

EPA メソッド 538 : Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いた 水の直接注入による飲料水中の 特定有機汚染物質の測定

アプリケーションノート

環境

著者

Imma Ferrer、Michael Thurman
Center for Environmental
Mass Spectrometry
University of Colorado in Boulder,
Colorado, USA

概要

UHPLC と Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いて、水の直接注入と液体クロマトグラフィ/質量分析/質量分析による飲料水中の 11 種類の特定有機汚染物質に関する米国 EPA (538) の新メソッドを開発しました。この EPA メソッドの利点としては、サンプル前処理の際の固相抽出が不要になる点が挙げられます。そのため、分析時間を半分以上も短縮できます。また、UHPLC の使用により、ランタイムを 3 分の 2 近くも短縮できました。すべての分析対象物で優れた直線性 ($R^2 \geq 0.9999$) が得られ、検出下限は 1~500 ng/L でした。

はじめに

飲料水中の農薬や有機汚染物質は、人体の健康に害を及ぼすおそれがあります。農業および産業で用いられるこれらの化学物質は、汚染の大きな原因になっています。米国環境保護庁 (EPA) は、米国における飲料水品質を確保するために、多くの監視要件を定めています。EPA メソッド 538 は、飲料水中の特定有機汚染物質を測定するために開発および導入されたものです。特定有機汚染物質は、ほとんどが有機リン系農薬です。

EPA メソッド 538 には、水の直接注入および液体クロマトグラフィ/質量分析/質量分析 (LC/MS/MS) が伴います。このメソッドでは、5 つの重水素化内部標準を用いて、11 種類のターゲット化合物の有無を測定します。ターゲット化合物を分離したのち、同じ LC/MS/MS 条件下で分析されたキャリブレーション用標準に照らしてトランジションイオンとリテンションタイムを比較し、同定します。各ターゲット化合物の濃度は、標準手順の後に、内部標準キャリブレーションにより測定します。このメソッドではサンプル抽出が不要なので、他の LC/MS/MS メソッドよりも分析時間が短く、費用も安くなります。



Agilent Technologies

このアプリケーションノートでは、アジレントの開発した EPA メソッド 538 を紹介します。このメソッドは、Agilent 1290 Infinity LC システムと Jet Stream 技術を搭載した Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを使用しています。10 分という UHPLC 分析時間は、オリジナルの EPA メソッド 538 の半分以下で、時間と溶媒コストの削減が可能です。このメソッドでは、すべての分析対象イオンについて確認のための第 2 のトランジションを追加して、微調整を加えています。これにより、質量分析による明確な分析に関する欧州連合 (EU) の規定を満たすことができ、EPA の規定よりもさらに正確な同定が可能になります。地元で採取した水サンプルを用いて、メソッドの有効性を評価しました。

実験手法

試薬と化学物質

すべての標準溶液 (100 µg/mL) は、Accustandards (ニューヘイブン、コネティカット州) から購入しました。重水素化標準は、Cambridge Isotopes (ケンブリッジ、マサチューセッツ州) から入手しました。HPLC グレードのアセトニトリルとメタノールは、Burdick and Jackson (マスキーゴン、ミシガン州) から入手しました。ギ酸は Sigma-Aldrich (セントルイス、ミズーリ州) から入手しました。純メタノールを用いて各原液 (1 µg/mL) を作成し、-18 °C で保管しました。この溶液をアセトニトリルおよび水で希釈し、分析用標準溶液を作成しました。

使用機器

このメソッドでは、100 µL サンプルループを備えた 1290 Infinity LC システムと、Jet Stream 技術を搭載する 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを組み合わせて使用しました。機器条件を表 1 に示しています。

表 1. LC および MS 機器条件

LC 条件	
カラム	Agilent ZORBAX C-18 Eclipse Plus、 2.1 x 50 mm、1.8 µm (p/n 959757-902)
カラム温度	25 °C
注入量	100 µL
移動相	A = アセトニトリル B = 0.1 % 酢酸水
ランタイム	10 分
流速	0.4 mL/min
グラジエント	0 分で 90 % B、1.7 分維持 10 分で 100 % B ヘグラジエント
MS 条件	
シースガス温度	350 °C
シースガス流速	11 L/min
ガス温度	250 °C
脱溶媒和ガス流速	10 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
キャピラリー電圧	4000 V
ノズル電圧	0 V
デルタ EMV	200 V

サンプル前処理

メソッド 538 では、ナトリウムオマジンと酢酸アンモニウムで保存された 40 mL の水サンプルが求められています。950 µL を取り分けてバイアルに入れ、5 つの重水素標識内部標準 50 µL を加えます。サンプルの有機溶媒成分が 5 % を超えないようにします。ベイク処理したアンバーグラスにサンプルを集め、分析まで 4 °C で保管します。分析カラムのつまりを防ぐために、内部標準を加える前に、水サンプルを PFTE フィルター (0.2 µm) に通過させます。その後、サンプルを LC/MS/MS システムに直接注入します。干渉を確認するために、ブランクもフィルターを通過させます。

結果と考察

メソッド 538

表 2 は、EPA メソッド 538 に記載されている 10 種類の有機リン系化合物と、多核芳香族複素環式化合物のキノリンを示しています。この 11 種類の化合物は、飲料水に含まれる重要な汚染物質を代表するものです [1]。同じくメソッドの一部である 5 つの重水素化標準を表 3 に示しています。この EPA メソッドの利点

表 2. 10 種類の有機リン系農薬とキノリンは、EPA メソッド 538 で飲料水汚染物質として測定が求められている化合物です

化合物	化学情報検索サービス機関登録番号 (CASRN)
アセフェート	30560-19-1
アルジカルブ	116-06-3
アルジカルブスルホキシド	1646-87-3
ジクロトホス	141-66-2
ジイソプロピルメチルホスホネート (DIMP)	1445-75-6
フェナミホススルホン	31972-44-8
フェナミホススルホキシド	31972-43-7
メタミドホス	10265-92-6
オキシデメトンメチル	301-12-2
キノリン	91-22-5
チオファノックス	39196-18-4

としては、サンプル前処理の際の固相抽出が (SPE) 不要になる点が挙げられます。そのため、分析時間を半分以上も短縮できます。また、SPE で生じることの多いマトリックス濃縮が生じないため、サンプルマトリックス起因の抑制が軽減されます。サンプルを濃縮すれば検出下限を引き下げることが可能ですが、そうした利点は抑制効果により小さくなることがあります。また、機器感度が高ければ、サンプル濃縮の必要はありません。このメソッドはきわめてシンプルで、内部標準混合物を水サンプルに追加するだけですみます。

表 3. EPA メソッド 538 で用いられる 5 つの重水素化内部標準 [1]

内部標準
アセフェート-d ₆
ジイソプロピルメチルホスホネート-d ₁₄ (DIMP-d ₁₄)
メタミドホス-d ₆
オキシデメトンメチル-d ₆
キノリン-d ₇

検出下限と直線性

EPA メソッド 538 では、化合物 1 つあたり 1 つの MRM トランジションが求められています [1]。ここで紹介するメソッドでは、検出された各化合物の確認イオンを得るために、第 2 のトランジションを追加しています。この修正により、トリプル四重極メソッドを用いた LC/MS/MS による分析に関して、第 2 の確認用トランジションとイオン比率パーセンテージを求める標準分析手順にも対応できます。表 4 は、11 種類の化合物のトランジションとフラグメンテーション、衝突エネルギーを示しています。表 5 は、定量に用いた重水素標識標準のトランジションとフラグメンテーション、衝突エネルギーを示しています。

表 5. EPA メソッド 538 の 5 種類の標識標準に用いたトランジション、フラグメンテーション、衝突エネルギー

化合物	トランジション	フラグメンテーション エネルギー	コリジョン エネルギー
アセフェート-d ₆	190→149	50	0
DIMP-d ₁₄	195→99	70	5
メタミドホス-d ₆	148→97	70	10
オキシデメトンメチル-d ₆	253→175	70	10
キノリン-d ₇	137→81	110	35

表 4. EPA メソッド 538 の 11 種類の標準に用いたトランジション、フラグメンテーション、コリジョンエネルギー

化合物名	プレカーサイオン	プロダクトイオン	ドウェル	フラグメンター (V)	コリジョン エネルギー (V)	極性
アセフェート	206	165	10	90	5	ポジティブ
アセフェート	184	143	10	50	0	ポジティブ
アルジカルブ	213	116	10	90	5	ポジティブ
アルジカルブ	213	89	10	90	15	ポジティブ
アルジカルブスルホキシド	229	166	10	70	5	ポジティブ
アルジカルブスルホキシド	229	109	10	70	10	ポジティブ
ジクロトホス	238	193	10	70	0	ポジティブ
ジクロトホス	238	112	10	70	5	ポジティブ
DIMP	181	139	10	70	0	ポジティブ
DIMP	181	97	10	70	5	ポジティブ
フェナミホススルホン	336	308	10	110	10	ポジティブ
フェナミホススルホン	336	266	10	110	15	ポジティブ
フェナミホススルホキシド	320	292	10	110	10	ポジティブ
フェナミホススルホキシド	320	233	10	110	20	ポジティブ
メタミドホス	142	125	10	70	10	ポジティブ
メタミドホス	142	94	10	70	10	ポジティブ
オキシデメトンメチル	269	191	10	110	5	ポジティブ
オキシデメトンメチル	247	169	10	70	10	ポジティブ
キノリン	130	103	10	110	25	ポジティブ
キノリン	130	77	10	110	35	ポジティブ
チオファノックス	241	184	10	90	5	ポジティブ
チオファノックス	241	57	10	90	15	ポジティブ

EPA メソッド 538 の 11 種類の抽出イオンクロマトグラム (EIC) を図 1 に示しています。ここでは、UHPLC による 10 分の高速度グラジエントを用いています (表 1)。11 種類の化合物が約 6 分で溶出しています。メタミドホス、アセフェート、アルジカルブスルホキシドなどの極性の高い化合物は、クロマトグラムの最初の 1 分で溶出しています。ジイソプロピルメチルホスホネート (DIMP)、アルジカルブ、フェナミホススルホキシド、フェナミホススルホン、チオファノックスなどの疎水性の高い化合物は、クロマトグラムの最後に溶出しています。このグラジエントでは、良好なピーク形状が得られているため、感度と検出下限が向上しています。

11 種類の化合物の検出下限 (LOD) は、もっとも感度の高いアルジカルブスルホキシドの 1 ng/L から、もっとも感度の低いアセフェートの 500 ng/L までの範囲内でした (表 6)。この幅の広い LOD は、各化合物のエレクトロスプレー中におけるイオン形成力を反映しています。アセフェートやメタミドホスなどの極性の高い化合物は感度が低く、フェナミホススルホンやチオファノックスなどの疎水性の高い化合物は感度が高くなっています。11 種類の化合物のうち 9 種類は、表 6 に示すメソッド 538 の LOD よりも低く、同じ 9 種類の化合物の MRL も、表 6 に示す MRL 以下でした。特に、キノリンについては、Jet Stream 技術搭載 Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を使った場合の感度が大幅に高くなりました。これは、キノリンが窒素ヘテロ原子を伴う安定化合物 (PNA) であるためです。これらのことから、このメソッド 538 の修正版は、飲料水中有機リン系農薬に関する高感度メソッドの基準を満たしているといえます。

このメソッド 538 の修正版で用いた第 2 の MRM トランジションは、水サンプル中農薬に関する水質分析に有効なメソッドを実現するうえで重要な要素です。質量分析による明確な同定に関する欧州連合 (EU) の規定では、2 つのトランジションが求められており、この手順が世界中で非公式な標準手順となっています。

表 6. EPA メソッド 538 の検出下限

化合物	添加濃度 (ng/L) ^a	LOD (ng/L) ^b	MRL (ng/L) ^c
アセフェート	500	500	1000
アルジカルブ	5	2	5
アルジカルブスルホキシド	5	1	2
DIMP	10	10	20
ジクロトホス	10	10	20
フェナミホススルホン	5	5	10
フェナミホススルホキシド	5	5	10
メタミドホス	50	50	100
オキシデメトンメチル	5	5	10
キノリン	10	10	20
チオファノックス	5	2	5

a. LOD 測定に用いた添加濃度

b. 検出下限 (シグナル/ノイズ比の 3 倍として算出)

c. メソッドレポート下限 (化合物 1 つあたり 2 つのトランジションを考慮に入れ、シグナル/ノイズ比の 6 倍として算出)

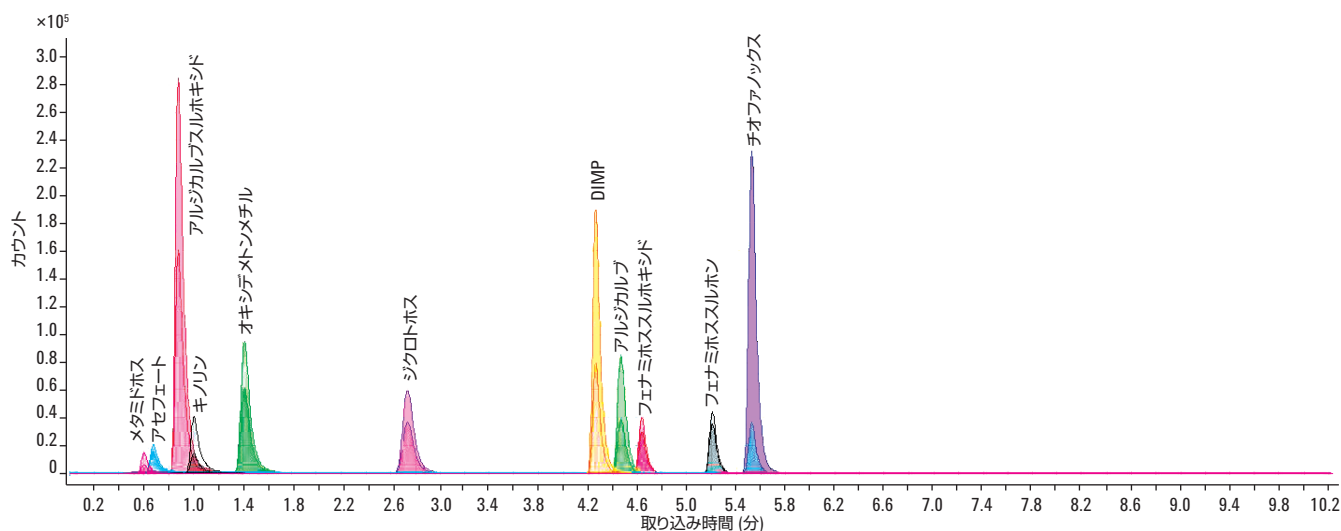


図 1. EPA メソッド 538 で定められた 11 種類の化合物に関する Agilent 1290 Infinity LC システムによる UHPLC 抽出イオンクロマトグラム (EIC)

図 2 は、2つの化合物 (キノリンとフェナミホススルホン) について得られたこの直接注入メソッドの優れた直線性を示しています。実際、 R^2 値はメソッドのすべての化合物で 0.9999 以上でした。

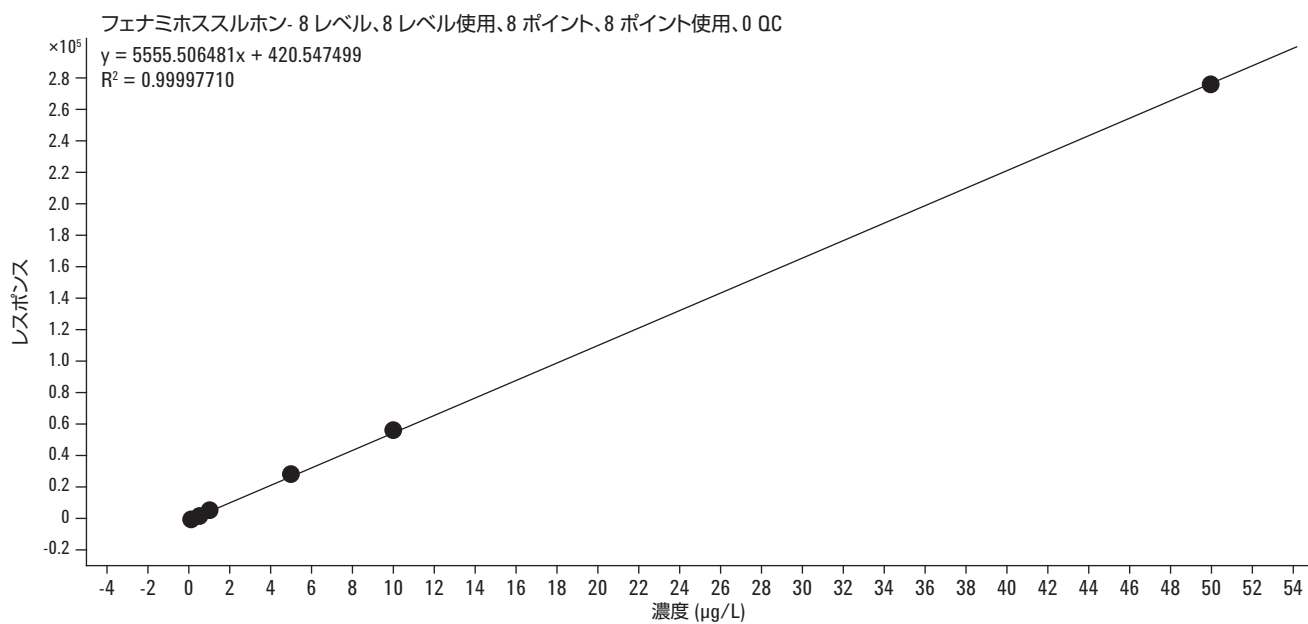
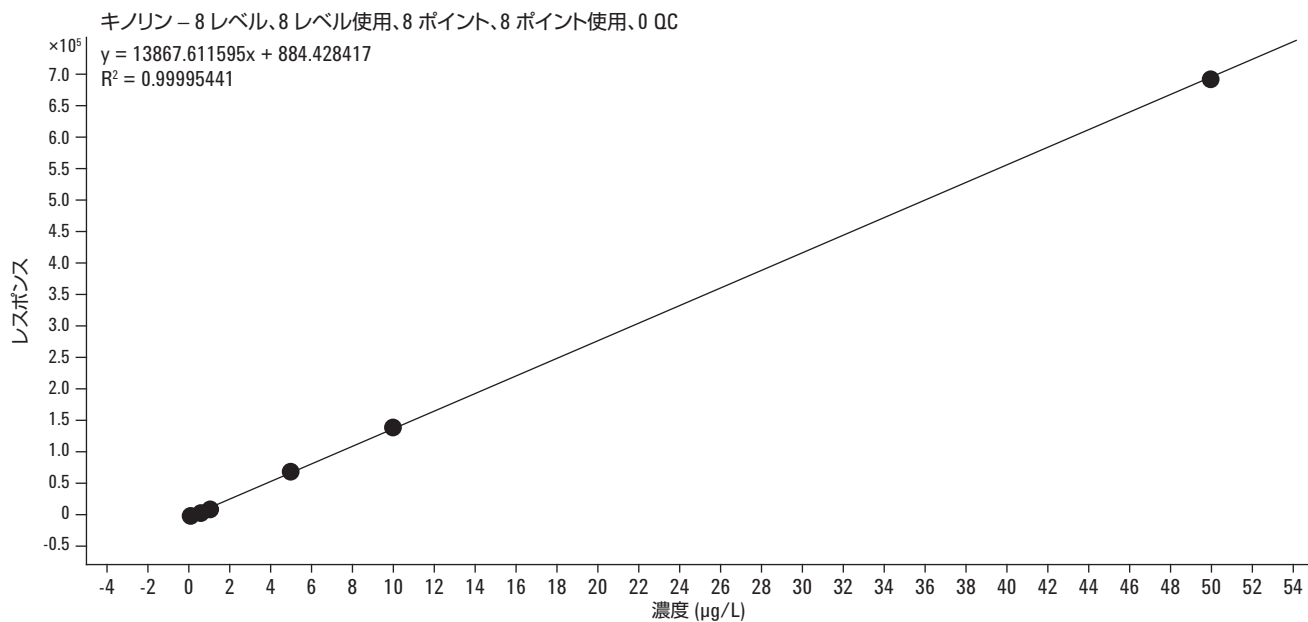


図 2. キノリンとフェナミホススルホンの検量線

飲料水サンプルの分析

河川、貯水池、飲料水源から採取した複数のサンプルを用いて、EPA メソッド 538 を検証しました。このメソッドでは、飲料水処理前の貯水池から採取した 1 つのサンプルで、DIMP のみが検出されました (図 3)。処理済みの飲料水には、検出可能な有機リン系農薬は含まれていませんでした。これらの結果から、このメソッドは、飲料水汚染物質の分析メソッドとして、スピードと感度に加えて、信頼性と有用性も備えているといえます。

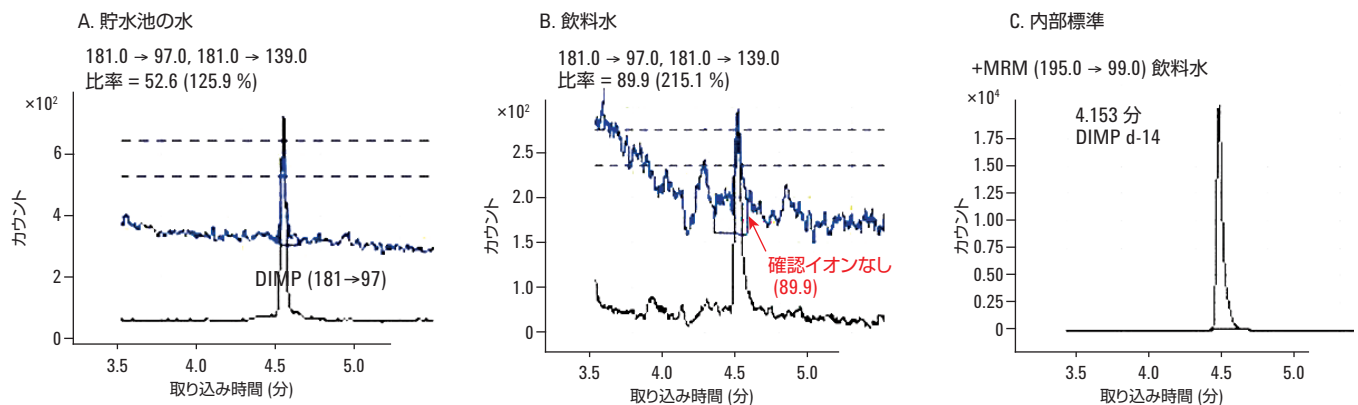


図 3. 修正版のメソッド 538 を用いた処理前の貯水池の水 (A.) および処理済みの水 (B.) の DIMP 分析。DIMP の検出では、定量イオンとして 181→97 トランジション、クオリファイアイオンとして 181→139 トランジションを使用しています。飲料水の分析では、クオリファイア (確認) イオンは存在せず、クオリファイアイオンに対する定量イオンの比率が高すぎました。このことは、飲料水中に DIMP が存在しないことを示しています。重水素化 DIMP 内部標準の分析結果を C に示しています

結論

Agilent 1290 Infinity LC システムと Jet Stream 技術搭載 Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いた EPA メソッド 538 により、分析時間をオリジナルメソッドの 3 分の 1 近くに短縮することが可能です。また、第 2 のトランジションを追加することで、メソッドの信頼性が高まります。検出下限と適合性は、このメソッドの要件を満たしています [1]。

参考文献

1. J.A. Shoemaker, 2009, EPA Method 538: Determination of selected organic constituents in drinking water by direct aqueous injection-liquid chromatography/tandem mass spectrometry, EPA/600/R-09/149, 40p.

詳細情報

本書のデータは一般的な結果を表すものです。アジレント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., 2012

Printed in Japan

January 17, 2012

5990-9670JAJP



Agilent Technologies