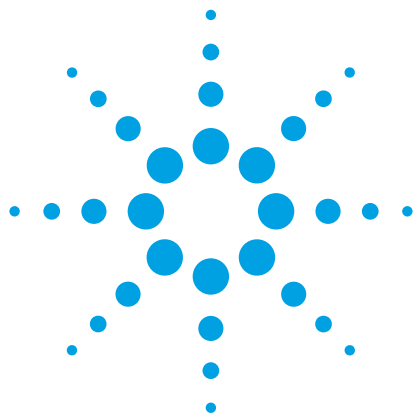




Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いた水サンプル中の 新たな懸念対象となる汚染物質 (CEC) の高感度 HPLC 分析

アプリケーションノート

環境

著者

Tarun Anumol、Sylvain Merel、
Shane Snyder
Department of Chemical and
Environmental Engineering
BI05 Institute
University of Arizona
Tucson, AZ
USA

概要

廃水処理における CEC モニタリングに関して、36 種類の化合物に対応できる高速および高感度メソッドを開発しました。化合物のほとんどで、1 ppb を大きく下回る検出下限と定量下限が得られ、メソッドレポート下限 (MRL) は 0.1~15 ppt の範囲内でした。総サイクル時間は 20 分未満です。



Agilent Technologies

はじめに

水サンプルから、これまでは検出されなかった化学物質が検出されたり、予想とは大きく異なる濃度で検出されたりする事例が相次いでいます [1]。そうした化学物質は、その存在や発生頻度、発生源に関連する人体や環境へのリスクが未知であることから、一般に「新たな懸念対象となる汚染物質 (CEC)」と呼ばれます。米国環境保護庁 (EPA) は、多数の CEC の把握向上に取り組んでいます。特に重点が置かれているのは、医薬品およびパーソナルケア製品 (PPCP)、ペルフルオロ化合物などです。世界中の河川や湖、地下水での CEC の検出頻度が増えていることから、環境や人体への危険性を測定するためには、CEC の現状把握の向上が不可欠です。

一部の CEC は、内分泌かく乱物質として知られています。また、グルココルチコイド活性に影響を与えるものもあります。低用量の CEC に長期間にわたって曝露した場合の相乗的作用については、まだ明らかになっていません。そのため、EPA は規制外汚染物質のモニタリング規則 (UCMR) を制定し、上水道中の CEC の危険性を検証しています。最近の UCMR では、2013 年から 2015 年までに、30 の汚染物質をモニタリングすることが求められています。アセスメントモニタリング、スクリーニング調査、プレスクリーニング試験には、州や研究所、公共水施設が参加する予定になっています [2]。

この包括的なプログラムでは、感度と精度、再現性の高い高速メソッドが求められています。このアプリケーションノートでは、36 種類の CEC を 1 サンプルあたり 20 分未満で検出できる高速および高感度メソッドを紹介します。この UHPLC/MS/MS メソッドは、Agilent 1290 Infinity LC システムと連結した Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムで、ポジティブおよびネガティブエレクトロスプレーイオン化の両方を用いて開発されました。36 種類の化合物のほとんどで、1 ppb と同等か、それを大きく下回る検出下限 (LOD) と定量下限 (LOQ) が得られ、メソッドレポート下限 (MRL) は 0.1~15 ppt の範囲内です。このメソッドを用いて、未処理廃水から塩素除去された放流水までの廃水処理工程全体で、CEC 濃度をモニタリングしました。一部の CEC は、廃水中の初期濃度が 1,000 ng/L (ppt) を上回り、その多くは処理後の水でも濃度が 500 ng/L を超えていました。

実験手法

試薬と標準物質

キャリブレーション標準を Sigma-Aldrich から入手しました。ただし、ペルフルオロヘキサデカン酸 (PFHxDA) は Matrix Scientific から、メプロバメートは Cerilliant (ラウンドロック、テキサス州) から、トリクロサンは Alfa Aesar から入手しました。キャリブレーション標準溶液の作成にあたっては、まず HPLC 農薬グレードのメタノール (Burdick & Jackson) 中で、未希釈から各標準物質の 500 µg/mL 原液を作成しました。その後、すべての標準物質のメタノール溶液を 10 µg/mL として混合したのち、必要な濃度まで希釈して、キャリブレーション溶液と添加溶液を作成しました。標識内部標準を Cambridge Isotope Laboratories から購入しました。ただし、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOA、 $^{13}\text{C}_4$ -PFOS、 $^{13}\text{C}_2$ -PFHxA、 $^{13}\text{C}_4$ -PFBA (Wellington Laboratories)、プリミドン- d_5 および $^{13}\text{C}_6$ -ジクロフェナク (Toronto Research Chemicals)、ゲムフィブロジル- d_6 (C/D/N Isotopes) は除きます (表 1)。すべての溶媒は、入手できる最高純度で、LC/MS 分析に適したものを使用しました。メチルターシャリーブチルエーテル (MTBE)、ギ酸、水酸化アンモニウムを Fisher Scientific から、アセトニトリルを Burdick and Jackson から入手しました。

表 1. 標識内部標準

化合物	化合物
カフェイン- $^{13}\text{C}_3$	PFOA- $^{13}\text{C}_4$
トリメトプリム- d_3	ゲムフィブロジル- d_6
スクラロース- d_6	PFOS- $^{13}\text{C}_4$
プリミドン- d_5	トリクロカルバン- $^{13}\text{C}_6$
スルファメトキサゾール- d_6	PFBA- $^{13}\text{C}_4$
メプロバメート- d_3	イブプロフェン- d_3
フルオキセチン- d_5	ビスフェノール A- $^{13}\text{C}_{12}$
カルバマゼピン- d_{10}	ナプロキセン- $^{13}\text{C}_3$
DEET- d_6	ジクロフェナク- $^{13}\text{C}_6$
トリクロカルバン- $^{13}\text{C}_6$	アトラジン- d_5

使用機器

このメソッドは、Agilent 1290 Infinity LC システムと連結した Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムで、ポジティブおよびネガティブ ESI の両方を用いて開発しました。機器条件を表 2 および 3 にまとめています。

表 2. HPLC および ESI+ MS 機器条件

HPLC 条件		
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 2.1 × 50 mm、粒子サイズ 1.8 μm (p/n 959757-902)	
ガードカラム	Agilent 1290 Infinity インラインフィルター、 0.3 μm SS フリット (p/n 5067-4638)	
カラム温度	30 °C	
注入量	3 μL	
移動相	A = 水 + 0.1 % (v/v) ギ酸 B = アセトニトリル + 0.1 % (v/v) ギ酸	
分析時間	8 分 + ポストタイム 1.45 分	
流速	0.4 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	移動相
	0	5 % B
	1.5	5 % B
	3	20 % B
	4	45 % B
	6.1	65 % B
	7	100 % B
	7.45	5 % B
	ポストタイム： 1.45 分	
MS 条件		
採取パラメータ	ESI モード、ポジティブイオン化、 ダイナミック MRM	
シースガス温度	375 °C	
シースガス流速	11 L/min	
乾燥ガス温度	275 °C	
乾燥ガス流速	11 L/min	
ネブライザ圧力	45 psig	
ノズル電圧	0 V ポジティブ、500 V ネガティブ	
Vcap	4,000 V ポジティブ、3,500 V ネガティブ	
Δ EMV	400 V	

表 3. HPLC および ESI- MS 機器条件

HPLC 条件		
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、 2.1 × 50 mm、1.8 μm (p/n 959757-902)	
ガードカラム	Agilent 1290 Infinity インラインフィルター、 0.3 μm SS フリット (p/n 5067-4638)	
カラム温度	30 °C	
注入量	3 μL	
移動相	A = 水 + 5 mM 酢酸アンモニウム B = (90 % アセトニトリル + 10 % 水) + 5 mM 酢酸アンモニウム	
分析時間	6.4 分 + ポストタイム 1.5 分	
流速	0.4 mL/min	
グラジエント	時間 (分)	移動相
	0	20 % B
	4.5	96 % B
	5	100 % B
	6.3	100 % B
	6.4	20 % B
	ポストタイム : 1.5 分	
MS 条件		
採取パラメータ	ESI モード、ネガティブイオン化、 ダイナミック MRM	
シースガス温度	350 °C	
シースガス流速	11 L/min	
乾燥ガス温度	225 °C	
乾燥ガス流速	10 L/min	
ネブライザ圧力	45 psig	
ノズル電圧	0 V ポジティブ、1,500 V ネガティブ	
Vcap	4,000 V ポジティブ、3,600 V ネガティブ	
Δ EMV	400 V	

サンプル前処理

2つの廃水処理施設で、複数の処理工程の水サンプルを採取しました。各サンプル 1-L に内部標準 50~150 ng/L を添加したのち、親水性親油性 (HLB) SPE カートリッジ 200 mg を用いて抽出しました。サンプル前処理にあたっては、自動 SPE 抽出システムを使用し、メタノール 5 mL と 10/90 (v/v) MTBE 5 mL で溶出しました。

表 4. マルチプルリアクションモニタリング (MRM)
ESI+ 分析パラメータ

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグ メンター 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (V)
カフェイン	195.1	138 ^a	104	16
		110.1 ^b	104	24
カフェイン- ¹³ C ₃	198.1	140	104	16
トリメトプリム	291	261	75	25
		230	75	25
トリメトプリム-d ₃	294	264	75	25
スクラロース+Na	419	239	110	15
		221	110	15
スクラロース-d ₆	425	243	110	15
トリアムシノロン	395.2	375.1	95	4
		225.1	95	12
ブリミドン	219.3	162.1	70	9
		91.1	70	25
ブリミドン-d ₅	224	167	70	9
スルファ メトキサゾール	254	156	80	10
		92	80	30
スルファ メトキサゾール-d ₆	260	162	80	10
メブロパメート	219	158	70	5
		55	70	20
メブロパメート-d ₇	226	165	70	5
ジフェニルヒドラミン	256.2	167.1	60	4
		165.1	60	44
ジルチアゼム	415.2	178	130	24
		150	130	48
ヒドロコルチゾン	363.2	327	130	13
		120.9	130	24

その後、窒素を用いてサンプルを 100 µL まで濃縮し、最終体積が 1 mL になるようにメタノールに再溶解しました。

分析パラメータ

36 種類の分析対象物および内部標準のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジションを表 4 および 5 に示しています。

化合物	プリカーサ イオン	プロダクト イオン	フラグ メンター 電圧 (V)	コリジョン エネルギー (V)
プレドニゾン	359.2	171	95	36
		147.1	95	24
シマジン	202.1	132	72	16
		68.1	72	36
フルオキセチン	310	148	90	5
フルオキセチン-d ₅	315	153	90	5
カルバマゼピン	237	194	120	15
		179	120	35
カルバマゼピン-d ₁₀	247	204	120	15
デキサメタゾン	393.2	373.2	87	4
		355.2	87	5
TCEP	285	222.8	95	10
アトラジン	218	176	140	15
		174	140	15
アトラジン-d ₃	221	179	140	15
DEET	192	119	110	15
		91	110	30
DEET-d ₆	198	119	110	15
テストステロン	289	109	115	25
		97	115	25
ノルエチステロン	299.2	109.1	104	28
		91.1	104	56
TCPP	327	99	72	16
		81	72	70
ノルゲストレル	313.2	91	130	60
		77.1	130	75
ベンゾフェノン	183	105.1	85	10

^a クオンティファイアイオン

^b クオリファイアイオン

結果と考察

メソッド性能

新たな懸念対象となる汚染物質 (CEC) 36 種類 (表 6) の高感度で堅牢な検出を可能にする LC MS/MS メソッドを開発しました。ほとんどの化合物 (表 4 および 5) について、複数のトランジショ

ンと標識内部標準を使用しました。1~2,400 ng/L までの濃度範囲で精度の高い検量線が得られ、直線性の R² 値は 0.99 を上回りました (図 1)。

表 5. マルチプルリアクションモニタリング (MRM) ESI-分析パラメータ

化合物	プレカー イオン	サブロダクト イオン	フラグ 電圧	衝突 エネルギー
PFOA	412.9	368.9 ^a	86	5
		169 ^b	86	5
PFOA- ¹³ C ₄	416.9	371.9	86	5
PFDA	512.9	469	102	5
ゲムフィブロジル	249.2	121	75	6
ゲムフィブロジル-d ₆	255	121	75	6
PFOS	498.9	99	210	50
		80	210	50
PFOS- ¹³ C ₄	502.9	99	210	50
トリクロカルバン	313	160	110	5
		126	110	25
トリクロカルバン- ¹³ C ₆	318.9	159.9	110	5
トリクロサン	289	37	75	5
	287	35	75	5
PFHxDA	813	769	100	10
PFBS	298.8	98.9	133	29
		80	133	45
PFBA	213	169	60	0
PFBA- ¹³ C ₄	217	172	50	5
イブプロフェン	205	161	50	0
イブプロフェン-d ₃	208	164	50	0
ビスフェノール A	227	212	115	11
		133	115	19
ビスフェノール A- ¹³ C ₁₂	239	224	115	11
ナブロキセン	229	170	55	4
		169	55	24
ナブロキセン- ¹³ C ₁ d ₃	233	169	55	24
ジクロフェナク	294	250	75	4
		214	75	16
ジクロフェナク- ¹³ C ₆	316	272.1	75	5

^a クオンティファイアイオン

^b クオリファイアイオン

表 6. ターゲット化合物

化合物	用途
アトラジン	農薬
ベンゾフェノン	UV 阻害剤
ビスフェノール A	可塑剤
カフェイン	刺激剤
カルバマゼピン	抗けいれん薬
DEET	防虫剤
デキサメタゾン	抗炎症薬
ジクロフェナク	抗関節炎薬
ジルチアゼム	抗不整脈薬
ジフェニルヒドラミン	抗ヒスタミン剤
フルオキセチン	抗鬱剤
ゲムフィブロジル	抗コレステロール薬
ヒドロコルチゾン (コルチゾール)	抗炎症薬
イブプロフェン	鎮痛剤
メプロバメート	抗不安薬
ナブロキセン	鎮痛剤
ノルエチステロン	経口避妊薬成分
ノルゲストレル	ホルモン避妊薬
PFBA	ペルフルオロ化合物
PFBS	ペルフルオロ化合物
PFDA	ペルフルオロ化合物
PFHxDA	ペルフルオロ化合物
PFOA	ペルフルオロ化合物
PFOS	ペルフルオロ化合物
プレドニゾン	抗炎症薬
プリミドン	抗けいれん薬
シマジン	除草剤
スクラロース	人工甘味料
スルファメトキサゾール	抗生物質
TCEP	難燃剤
TCPP	難燃剤
テストステロン	男性ホルモン
トリアムシノロン	合成コルチコステロイド
トリクロカーバン	抗生物質
トリクロサン	抗菌剤
トリメトプリム	抗生物質

各ターゲット化合物について、LOD、(LOQ)、(MRL) を測定しました。LOD は、3 回の連続注入においてシグナル/ノイズ比 3 (ピーク高) 以上を最低濃度と定義しました。LOQ は、クオンティファイアおよびクオリファイアトランジションの両方で S/N 10 以上を最低濃度と定義しました。36 種類すべてのターゲット化合物について、両方の値を表 7 に示しています。

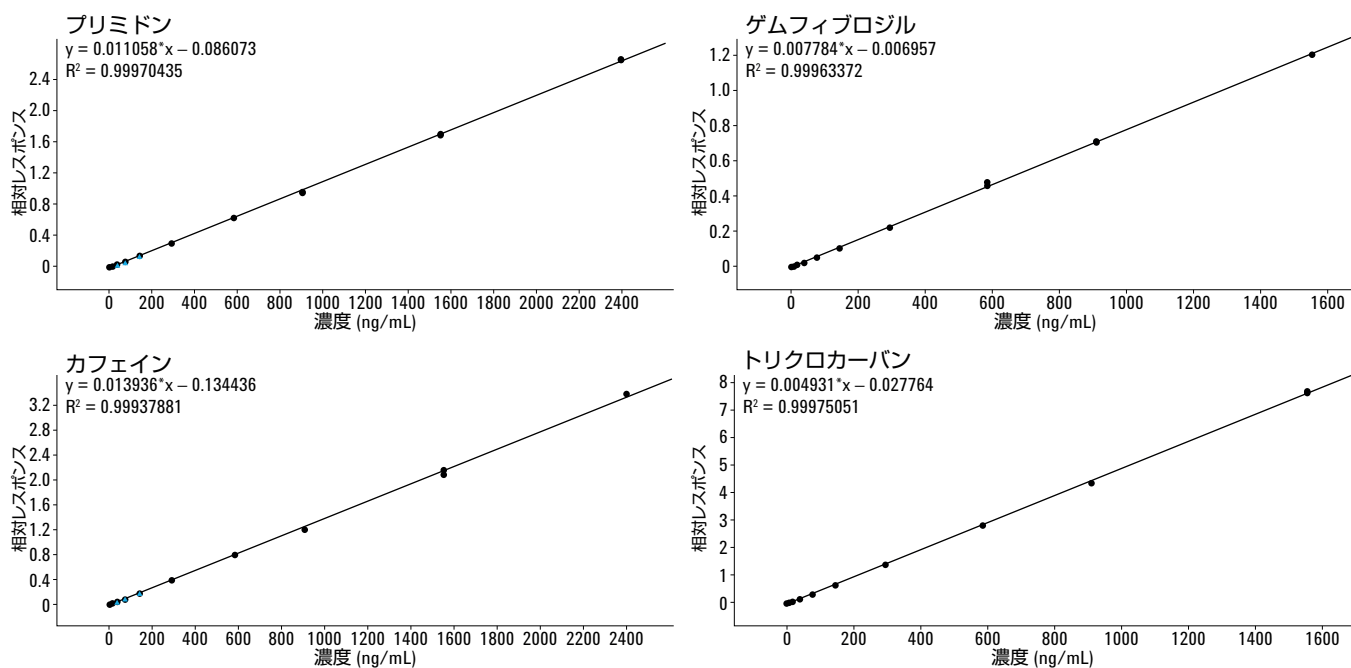


図 1. プリミドン (2.5~2,400 ng/L)、カフェイン (1~2,400)、ゲムフィブロジル (1~1,550 ng/L)、トリクロカーバン (1~1,550 ng/L) の検量線 (2 回重複)。いずれの化合物でも R^2 値は 0.999 を上回っています。

L0Q より 2～3 倍高い濃度で添加した HPLC グレードの水 8 つを用いて、各ターゲット化合物のメソッドレポート下限 (MRL) を測定しました。SPE 手順を用いてサンプルを抽出し、UHPLC に注入しました。その後、標準偏差と信頼度 99 % の T 検定を用いて MRL を算出し、その値の小数第 2 位を四捨五入しました。36 種類のターゲット化合物の MRL を表 7 に示しています。

1 つを除いて、すべての LOD 値が 1 µg/L ppb 以下でした。0.02 µg/L (20 ppt) に達するものもありました。ほとんどの LOQ 値は 5 ppb 以下で、一部は 100 ppt 以下でした。すべての MRL 値は 15 ng/L ppt 以下で、一部は 0.1～0.5 ppt でした。

表 7. 新たな懸念対象となる汚染物質 36 種類の LOD、LOQ、MRL

化合物	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	MRL (ng/L)
ESI ポジティブ分析			
カフェイン	0.5	1	1
トリメトプリム	0.05	0.1	0.1
スクラロース	1	5	7.5
トリアムシノロン	1	5	5
ブリミドン	1	2.5	2.5
スルファメトキサゾール	0.02	1	1
メプロバメート	0.1	1	1
ジフェニルヒドラミン	0.02	0.1	1
ジルチアゼム	0.02	0.1	0.5
ヒドロコルチゾン	0.5	1	1.5
ブレドニゾン	10	20	15
シマジン	0.1	0.5	0.5
フルオキセチン	0.02	0.05	0.5
カルバマゼピン	0.05	0.1	0.25
デキサメタゾン	0.05	0.5	1
TCEP	0.5	1	2.5
アトラジン	0.5	0.5	0.5
DEET	0.05	0.1	1
テストステロン	0.5	1	0.5
ノルエチステロン	0.1	0.5	0.5
TCPP	0.05	1	2.5
ノルゲストレル	0.5	2.5	1
ベンゾフェノン	0.02	0.5	1
ESI ネガティブ分析			
PFOA	0.02	0.5	1
PFDA	0.02	0.5	0.5
ゲムフィブロジル	0.05	0.5	1
PFOS	0.02	0.05	0.1
トリクロカーバン	0.1	0.5	1
トリクロサン	0.5	2.5	5
PFHxDA	0.02	0.1	0.5
PFBS	0.02	0.05	0.5
PFBA	0.02	0.02	NA
イブプロフェン	5	10	15
ビスフェノール A	1	5	15
ナプロキセン	0.1	1	1.5
ジクロフェナク	0.1	0.5	1.5

NA = 分析せず

廃水分析

このメソッドを用いて、アリゾナ州およびカリフォルニア州の2つの廃水処理施設から採取したサンプルを分析しました。各施設で複数の処理工程のサンプルを採取しました。自動 SPE を用いてサンプルを抽出し、メタノールで体積を 1 mL としました。化合物の初期濃度が検量線の範囲を超える場合は、サンプルを希釈して再分析しました。その後、適切な内部標準を用いて、

すべての濃度を補正しました。複数の廃水処理工程のサンプルで測定された 36 種類のターゲット化合物の濃度を、表 8 に示しています。複数の CEC では、廃水中の初期濃度が 1,000 ng/L を上回りました。そのうちの一部は、水処理後でも 500 ng/L を超える濃度を維持していました。

表 8. 複数の廃水処理工程で測定された CEC (ng/L)

化合物	廃水処理施設 1				廃水処理施設 2		
	バースクリーン後	BNROD 後	砂ろ過後	塩素処理後	浄化処理後	活性汚泥後の二次処理水	塩素除去された放流水
ESI ポジティブ分析							
カフェイン	>4,000	22	6	9	>4,000	343	492
トリメトプリム	1,368	30	12	<MRL	1,108	930	847
スクラロース	8,979	8,171	7,573	7,954	>6,000	>6,000	>6000
プリミドン	1,118	617	579	582	197	179	188
トリアムシノロン	14	<MRL	<MRL	<MRL	4	<MRL	<MRL
スルファメトキサゾール	6,078	3,909	3,013	39	2,287	843	1134
メプロバメート	597	421	570	190	1,600	654	482
ジフェニルヒドラミン	<MRL	15	27	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
ジルチアゼム	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ヒドロコルチゾン	NA	NA	NA	NA	<MRL	<MRL	<MRL
ブレドニゾン	59	<MRL	<MRL	<MRL	20	20	18
シマジン	1	3	4	3	<MRL	<MRL	<MRL
カルバマゼピン	578	467	457	262	262	227	229
フルオキセチン	79	38	23	34	155	32	57
デキサメタゾン	94	<MRL	<MRL	<MRL	19	<MRL	<MRL
TCEP	547	332	329	262	775	685	647
アトラジン	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
DEET	2248	193	174	158	3,569	539	630
テストステロン	15	4	3	3	14	1	4
ノルエチステロン	103	1	3	6	<MRL	<MRL	<MRL
TCPP	5,665	3,874	3,408	2,907	1654	2,903	3035
ノルゲストレル	19	6	7	3	18	10	93
ベンゾフェノン	4,541	314	318	219	>4,000	2,318	1708
ESI ネガティブ分析							
PFBA	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
ナプロキセン	>6,000	114	28	6	>6,000	552	297
PFBS	24	9	8	5	17	10	9
ジクロフェナク	834	531	417	14	96	<MRL	<MRL
イブプロフェン	>8,000	50	<MRL	<MRL	>6,000	1,810	1589
PFOA	0	46	49	60	9	7	9
ビスフェノール A	352	20	57	36	635	142	323
ゲムフィブロジル	>6,000	399	234	193	2,747	2,382	2188
PFDA	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
PFOS	464	3	2	4	1,083	200	187
トリクロカルバン	738	201	68	106	334	31	42
トリクロサン	4,642	103	69	15	2,252	441	162
PFHxDA	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL

結論

Agilent 1290 Infinity LC システムと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムを用いて、廃水処理サンプル中の微量 CEC をモニタリングするための高速かつ高感度なメソッドを開発しました。1 サンプルあたり 20 分未満で、低 ppt レベルの 36 種類のターゲット化合物を分析できます。MRM アプローチを用いれば、第 2 トランジションにより、分析結果の多くを確認することができます。また、20 種類の標識内部標準の使用により、定量の精度と正確性が高まります。

参考文献

1. Contaminants of Emerging Concern,
<http://water.epa.gov/scitech/cec/>, accessed
October 3, 2011.
2. Unregulated Contaminant Monitoring Rule 3 (UCMR3),
[http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/ucmr/
ucmr3/index.cfm](http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/ucmr/ucmr3/index.cfm), accessed October 3, 2011.

詳細情報

本書に記載されたデータは代表的なものです。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 the USA

November 6, 2012

5991-1412JAJP



Agilent Technologies