

Agilent 7696A サンプル前処理 ワークベンチを使用した GC/MS/MS によるエストロンの分析

アプリケーションノート

著者

Peter Mrozinski
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE
USA
Selene Hernandez Ruiz, Ph.D.
Chemical and Environmental
Engineering
Arizona University
Tucson, Arizona
USA
Anthony Macherone, Ph.D.
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE
USA

概要

内分泌攪乱物質の分析は多くのラボで需要が高まっており、それは臨床化学、産業暴露、創薬および薬剤開発、また新たな汚染や残留性有機汚染物質を含む環境分析など、様々な分野へ広がっています。そのため、実際に分析を行うラボでは、分析装置に加えて、サンプル前処理の精度および再現性の維持にも負荷がかかっています。このアプリケーションノートでは、Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチによる自動化ワークフローを使用した GC/MS/MS 分析について説明します。



Agilent Technologies

はじめに

地下水、地表水、および飲料水源に含まれるエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、コルチコステロイド、グルココルチコイドなどの内分泌攪乱物質 (EDC) の正確な分析に対するニーズが高まっています。環境中のこれらの化合物は、主に家畜や人のホルモン治療により生じる医原性のもので、多くの場合、親薬物および代謝物の排泄物は、従来の廃水処理工程では完全には分解されません。この結果、これらの化合物が河川などの淡水で見つかり、帯水層に移行します。EDC は、ppt レベルでも発生する有害作用を発生します。例として、魚類および両生類の異常なオス/メス比、魚類の可逆的な雌性化、生殖経路の阻害、雌雄同体のような形態変化、正常なフェロモン応答の乱れなどがあり、これだけに留まりません。数十年の間広く使用されてきた結果、これらの化合物は至るところに残留しており、人への健康に対する大きなリスクとなっています。そのため、これらの化合物の環境中での移動および動態の研究はきわめて重要です。このアプリケーションノートでは、内分泌攪乱物質分析のためのキャリブレーション標準の作成と誘導体化のサンプル前処理を 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して自動化する方法について説明します。

実験方法

標準および試薬

エストロン (E1)、BSFTA/TCMS (99 %/1 %)、無水アセトニトリル、無水ピリジンは Sigma-Aldrich Corp. (米国) から購入しました。E1 の原液を無水アセトニトリルで希釈し、キャリブレーション標準を作成するために必要な混合液を作成しました。

機器

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用してキャリブレーション標準を作成し、対象化合物の自動誘導体化を行いました。測定に用いた機器は、コールドスプリットレス注入ができるマルチモード注入口 (MMI) を備えた Agilent 7890A シリーズ GC と、Agilent 7693A 150 ポジションオートサンブラ付きの Agilent 7000B トリプル四重極 MS で行いました。機器の条件を表 1 および 2 に示します。

表 1. GC/MS の条件

GC の実行条件

分析カラム	15 m HP-5MS UI (p/n 19091S431UI) x 2 Agilent パージ Ultimate ユニオン (p/n G1472A) を使用して直列に接続
注入量	2 µL
注入モード	コールド、スプリットレス、マルチモード 注入口 (MMI) を使用
注入口温度	70 °C で 0.01 分保持 450 °C/min で 280 °C まで昇温、 280 °C で 3 分保持 3 分後に 20 mL/min 1.5 分後に 30 mL/min
ガスセーブ	オン
パージフロー	オン
クライオ	オン
クライオ使用温度	72 °C
障害検出	30 分
タイムアウト検出	10 分間オン
オープン温度	120 °C で 0.5 分保持 40 °C/min で 240 °C まで昇温、 240 °C で 0 分保持 5 °C/min で 280 °C まで昇温、 280 °C で 3.75 分保持
キャリアガス	定流量モード、ヘリウム カラム 1 : 0.8 mL/min カラム 2 : 1.0 mL/min
平均速度	23.498 cm/sec
トランスファーライン	
温度	280 °C
分析時間	15.25 分
MS の条件	
チューニング	atunes.eiex.tune.xml
ゲイン係数	50
取り込みパラメータ	マルチプルリアクションモニタリング (MRM)
コリジョンガス	1.5 mL/min
クエンチガス	2.25 mL/min
溶媒待ち時間	6.0 分
MS 温度	イオン源 300 °C 四重極 150 °C

表 2. MRM のパラメータ

時間セグメント	開始時間	化合物名	ブリークサイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	デュエル (ms)	コリジョンエネルギー (V)
1	10.5	E1	342.0	257.0	150	15
1	10.5	E1	342.0	244.0	150	15

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチを用いた前処理

Trinh 他 (2011) は、1,000 倍の濃度 (1.0 L のサンプル量を 1.0 mL に濃縮) を考慮して、1.0 ng L⁻¹ に近い E1 の MDL を示しました。この評価では、7696A サンプル前処理ワークベンチを使用して 1.0、2.5、5.0、10.0、および 50.0 ng/mL の 5 つのキャリブレーション標準を前処理しました。また、誘導体化にも 7696A サンプル前処理ワークベンチを使用しました。10/10/80 (% v/v) BSTFA+TCMS/無水ピリジン/無水アセトニトリルを乾燥したキャリブレーション標準に加えて 60 °C で 30 分間加熱しました。

結果と考察

7696A サンプル前処理ワークベンチによるサンプル前処理

7696A サンプル前処理ワークベンチによる自動化によってサンプル前処理に必要な分析時間が大幅に短縮され、サンプルエラーが発生する可能性が低減されます。それと同時に、手動の作業で得られる回収率と精度が維持されます。このアプリケーションノートでは、1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) の 3 回繰り返し分析のデータを用いると回収率は 133.37 % となりました。また、5 つのレベルでそれぞれ算出した再現性の平均は、5.162 % RSD (3.32~6.89 の範囲) となりました。表 3 および 4 にこれらの結果を示します。図 1 に、1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) の E1 についての定量および定性用の SRM (Selected Reaction monitoring) クロマトグラムを示します。

表 3. 1.0 ng/mL (1 pg オンカラム) での低いキャリブレーション標準の S/N および回収率 (%)

名前	サンプルの種類	レベル	E1 メソッド 実験濃度	E1 面積	E1 最終濃度	S/N
Std_1_1	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	48.18	1.29	11.20
Std_1_2	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	42.01	0.94	9.00
Std_1_3	キャリブレーション	1	1.0 ng/mL	45.97	1.17	12.40
					% 回収率	113.37

表 4. キャリブレーション標準の %RSD (5 レベル、n = 3 回の繰り返し)

名前	サンプルの種類	レベル	実験濃度	E1 面積	
Std_1_1	キャリブレーション	1	1	48.18	
Std_1_2	キャリブレーション	1	1	42.01	
Std_1_3	キャリブレーション	1	1	45.97	
				% RSD	6.89
Std_2_1	キャリブレーション	2	2.5	65.86	
Std_2_2	キャリブレーション	2	2.5	65.75	
Std_2_3	キャリブレーション	2	2.5	59.74	
				% RSD	5.49
Std_3_1	キャリブレーション	3	5	134.20	
Std_3_2	キャリブレーション	3	5	147.65	
Std_3_3	キャリブレーション	3	5	137.09	
				% RSD	5.07
Std_4_1	キャリブレーション	4	10	184.80	
Std_4_2	キャリブレーション	4	10	167.32	
Std_4_3	キャリブレーション	4	10	173.81	
				% RSD	5.04
Std_6_1	キャリブレーション	5	50	931.48	
Std_6_2	キャリブレーション	5	50	874.49	
Std_6_3	キャリブレーション	5	50	887.74	
				% RSD	3.32

GC/MS/MS 分析

この実験では、1.0~50.0 ng/mL の 5 つの濃度レベルで 3 回繰り返し注入を行いました。図 2 に、合計で 15 回の注入で得られた相関係数 $R^2 = 0.996$ の検量線を示します。

機器の検出下限

Wells 他 (2011) は、サンプルセットが 30 未満の場合、Student の t 分布片側検定を使用して機器の検出下限 (IDL) を推定できると述べています。99 % の信頼度と $n-1$ の自由度の場合、この実験の Students-t テーブル値は 6.965 です。低キャリブレーション標準の 6.965 および 6.89 % RSD を IDL 方程式 (式 1) に代入すると、E1 の IDL の推定値は 0.48 pg オンカラムとなります。この値は、99 % の信頼度と $n = 7$ 回の繰り返しで 0.7 ng L-1 の MDL を測定した Trinh 他 (2011) の結果とよく一致しています。

$$IDL_{\%RSD} = \frac{(6.965 \times 6.89\% \times 1.0 \text{ pg})}{100} = 0.48 \text{ pg}$$

式 1. 1.0 ng/mL キャリブレーション標準の面積 % RSD に基づく IDL の推定値 ($n = 3$)

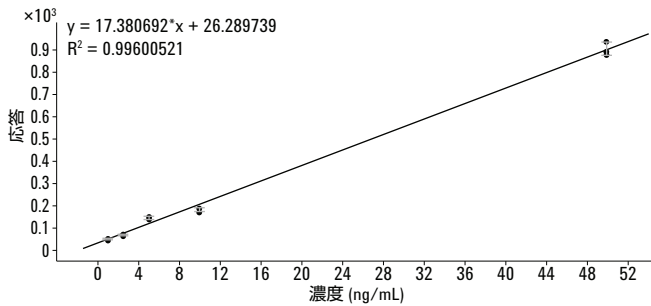


図 2. E1 の検量線: 5 つのレベルにおける 3 回の繰り返し注入

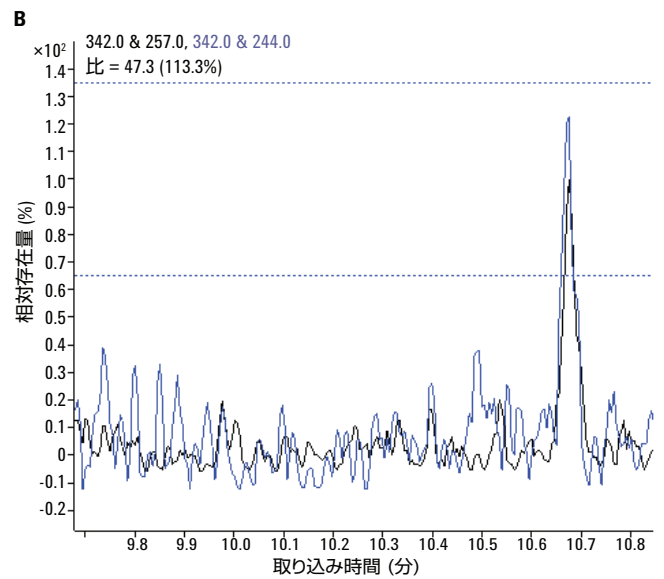
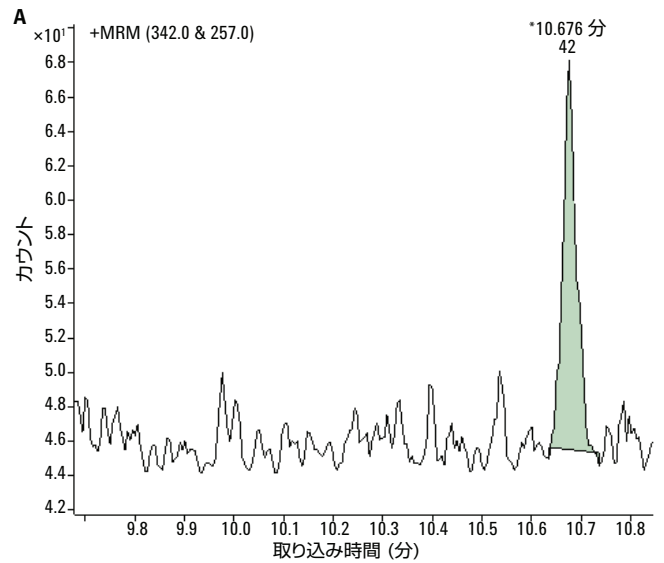


図 1. 1.0 ng/mL の E1 の SRM クロマトグラム。A は定量 SRM 342 → 257 を示し、B は定性トランジション 342 → 244 を示します。B における 2 つの点線はクオリファイア比の許容可能な範囲を示しています。S/N の計算のノイズ領域は 10.4~10.6 分です。

結論

Agilent 7696A サンプル前処理ワークベンチは、誘導体化を含む自動ワークフローによって、エストロゲンやその他の内分泌攪乱物質の分析におけるサンプル、キャリブレーション標準、および QC サンプルを高精度で前処理することが可能です。このアプリケーションノートでは、サンプル誘導体化の自動化を含めた GC トリプル四重極質量分析装置を使用した分析の有効性を説明しています。優れた回収率と精度が検量線の濃度範囲で得られ、論文で報告されている MDL と一致する IDL が算出されました。

参考文献

1. Trinh T., *et al.* "Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry". *J. Chrom A*, 1218 (2011) 1668–1676.
2. Wells G, Prest H, Russ CW. 「シグナルノイズ比は質量分析計の性能指標として合理的か?」. アジレントアプリケーションノート資料番号 5990-8341JAJP. (2011)、アジレント・テクノロジー株式会社

詳細情報

これらのデータは一般的な結果を示したものです。アジレントの製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc., 2013

Printed in Japan

January 9, 2013

5991-1695JAJP



Agilent Technologies