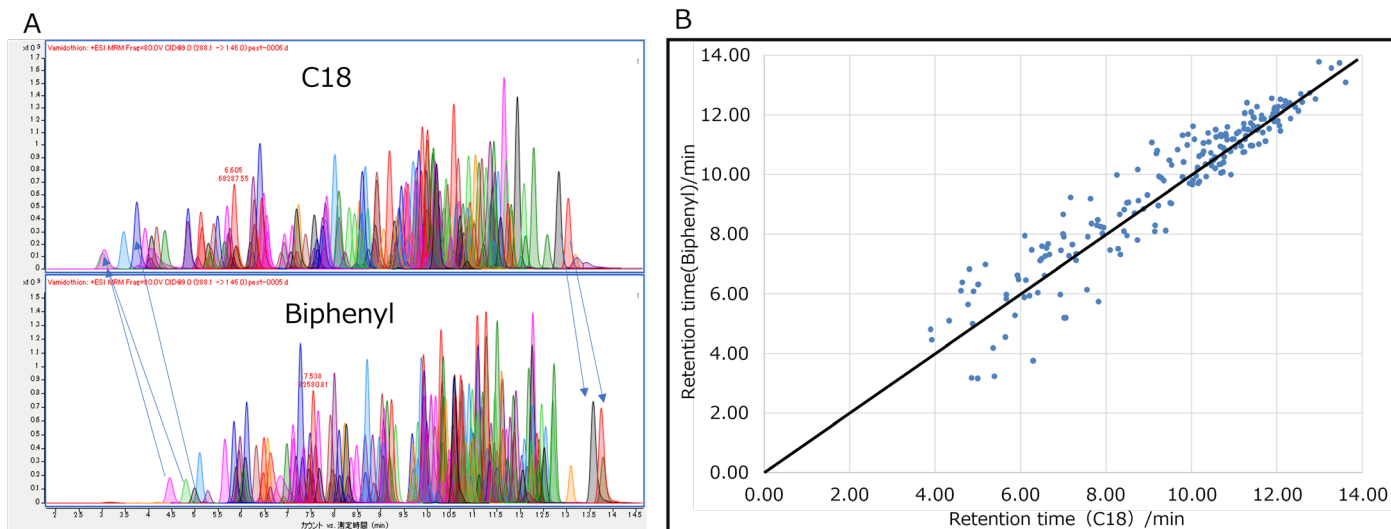


図5. C18とBiphenylカラムによる農薬類のクロマトグラムと保持時間 A：クロマトグラム B：保持時間相関図

表2は①ブランク測定、②QC測定、③標準液測定、④試料測定、⑤検出された試料のBiphenylカラムで再測定が実施された結果です。一連の測定で第1測定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2測定メソッドはBiphenylカラムによる確認分析ですので第2定量メソッドの既存検量線で定量します。

表2. 第2メソッド追加ワークフローを用いて測定したワークリスト結果

	☑	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
1	☑	完了	ブランク	P1-C7	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0001.d	ブランク	①
2	☑	完了 iReflex	ブランク-c001	P1-C7	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0001-c001.d	ブランク	
3	☑	完了 iReflex	ブランク-c002	P1-C7	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0001-c002.d	ブランク	
5	☑	完了	10ppb	P1-C4	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0002.d	QC	10 ②
6	☑	完了	2.5ppb	P1-C5	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0003.d	Cal	2.5
7	☑	完了	10ppb	P1-C4	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0004.d	Cal	10
8	☑	完了	20ppb	P1-C3	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0005.d	Cal	20
9	☑	完了	50ppb	P1-C2	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0006.d	Cal	50
10	☑	完了	りんご	P1-B1	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0008.d	サンプル	④
11	☑	完了	ぶどう	P1-B2	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0009.d	サンプル	
12	☑	完了	みかん	P1-B3	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	pest-0010.d	サンプル	
13	☑	完了 iReflex	りんご-iReflex-Blank	P1-C7	LCMSDMRMBiphenylshort.m	pest-0008-iReflex-Blank.d	ブランク	⑤
14	☑	完了 iReflex	りんご-iReflex	P1-B1	LCMSDMRMBiphenylshort.m	pest-0008-iReflex.d	サンプル	
15	☑	完了 iReflex	ぶどう-iReflex	P1-B2	LCMSDMRMBiphenylshort.m	pest-0009-iReflex.d	サンプル	
16	☑	完了 iReflex	みかん-iReflex	P1-B3	LCMSDMRMBiphenylshort.m	pest-0010-iReflex.d	サンプル	

この結果ではブランク測定でブランク濃度上限値を超えた農薬が存在し、ブランク試料を3回測定しています。りんご、ぶどうおよびみかんの測定において全ての作物でサンプルアmountの上限値を超えた農薬が存在したため、全作物を Biphenyl カラムを用いて再測定しています。また、この Intelligent Reflex は高速スクリーニング追加ワークフローを指定したことから、全試料の測定後に再測定が追加され、初めに一度、第2測定メソッドでブランク測定が行われます。第1, 第2メソッドで測定した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6に自動で作成されたバッチテーブルを示します。

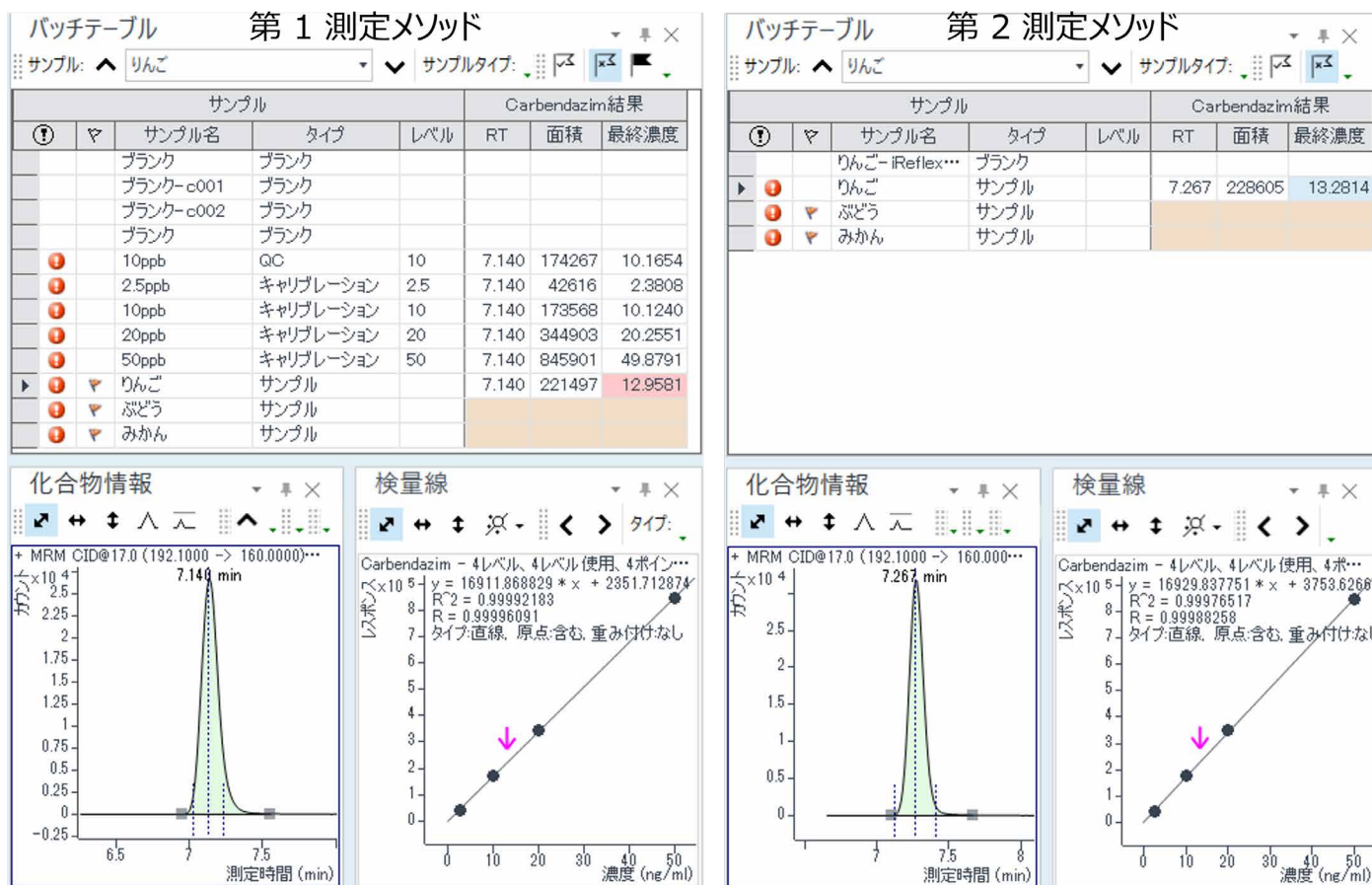


図6. 第1, 第2測定メソッドによるりんご中カルベンダジム

図6の結果は、りんご中カルベンダジムの結果です。第1, 第2測定メソッド共にカルベンダジムが検出されていることがわかります。図7はぶどう中チジアズロンの結果を示します。第1メソッドでは、ピークが検出されていますが、第2メソッドではピークは検出されておらず、第1メソッドでの結果は偽陽性であることがわかりました。

バッチテーブル 第1測定メソッド

サンプル: ぶどう

サンプル				Thidiazuron結果			
!	▼	サンプル名	タイプ	レベル	RT	面積	最終濃度
		ブランク	ブランク				
		ブランク-c001	ブランク				
		ブランク-c002	ブランク				
		ブランク	ブランク				
!		10ppb	QC	10	8.427	64543	10.7050
!		2.5ppb	キャリブレーション	2.5	8.427	14994	2.1335
!		10ppb	キャリブレーション	10	8.427	63397	10.5066
!		20ppb	キャリブレーション	20	8.427	122159	20.6720
!		50ppb	キャリブレーション	50	8.427	289662	49.6482
!	▼	りんご	サンプル				
!	▼	ぶどう	サンプル		8.529	12670	1.7314
!	▼	みかん	サンプル				

バッチテーブル 第2測定メソッド

サンプル: ぶどう

サンプル				Thidiazuron結果			
!	▼	サンプル名	タイプ	レベル	RT	面積	最終濃度
		りんご-iReflex...	ブランク				
!	▼	りんご	サンプル				
!	▼	ぶどう	サンプル				
!	▼	みかん	サンプル				

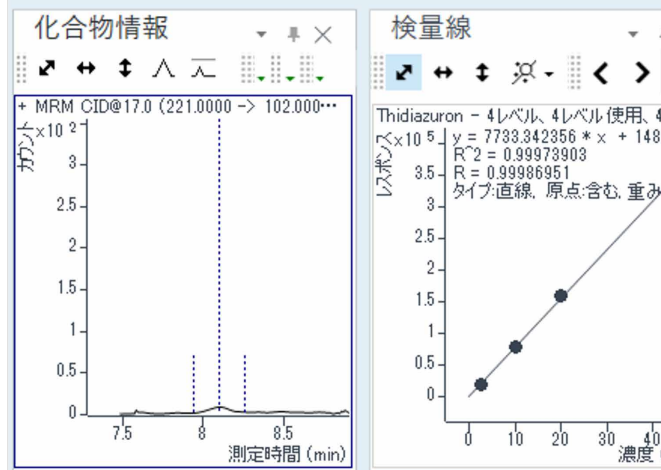
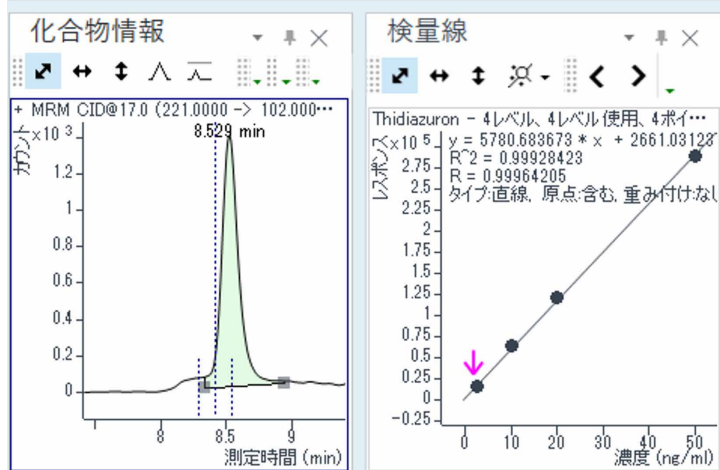


図7. 第1、第2測定メソッドによるぶどう中チジアズロンの結果

表 3 は自動で作成されたレポートです。第 1, 第 2 測定メソッドでの結果が比較できるように表示されます。

表 3. 第 2 メソッド追加分析ワークフローの定量レポート



バッチ名	pestfastscreeningireflex231008-FirstTier-2023-10-08-05-17-39.batch.bin	pestfastscreeningireflex231008-SecondTier-2023-10-08-05-18-02.batch.bin
サンプル名:	りんご	りんご-iReflex
データファイル:	pest-0008.d	pest-0008-iReflex.d
オペレータ:	SYSTEM (SYSTEM)	SYSTEM (SYSTEM)
測定メソッド:	LCMSDMRMFastscreeningbiphenyl.m	LCMSDMRMBiphenylshort.m
測定日時:	2023/10/08 2:32:17	2023/10/08 4:07:00
サンプル位置:	P1-B1	P1-B1
希釈率:	1	1
サンプル情報:	-	-
スクリーニング結果	第 1 メソッド (C18 カラム) 第 2 メソッド (Biphenyl カラム)	

化合物名	最終濃度 (Tier 1)	最終濃度 (Tier 2)
bensulfuron-methyl	ND	ND
cinosulfuron	ND	ND
cyclosulfamuron	ND	ND
fenhexamide	ND	ND
flazasulfuron	ND	ND
fluzafop	ND	ND
foramsulfuron	ND	ND
halosulfuron methyl	ND	ND

トリクロルホン
C18:3.56 ppb
Biphenyl:3.84 ppb

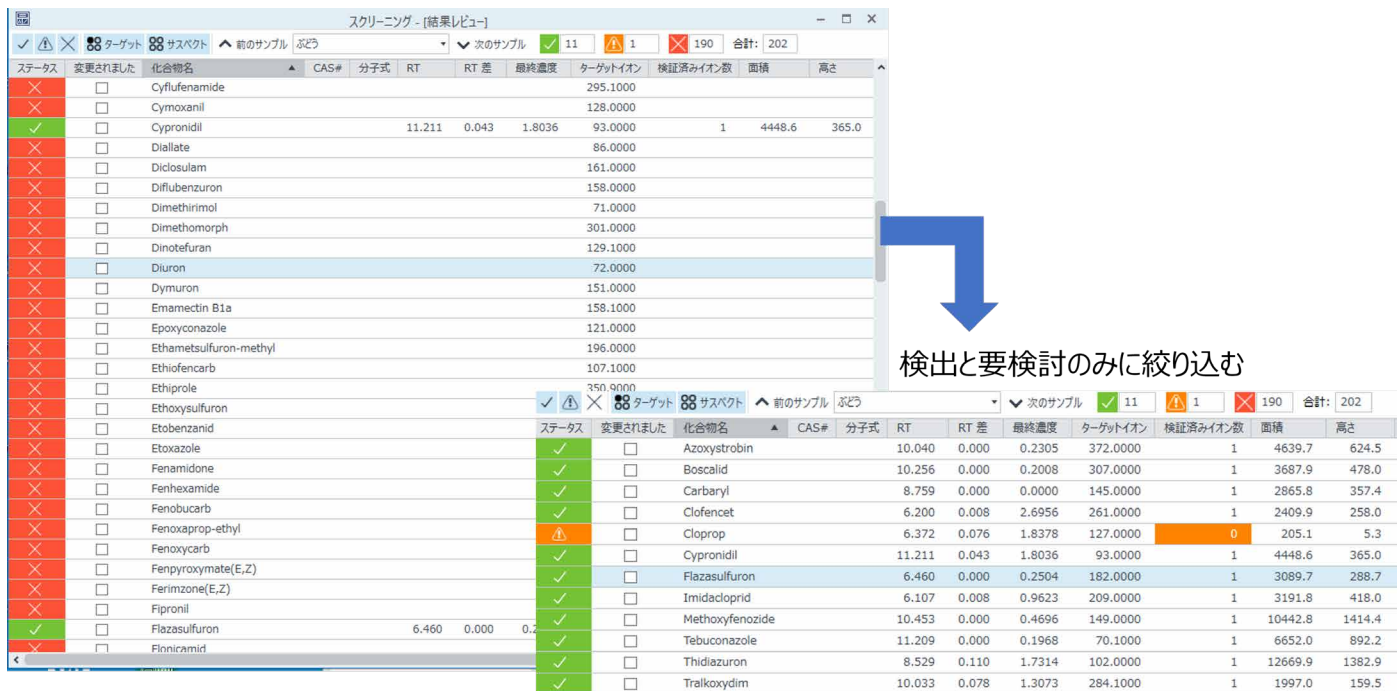
trichlorfom	3.56	3.84
trifloxystrobin	ND	ND
triflumizole metabolite	ND	ND
quinalphos	ND	ND
thiobencarb	ND	ND
mefenacet	ND	ND
spirodiclofen	ND	ND
bentazone	ND	ND
carbendazim	12.96	13.28
coumaphos	ND	ND
cymoxanil	ND	ND
emamectin b1a	ND	ND

カルベンダジム
C18:12.96 ppb
Biphenyl:13.28 ppb

赤字：サンプルアmountの上限値を超えた定量値

表 4 は測定結果を LC スクリーナーで表示した一覧表です。LC スクリーナーでは、測定結果の一覧表示が可能で、さらに、予め設定した基準に従って検出、要検討および非検出に分類し、フィルターをかけることが可能です。この結果はぶどうの結果ですが、検出と要検討に絞り込むことで 202 農薬中 12 農薬のみ表示させることが可能であり、解析時間を大幅に短縮することができます。

表 4. LC スクリーナーの結果



ステータス	変更されました	化合物名	CAS#	分子式	RT	RT 差	最終濃度	ターゲットイオン	検証済みイオン数	面積	高さ
✖		Cyflufenamide						295.1000			
✖		Cymoxanil						128.0000			
✔		Cypronidil			11.211	0.043	1.8036	93.0000	1	4448.6	365.0
✖		Diallate						86.0000			
✖		Diclosulam						161.0000			
✖		Diflubenzuron						158.0000			
✖		Dimethirimol						71.0000			
✖		Dimethomorph						301.0000			
✖		Dinotefuran						129.1000			
✖		Diuron						72.0000			
✖		Dymuron						151.0000			
✖		Emamectin B1a						158.1000			
✖		Epoxyconazole						121.0000			
✖		Ethamsulfuron-methyl						196.0000			
✖		Ethiofencarb						107.1000			
✖		Ethiprole						350.0000			
✖		Ethoxysulfuron						250.0000			
✖		Etobenzanid									
✖		Etoazole									
✖		Fenamidon									
✖		Fenhexamide									
✖		Fenobucarb									
✖		Fenoxaprop-ethyl									
✖		Fenoxycarb									
✖		Fenpyroximate(E,Z)									
✖		Ferimzone(E,Z)									
✖		Fipronil									
✔		Flazasulfuron			6.460	0.000	0.2504	182.0000	1	3089.7	288.7
✖		Flnicamid									
✔		Azoxystrobin			10.040	0.000	0.2305	372.0000	1	4639.7	624.5
✔		Boscalid			10.256	0.000	0.2008	307.0000	1	3687.9	478.0
✔		Carbaryl			8.759	0.000	0.0000	145.0000	1	2865.8	357.4
✔		Clofencet			6.200	0.008	2.6956	261.0000	1	2409.9	258.0
⚠		Cloprop			6.372	0.076	1.8378	127.0000	0	205.1	5.3
✔		Cypronidil			11.211	0.043	1.8036	93.0000	1	4448.6	365.0
✔		Flazasulfuron			6.460	0.000	0.2504	182.0000	1	3089.7	288.7
✔		Imidacloprid			6.107	0.008	0.9623	209.0000	1	3191.8	418.0
✔		Methoxyfenozide			10.453	0.000	0.4696	149.0000	1	10442.8	1414.4
✔		Tebuconazole			11.209	0.000	0.1968	70.1000	1	6652.0	892.2
✔		Thidiazuron			8.529	0.110	1.7314	102.0000	1	12669.9	1382.9
✔		Tralkoxydim			10.033	0.078	1.3073	284.1000	1	1997.0	159.5

まとめ

Intelligent Reflex および LC スクリーナーを使用した残留農薬分析の信頼性の向上と効率化について作物中農薬分析を実例として示しました。Intelligent Reflex を用いることで偽陽性を低減することが可能となり、測定結果の信頼性が向上しました。また、LC スクリーナーを使用することで測定結果のフィルタリングが可能となり、効率的に解析結果の確認が可能となりました。以上より、Intelligent Reflex と LC スクリーナーを使用することで、分析の信頼性の向上および効率化が可能であると思われます。

参考文献

- 1) Agilent 6475 トリプル四重極 LC/MS システムおよび Intelligent Reflex 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, 5994-7082JAJP (2024)
- 2) Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS システムを用いた作物中農薬スクリーニング法の評価, 5994-6221JAJP

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。

DE11651849

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, March 31, 2024

5994-7323JAJP