

Agilent Bond Elut PPL を用いた LC/MS/MS による飲料水中の 汚染物質としての医薬品および パーソナルケア製品 (PPCPs) の分析

著者

Xia Yang, Zhicong Wang
Agilent Technologies

概要

このアプリケーションノートでは、オフライン固相抽出 (SPE) Agilent Bond Elut PPL と、それに続く LC/MS/MS を用いて、飲料水中の複数クラスの医薬品およびパーソナルケア製品 (PPCPs) 汚染物質を分析するための高速かつ堅牢なワークフローの開発について説明します。多様な SPE 製品を調査し、このアプリケーションで最高の性能を発揮する製品として Bond Elut PPL SPE を選択しました。さらに PPL メソッドを段階的に最適化しました。2 つの濃度レベルでスパイクした 39 種類の PPCP の平均回収率が 79 % ~ 127 % の範囲であり、RSD が 20 % 未満という定量結果になりました。定量下限 (LOQ) は、0.5 ~ 13 ng/L の範囲でした。

実験方法

材料および試薬

サンプル前処理で使用した試薬と溶媒はすべて HPLC または分析グレードで、LC/MS 分析で使用した試薬と溶媒は LC/MS グレードでした。アセトニトリル (ACN) およびメタノール (MeOH) は Honeywell (マスキゴン、ミシガン州、米国) から購入しました。ギ酸 (FA)、ギ酸アンモニウム、およびアスコルビン酸は、Anpel (上海、中国) から入手しました。リン酸一カリウムは J & K Scientific Ltd. (北京、中国) から購入しました。フッ化アンモニウムとエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩二水和物 (Na₂EDTA) は、Sigma-Aldrich から入手しました。アセトニトリル中の 100 µg/mL のすべてのターゲット標準および内部標準は、Alta (天津、中国) から購入し、-20 °C で保存しました。ペニシリンとセファロスポリン溶液は、安定性のために使用前に 1:1 ACN:水を溶媒として 100 µg/mL で新たに調製しました。

機器および消耗品

- Eppendorf 遠心分離機 5810R (ハンブルグ、ドイツ)
- Agilent Bond Elut PPL、6 mL カートリッジ、500 mg (部品番号 12255001)
- Agilent Bond Elut SPE リザーバー、60 mL (部品番号 12131012)
- 1、3、6 mL Bond Elut カートリッジ用アダプタキャップ、15 個 (部品番号 12131001)
- Agilent Vac Elut 20 マニホールド (部品番号 12234101)

機器条件

LC/MS/MS 検出は、Agilent 1290 Infinity II LC システムで実施しました。このシステムは、Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A) および、Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B) という構成でした。これらの

機器を、Agilent JetStream エレクトロスプレーイオンソースを備えた Agilent トリプル四重極 LC/MS (G6470A) に接続して使用しました。データの取り込みと解析には、Agilent MassHunter ワークステーションソフトウェアを使用しました。表 1 に、LC/MS/MS メソッド条件を示します。表 2 に、MRM トランジションと設定値を示します。

表 1. LC/MS/MS メソッド条件

LC/MS/MS パラメータ	設定		
カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 100 mm、1.8 µm (部品番号 959758-902)		
カラム温度	40 °C		
オートサンブラ温度	10 °C		
注入量	10 µL		
移動相	A) 0.1 % ギ酸を含む 4.5 mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウム水溶液 B) 0.1 % ギ酸を含む 4.5 mM ギ酸アンモニウム、0.5 mM フッ化アンモニウムメタノール溶液		
グラジエント	時間 (分)	%B	流量 (mL/分)
	0	2	0.35
	1	2	
	3	20	
	8	30	
	10	40	
	15	70	
	16	98	
	19	98	
ストップタイム	19 分		
イオン源パラメータ			
ガス温度	300 °C		
ガス流量	10 L/分		
ネプライザ	40 psi		
シースガス温度	350 °C		
シースガス流量	11 L/分		
イオン化モード	ポジティブ		
キャピラリー電圧	+3,500		
ノズル電圧	+500		
時間セグメント			
Agilent 1290 Infinity II バイナリシステム			
スタート時間 (分)	スキャンタイプ	Div バルブ	デルタ EMV (+)
0	DMRM	廃液へ	0
2.8	DMRM	MS へ	400
19	DMRM	廃液へ	0

表 2. ターゲット化合物の MRM 条件

化合物名	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	フラグメンタ	コリジョン エネルギー	セル加速電圧
1,7-ジメチルキサンチン	181.1	124.0	4.7	116	22	4
		69.1			34	
		42.2			46	
4-アセトアミドフェノール- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	155.1	110.9	3.9	93	14	4
		65.0			34	
アセトアミノフェン	152.1	110.1	3.9	111	18	4
		93.1			26	
		65.1			38	
アンピシリン	350	160.0	6.6	113	10	4
		114.0			36	
		106.0			16	
カルバマゼピン	237.1	194.0	13.8	136	22	4
		179.0			42	
		165.0			50	
セフチオフル	524	241.0	11.8	146	6	5
		126.0			40	
		124.7			58	
セファレキシン	348.1	174.1	6.1	116	2	4
		158.2			2	
		106.0			40	
セファレキシン-d5	353.1	158.1	6.1	88	6	4
		111.0			30	
セフラジン	350.1	175.9	7.1	102	17	4
		157.9			8	
		107.8			30	
シノキサシン	263.1	245.1	10.2	85	14	4
		217.1			22	
		189.0			30	
シプロフロキサシン	332.1	314.0	6.9	149	20	4
		288.0			20	
		245.0			40	
シプロフロキサシン-d8	340.2	322.2	6.9	131	26	4
		235.0			46	
クラリスロマイシン	748.5	590.4	15.3	100	18	5
		158.0			30	
		83.1			55	
クロキサシリン	436	277.0	14.6	70	12	4
		160.0			12	
デヒドロニフェジピン	345.1	284.1	14.1	146	30	4
		268.1			30	
ジルチアゼム	415.2	178.0	13.3	141	26	4
		150.0			50	
		109.0			55	
ジフェンヒドラミン	256.2	167.0	12.3	80	14	4
		165.0			54	
		152.0			46	

化合物名	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	フラグメンタ	コリジョン エネルギー	セル加速電圧
エンロフロキサシン	360.2	342.2	7.3	156	20	4
		316.2			16	
		245.1			32	
エリスロマイシン	734.5	576.2	14.3	172	6	5
		157.8			18	
		82.8			54	
エリスロマイシン- ¹³ C-d3	738.5	161.8	14.3	141	30	5
		82.7			58	
フルメキン	262.1	244.1	13.3	108	12	4
		202.0			32	
		126.0			52	
フルオキセチン	310.1	148.1	14.5	106	6	4
		91.0			10	
		44.2			14	
フルオキセチン-d5	315.2	153.1	14.5	83	4	4
		95.0			50	
		44.1			10	
オルメトプリム	275.2	259.1	6.4	90	30	4
		123.1			26	
		81.1			54	
オキサシリン	402.1	243.0	14.2	106	10	4
		160.0			14	
オキシリン酸	262.1	243.9	11.1	114	20	4
		159.9			45	
ペニシリン G	335.1	176.1	13.1	85	2	4
		160.1			2	
ペニシリン G-d7	342.1	183.1	13.1	85	10	4
		160.1			10	
サラフロキサシン	386.1	368.1	8.3	150	20	4
		342.1			20	
		299.1			40	
サラフロキサシン-d8	394.2	376.1	8.3	131	22	4
		350.0			18	
		303.1			30	
スルファセタミド	215	155.9	3.5	80	4	4
		108.0			16	
		92.0			20	
スルファクロロピリダジン	285	156.0	6.7	108	12	4
		108.1			24	
		92.1			24	
スルファジアジン	251.1	156.0	4.1	100	8	4
		108.1			20	
		92.1			28	
スルファジメトキシ	311.1	156.0	10.5	141	16	4
		108.1			28	
		92.1			36	
スルファドキシ	311.1	156.0	7.7	126	16	4
		92.1			32	

化合物名	プリカー サイオン	プロダクト イオン	RT (分)	フラグメンタ	コリジョン エネルギー	セル加速電圧
スルファメラジン	265.1	156.0	4.9	114	12	4
		108.0			20	
		92.1			28	
スルファメータ	281.1	215.1	5.6	150	20	4
		156.0			20	
		108.0			35	
スルファメタジン	279.1	186.1	6.0	116	12	4
		124.0			21	
		92.1			38	
スルファメタジン -d4	283.1	124.0	6.0	103	30	4
		96.0			34	
スルファメチゾール	271	156.0	5.7	112	9	4
		92.0			29	
スルファメトキサゾール	254.1	156.0	6.9	108	12	4
		92.1			24	
スルファメトキサゾール -d4	258.1	160.0	6.9	90	14	4
		96.1			30	
スルファフェナゾール	315.1	158.1	9.7	150	40	4
		92.0			40	
スルファピリジン	250.1	156.0	4.7	150	17	4
		92.0			29	
スルファキノキサリン	301.1	156.0	11.1	118	16	4
		92.0			32	
チアベンダゾール	202	175.0	6.8	130	24	4
		131.0			36	
		65.0			52	
チアベンダゾール -d4	206.1	179.0	6.7	141	30	4
		135.1			42	
トリメトプリム	291.2	261.1	5.5	151	18	4
		230.0			20	
		123.1			24	
トリメトプリム -d3	294.2	230.1	5.5	90	26	4
		123.1			26	
タイロシン	916.5	772.4	14.3	280	30	5
		174.1			40	
		101.0			56	

サンプル前処理

水道水は上海市の水道から収集しました。1 L の水に、30 mg のアスコルビン酸、5.848 g のリン酸一カリウム、0.5 g の Na₂EDTA を加え、完全に溶解するまでよく混合しました。次に水サンプルの一部に、さまざまなレベルの標準溶液と 1 mg/L の内部標準溶液を適宜添加しました。さらに図 1 に示すように、Bond Elut PPL を使用して、SPE 手順に従って水サンプルを抽出しました。

図 2 は、20 ng/L の添加物入り水サンプル中のターゲットの LC/MS/MS MRM クロマトグラムを示したものです。

SPE クリーンアップ: Agilent Bond Elut PPL, 6 cc 500 mg, 125 μm (部品番号 12255001)

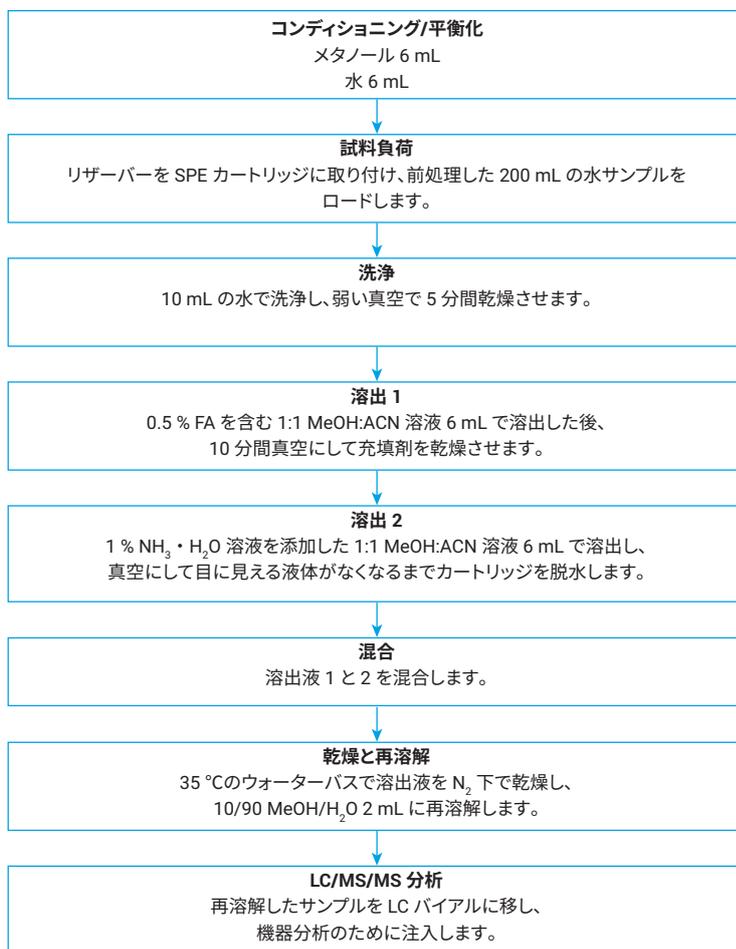


図 1. 水サンプル抽出のための AgilentBond Elut PPL SPE 手順

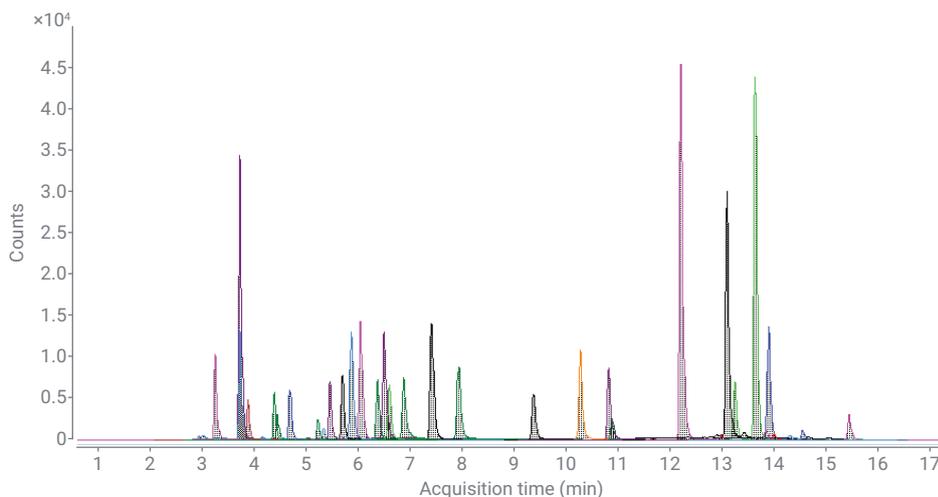


図 2. 20 ng/L の水道水サンプル中のターゲットの LC/MS/MS MRM クロマトグラム

結果と考察

サンプル前処理の最適化

SPE メソッドの最適化には、次の 3 つのパラメータが関連します。SPE 製品の選択、サンプルロード条件、およびターゲット溶出条件です。

SPE 充填剤の選択

50 mL の希釈なしの標準溶液を使用して、市販の 4 つの SPE 製品を評価しました。Agilent Bond Elut Plexa、Agilent Bond Elut ENV、Agilent Bond Elut PPL、他社品 A に、同じロードプロセスを適用しました。サンプルロードプロセスは EPA メソッド 1694¹

を参照し、サンプルを 1 M HCl で pH 2 に調整しました。溶出は 100 % MeOH で実施しましたが、Bond Elut PPL については、マルチクラスターゲット分析に酸性および塩基性の連続溶出を使用するようユーザーガイドで推奨されています。²図 3 の代表的なターゲットの回収結果は、Bond Elut PPL が全体として最高の回収率を達成したことを示しています。エリスロマイシンやペニシリン G などの一部のターゲットでは、抽出に使用する SPE 製品に関係なく、回収率は非常に低い値を示しています。これは、サンプル前処理中の分解に関連している可能性があります。

ロード条件

飲料水中の残留塩素は、一部の抗生物質と反応し、ターゲットの安定性の問題を引き起こすおそれがあります。アスコルビン酸は、水中の抗生物質の分析と安定性に影響を与えることなく、効果的な塩素系反応停止剤になり得ることが報告されています。³そのため、アスコルビン酸を飲料水に添加して塩素を除去し、反応しやすいターゲットを保護しました。EPA メソッド以外にも複数の文献で、抗生物質または PPCP に酸性負荷をかけて、親油性を高めて吸着剤に強力に保持させることを提案しています。⁴ただし、酸性条件では、エリスロマイシンとペニシリン G の回収率が低く、ばらつ

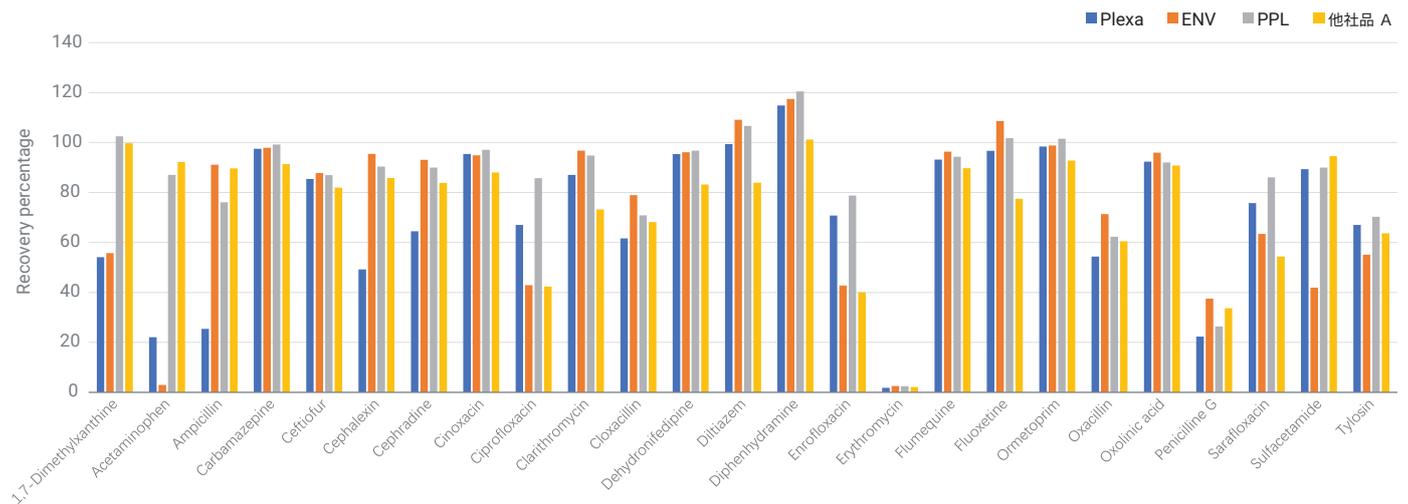


図 3. 代表的なターゲットを抽出するためのさまざまな SPE 製品の比較

きが大きくなり、メソッドが失敗する可能性があります。サンプルロード条件の適用性を検証するために、酸性負荷と中性負荷の両方をテストして比較しました。図 4 の結果は、エリスロマイシンとペニシリン G では、中性負荷条件が酸性負荷条件よりも高い回収率を示したのに対し、残りのターゲットでは、両方の負荷条件で同様の結果が得られたことを示しています。さらに、中性の水および酸性の水 (pH 2) における PPCP の安定性は、LC/MS/MS を使用して 90 分ごとにサンプリングを行って分析対象物の応答をモニタリングすることにより、室温で 12 時間テストしました。図 5 に示すように、酸性サンプル条件では、ペニシリンとマクロライドが大量かつ迅速に分解されました。逆に、これらのターゲットは、中性サンプルで非常に優れた経時的な安定性を示しました。その結果、中性のサンプルロード条件を最終的な SPE メソッドに適用しました。

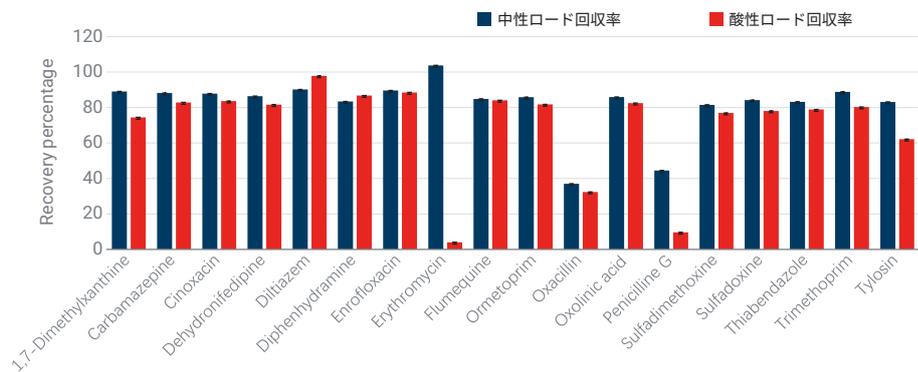


図 4. 代表的な PPCP に関する、中性サンプルロードと酸性サンプルロードの回収率と再現性の比較 (n = 5)

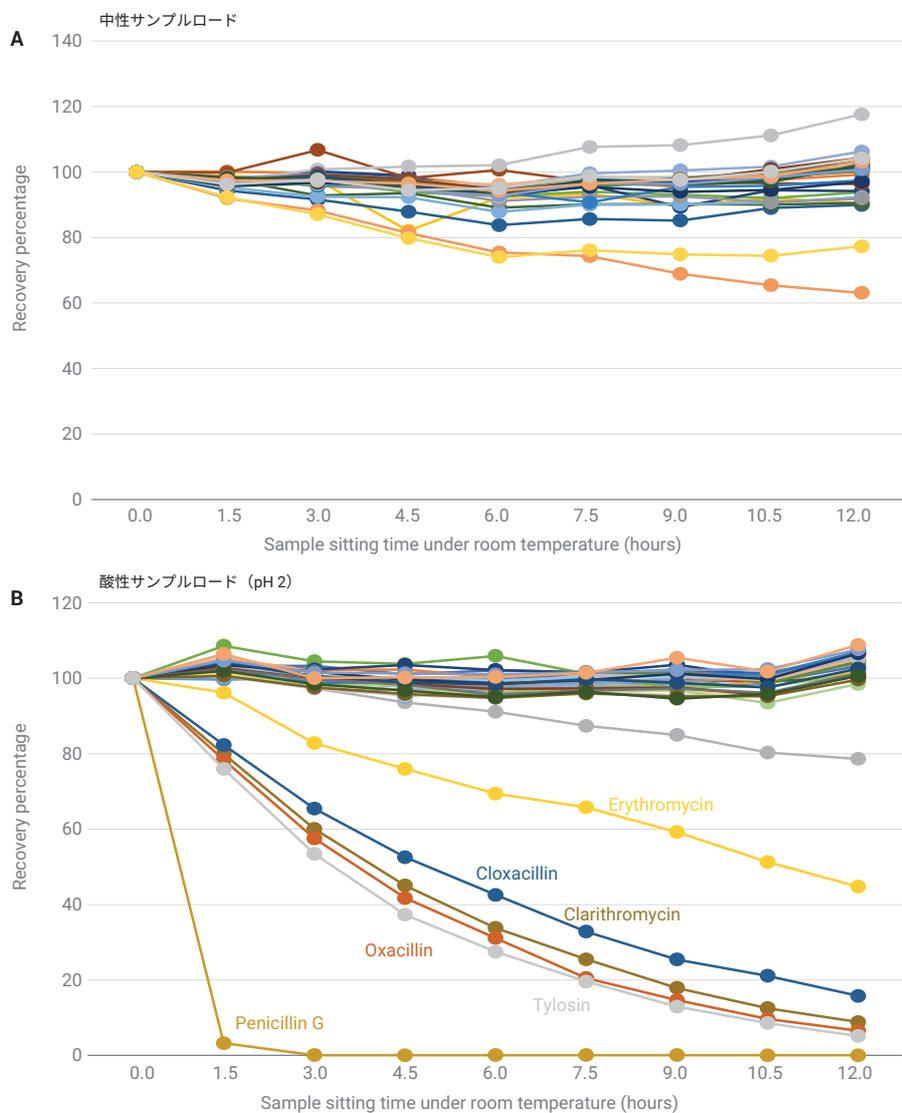


図 5. 中性および酸性 (pH 2) 緩衝液中の PPCP の室温における安定性検討

溶出条件

Bond Elut PPL ガイドライン²で推奨されているように、MeOH による中性溶出は、大半のターゲットに対して良好な回収率を実現する一方で、酸性やアルカリ性の溶媒、または溶媒混合物を使用した酸性溶出や塩基性溶出では、特定の成分の回収率が大幅に向上します。マルチクラスターゲット分析の場合、酸性および塩基性の連続溶出により、最良の包括的な結果が得られます。²したがって、ターゲットの回収率と、酸に不安定な化合物の安定性の両方を考慮しながら、さまざまな溶出条件を評価しました。図 6 に示す結果は、このアプリケーションのすべてのターゲットで許容可能な回収率を達成するためには、酸性-塩基性の連続溶出が必要とされることを裏付けるものです。

メソッドの検証

定量メソッドの検証には、検量線の直線性、定量下限 (LOQ)、分析成分の回収率、低スパイクレベルと高スパイクレベルの両方で精度が含まれます。詳細な定量結果を表 3 に示します。10 以上のキャリブレーション標準を使用して、さまざまなターゲットに応じて 0.05 ng/mL ~ 25、50、または 100 ng/mL のダイナミックレンジで (水サンプル中の 0.5 ~ 1,000 ng/L のスパイクレベル

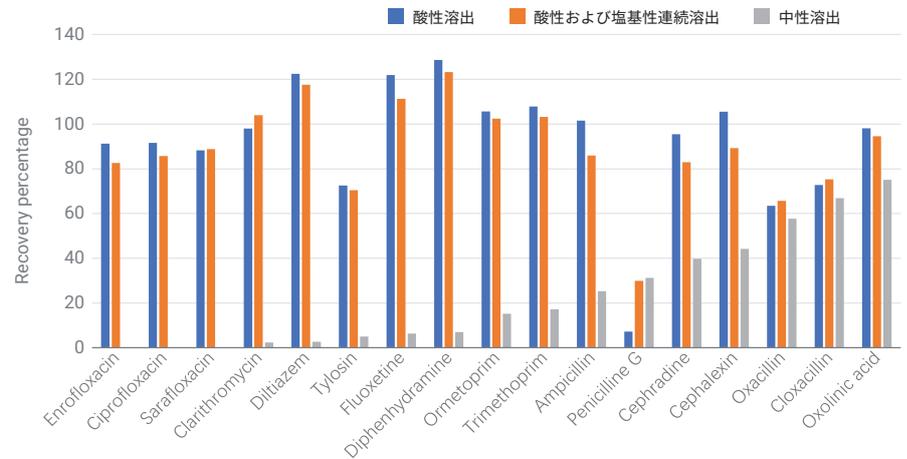


図 6. 代表的な PPCP に対するさまざまなサンプル溶出条件の比較

に対応) 検量線を作成しました。直線回帰と $1/x^2$ 重み付けを使用しました。優れた直線性を持つ検量線が得られ、すべてのターゲットで相関係数 (R^2) > 0.992 でした。5 ng/L の低濃度 QC スパイクレベルを 7 回繰り返して分析しました。メソッド検出限界 (MDL) を標準偏差 (SD) の 3.14 倍と定義し、LOQ の下限を MDL の 4 倍として計算しました。^{5,6}PPCP の LOQ は、飲料水中で 0.5 ~ 13 ng/L の範囲でした。1,7-ジメチルキサンチンが、マトリックスバックグラウンドからの正の

寄与により、低いスパイクレベル (5 ng/L) で高い回収率を示したのを除いて、許容可能な回収率 (79 % ~ 127 %) が達成されました。メソッドの再現性に関しては、両方のスパイクレベルですべての分析成分の RSD が 20 % 未満であることが実証されました。

表 3. LC/MS/MS を使用した飲料水中の 39 種類の PPCP に対するメソッド定量の結果

分析成分	IS	キャリブレーション 範囲 (ng/L)	R ²	LOQ (ng/L)	5 ng/L スパイクレベル (n = 5)		20 ng/L スパイクレベル (n = 5)	
					LQC-Rec%	LQC-RSD	HQC-Rec%	HQC-RSD
1,7-ジメチルキサンテン	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9992	3.1	150	3.3 %	109	1.9 %
アセトアミノフェン	4-アセトアミドフェノール- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	0.5 ~ 1,000	0.9999	1.4	102	2.1 %	107	0.7 %
アンピシリン	ペニシリン G-d7	0.5 ~ 1,000	0.9995	4.6	95	9.1 %	79	4.1 %
カルバマゼピン	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 250	0.9923	0.5	112	0.6 %	109	1.3 %
セフチオフル	4-アセトアミドフェノール- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	0.5 ~ 1,000	0.9996	2.8	90	2.0 %	88	4.1 %
セファレキシム	セファレキシム-d5	0.5 ~ 1,000	0.9997	12.9	103	18.0 %	107	7.4 %
セフラジム	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9995	7.2	104	13.5 %	94	9.1 %
シノキサシン	シプロフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9955	1.8	100	2.6 %	123	2.2 %
シプロフロキサシン	シプロフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9979	2.0	90	3.8 %	103	0.7 %
クラリスロマイシン	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9980	0.9	108	1.1 %	109	3.1 %
クロキサシリン	4-アセトアミドフェノール- ¹³ C ₂ - ¹⁵ N	0.5 ~ 1,000	0.9999	5.2	93	9.7 %	98	2.2 %
デヒドロニフェジピン	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9991	0.7	105	1.2 %	107	1.8 %
ジルチアゼム	シプロフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9988	1.1	104	1.7 %	127	4.3 %
ジフェンヒドラミン	シプロフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9931	0.9	110	1.3 %	118	3.7 %
エンロフロキサシン	シプロフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9990	2.6	114	4.0 %	122	2.8 %
エリスロマイシン	エリスロマイシン- ¹³ C-d3	0.5 ~ 1,000	0.9994	8.6	105	11.4 %	119	2.9 %
フルメキン	エリスロマイシン- ¹³ C-d3	0.5 ~ 250	0.9978	5.2	100	8.5 %	115	1.1 %
フルオキセチン	フルオキセチン-d5	0.5 ~ 1,000	0.9989	0.9	109	1.5 %	111	0.8 %
オルメトプリム	スルファメタジン-d4	0.5 ~ 250	0.9982	1.6	115	2.4 %	116	2.4 %
オキサシリン	ペニシリン G-d7	0.5 ~ 1,000	0.9997	3.6	98	5.4 %	89	2.0 %
オキシリン酸	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 500	0.9981	1.2	113	1.7 %	106	3.2 %
ペニシリン G	ペニシリン G-d7	0.5 ~ 1,000	0.9991	4.1	91	6.9 %	107	1.7 %
サラフロキサシン	サラフロキサシン-d8	0.5 ~ 1,000	0.9993	1.7	98	2.9 %	105	0.7 %
スルファセタミド	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 500	0.9922	1.0	88	1.5 %	87	1.1 %
スルファクロロピリダジン	セファレキシム-d5	0.5 ~ 1,000	0.9983	4.0	96	4.9 %	88	3.4 %
スルファジアジン	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9935	0.7	86	1.2 %	83	1.5 %
スルファジメトキシム	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9958	1.6	98	3.0 %	101	1.8 %
スルファドキシム	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 500	0.9962	2.0	104	2.9 %	104	1.3 %
スルファメラジン	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9951	0.7	99	1.3 %	99	1.6 %
スルファメータ	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9967	2.6	101	4.8 %	104	2.7 %
スルファメタジン	スルファメタジン-d4	0.5 ~ 1,000	0.9941	1.5	100	2.1 %	108	1.2 %
スルファメチゾール	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9996	1.7	86	3.9 %	83	1.7 %
スルファメトキサゾール	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9997	1.7	101	3.1 %	101	1.3 %
スルファフェナゾール	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9971	0.8	102	1.3 %	97	1.6 %
スルファピリジン	スルファメトキサゾール-d4	0.5 ~ 500	0.9948	1.5	100	1.7 %	96	2.6 %
スルファキノキサリン	セファレキシム-d5	0.5 ~ 1,000	0.9995	4.7	94	5.5 %	80	4.2 %
チアベンダゾール	チアベンダゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9952	1.4	106	1.5 %	105	1.8 %
トリメトプリム	トリメトプリム-d3	0.5 ~ 1,000	0.9943	2.2	105	3.1 %	109	1.6 %
タイロシン	チアベンダゾール-d4	0.5 ~ 1,000	0.9988	3.4	92	6.3 %	104	5.5 %

結論

飲料水中の PPCPs の複数クラス多成分残留分析を目的として、Agilent Bond Elut PPL SPE 抽出とそれに続く LC/MS/MS 検出を用いた信頼性の高い分析メソッドを開発しました。開発したメソッドは、LOQ、回収率と精度、キャリブレーション範囲に基づく定量分析について検証しました。このメソッドは、飲料水中の PPCPs を日常的にモニタリングするための堅牢で信頼性の高い方法であることが実証され、環境水分析の伸展につながる可能性があります。

参考文献

1. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS (epa.gov).
2. Agilent Bond Elut PPL. *Agilent Technologies user guide*, publication number 5994-4162EN, **2021**.
3. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T. Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1135-44.
4. Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Rapid Analysis of Multiclass Antibiotic Residues and Some of Their Metabolites in Hospital, Urban Wastewater and River Water by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled To Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr A* **2013**, *1292*, 173–188.
5. 40 CFR Part 136 - GUIDELINES ESTABLISHING TEST PROCEDURES FOR THE ANALYSIS OF POLLUTANTS, Appendix B.
6. Chinese regulation HJ 168-2020.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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。

DE58474833

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, January 3, 2022

5994-4493JAJP