

オンライン SPE-LC/MS/MS システム による水中微量新規汚染物質の分析

アプリケーションノート

環境

著者

Sheher Bano Mohsin and
Michael Woodman
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、水サンプルに微量で含まれる US EPA の汚染物質候補リスト 3 の化学物質の分析において、Agilent Infinity シリーズオンライン SPE ソリューションと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システムの性能を検証しています。このメソッドにより、12 種類の分析が難しい汚染物質について、優れた分析性能が得られました。定量下限 (LOQ) は、すべてのターゲット化合物で 0.1 ppt 未満でした。地下水、湖、洪水調節池から採取した実際のサンプルを分析し、テブコナゾールで優れた分析性能が確認できました。



Agilent Technologies

はじめに

近年、米国全土の飲料水や地表水で、微量の医薬品などの予想外の化学物質が検出されています。こうした新たな懸念対象となる汚染物質 (CEC: Contaminants of Emerging Concern) は、多くの場合きわめて低濃度で存在することから、オフラインの徹底的なサンプル前処理を用いることが不可能なケースが多々あります。

オンライン SPE 法は、オフライン SPE 法と比べていくつかの利点が知られていますが、設定が複雑になることがあります。サンプルローディングおよび分析のために複数のポンプや、複数のポンプからのフローを制御するための複数のバルブが必要です。そのため、オンライン SPE ではコストが増加し、技術的な障壁や、移行に伴う技術的問題が生じます。

このアプリケーションノートでは LC/MS/MS と組み合わせた、オンライン SPE に対応する新たな統合型バルブのシステムを紹介します。ここで紹介するオンライン SPE システムは、単一の FlexCube モジュールに、内蔵型のシングルピストンポンプ、溶媒選択機能、ユーザーによる選択が可能なバルブを統合したものです。手操作によるサンプル前処理をする必要がない、この超微量検出が可能なこのオンライン SPE 用 Flexible Cube ソリューションを使えば、分析の複雑さ、コスト、HPLC システムの設置面積を大幅に低減することができます。

実験手法

装置条件

Agilent 1200 Infinity オンライン SPE ソリューション	モデル番号
Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ、モジュール式デガッサ搭載	G1312B
Agilent 1260 Infinity 標準オートサンブラ	G1329B
Agilent 1290 Infinity Flexible Cube、2-ポジション/10-ポートバルブ搭載	G4227A
Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS システム、Agilent Jet Stream 技術搭載	G6460A
Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント	G1316C

クロマトグラフィ条件 – LC メソッド

パラメータ	設定
分析カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 × 50 mm、1.8 μm
移動相	A = 水 + 0.1 % ギ酸 B = アセトニトリル + 0.1 % ギ酸
分析流量	0.4 mL/min
オート SPE 注入量	900 μL
吸引および排出スピード	1,000 μL/min
直接注入量	90 μL

Agilent 1290 Infinity Flexible Cube

の設定

- バルブ: 2-ポジション/10-ポート Quick-Change バルブ 2 つ
- 溶媒選択バルブ:
溶媒 A1: 3 % MeOH/水、
溶媒 B1: ACN/IPA/MeOH/水

動作原理

図 1 に示す Agilent 1290 Infinity Flexible Cube LC モジュールは、3 溶媒選択バルブを搭載したシングルピストンポンプを備えています。また、2 個まで Quick-Change バルブを設置できます。

図 2 は、オンカラム直接注入またはオンライン SPE に対応するポンプ構成を示しています。左のバルブは、サンプル導入を制御します。オンカラム直接注入の場合は分析カラムに直接導入し、オンライン濃縮の場合は SPE カートリッジのいずれか 1 つに導入します。オンライン SPE の場合、ピストンポンプ (またはフラッシュポンプ) を用いて、オートサンプラから来るサンプルをトラッピングカラムへ送り込みます。また、分析が終わるたびに、最大 3 種類の溶媒でそれらのカラムを洗浄します。オートサンプラはピストンポンプに接続されています。このピストンポンプがサンプルをトラッピングカラムのいずれか 1 つ (SPE1) に直接ロードします。もう 1 つのトラッピングカラム (SPE2) は、分析カラムの前に位置し、バイナリポンプに接続されています。第 1 のトラッピングカラムにサンプルがロードされると、2-ポジション/10-ポートバルブが切り替わり、トラッピングカラムの位置が変化します。トラッピングカラムの位置が切り替わると、バイナリポンプがグラジエントを用いてサンプルをトラッピングカラム (SPE1) から分析カラムへバックフラッシュします。反対側では、前回の分析で用いたトラッピングカラム (SPE2) が洗浄および再平衡化されます。1290 Infinity Flexible Cube の溶媒選択バルブを使えば、トラッピングカラムの洗浄および再平衡化に、最大 3 種類の溶媒を用いることができます [1]。

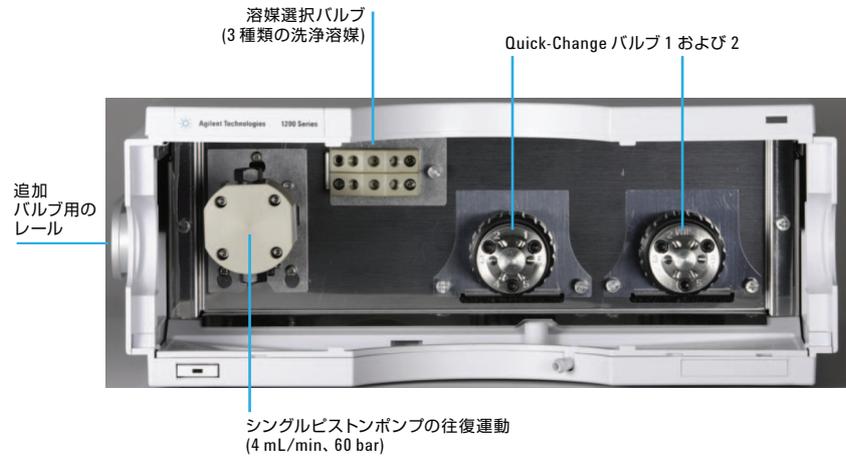


図 1. 内蔵シングルピストンポンプとバルブを備えた Agilent Flexible Cube

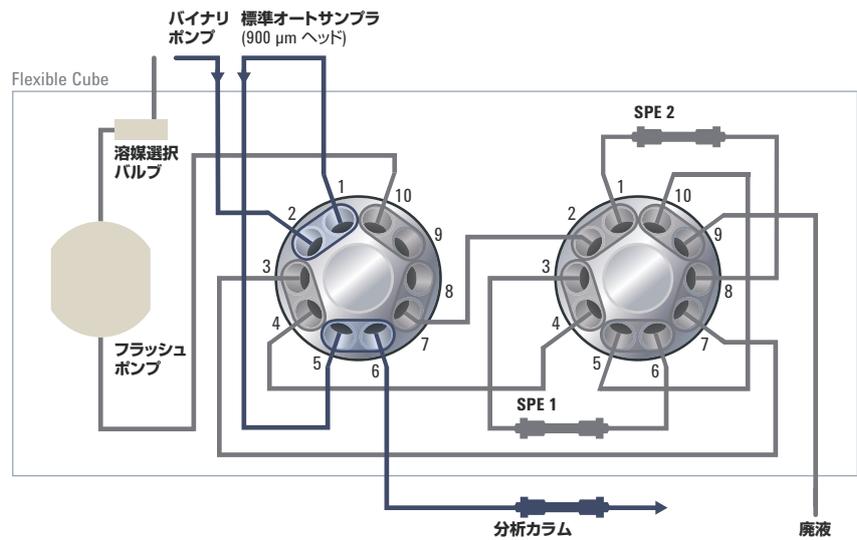


図 2. オンカラム直接注入またはオンライン SPE のポンプ構成。青のフローパスは、分析カラムへの直接サンプル導入を示しています。

図 3A および B は、各分析ステージにおいて 1290 Infinity Flexible Cube を流れるサンプルのフローパスを示しています。図 3A は、分析の開始時点を示しています。ここでは、バイナリポンプにより、サンプルが左のバルブから SPE2 トラッピングカラムを経由し、分析カラムへ送り込まれています (青いフローパス)。同時に、ピストンポンプによりサンプルをオートサンプラからバックフラッシュし、SPE1 を経由して排液に流し、SPE1 を洗浄しています (赤いフローパス)。図 3B は、フローが変化した様子を示しています。分析のこの段階では、バイナリポンプからのフローが SPE1 に流れます。SPE1 は分析カラムの前に位置しています (青いパス)。同時に、ピストンポンプがオートサンプラからサンプルを送り、先ほどとは逆方向で SPE2 に流し、洗浄をおこなっています (赤いパス)。

サンプル

この研究では、米国安全飲料水法 (SDWA: Safe Drinking Water Act) の規制対象となる 12 種類の化合物を分析しました [2]:

- 4,4'-メチレンジアニリン
- 3-ヒドロキシカルボフラン
- ベンスリド
- クレトジム
- フェナミホス
- フェナミホススルホン
- フェナミホススルホキシド
- メソミル
- キノリン
- テブコナゾール
- テブフェノジド
- チオジカルブ

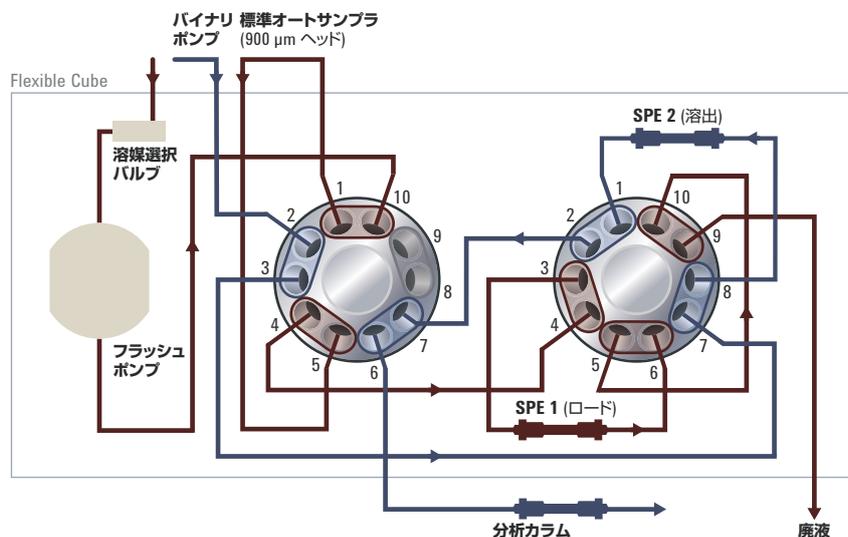


図 3A. SPE トラッピングカラム注入の際のフローパス

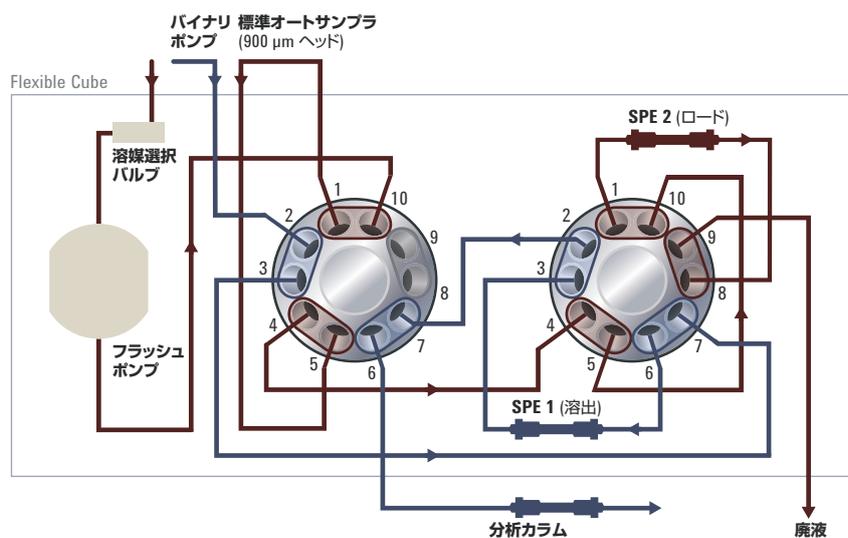


図 3B. SPE トラッピングカラム注入の際のフローパス

表1は、このアプリケーションで用いたダイナミック MRM メソッドパラメータを示しています。各化合物のトランジションに最適なフラグメンター (V)、コリジョンエネルギー (eV) を表示しています。

クロマトグラフィ条件 – MS メソッド

パラメータ	設定
ガス温度	300 °C
ガス流速	10 L/min
ネブライザ	45 psi
ソースガス温度	300 °C
ソースガス流速	11 L
キャピラリ	4,000 ボルト
ノズル	0 ボルト

表1. ダイナミック MRM メソッド条件

化合物名	プレカーサイオン	プロダクトイオン	フラグメンター (V)	CE (V)	セル acc (V)	リテンションタイム (分)	リテンションタイム幅	極性
4-4-ジアミノジフェニルメタン	199.1	106	120	28	3	6.74	1.81	ポジティブ
ベンスリド	398	356	100	1	2	11.06	1.11	ポジティブ
ベンスリド	398	314	100	6	2	11.06	1.11	ポジティブ
ベンスリド	398	158	100	26	2	11.06	1.11	ポジティブ
カルボフラン-3-ヒドロキシ	238.1	181	110	8	2	8.15	0.94	ポジティブ
カルボフラン-3-ヒドロキシ	238.1	163	110	11	2	8.15	0.94	ポジティブ
クレトジム	360.1	206	120	12	4	11.67	1.15	ポジティブ
クレトジム	360.1	166	130	27	4	11.67	1.15	ポジティブ
フェナミホス	304.1	234	150	15	3	10.28	1.03	ポジティブ
フェナミホス	304.1	217	150	23	3	10.28	1.03	ポジティブ
フェナミホス	304.1	202	150	31	3	10.28	1.03	ポジティブ
フェナミホススルホン	336.1	308	130	15	3	9.13	0.91	ポジティブ
フェナミホススルホン	336.1	266	130	18	3	9.13	0.91	ポジティブ
フェナミホススルホン	336.1	188	130	24	3	9.13	0.91	ポジティブ
フェナミホススルホキシド	320.1	292	150	9	3	8.64	0.99	ポジティブ
フェナミホススルホキシド	320.1	233	150	23	3	8.64	0.99	ポジティブ
フェナミホススルホキシド	320.1	171	150	18	3	8.64	0.99	ポジティブ
メソミル	163	107	170	17	2	8.15	1.14	ポジティブ
メソミル	163	95	170	17	2	8.15	1.14	ポジティブ
キノリン	130	103	120	30	3	6.97	1.81	ポジティブ
キノリン	130	77	120	30	3	6.97	1.81	ポジティブ
テブコナゾール	308.1	125	130	42	3	10.49	1.05	ポジティブ
テブコナゾール	308.1	70	130	23	3	10.49	1.05	ポジティブ
テブフェノジド	353.2	297	85	1	3	10.85	1.09	ポジティブ
テブフェノジド	353.2	133	85	15	3	10.85	1.09	ポジティブ
チオジカルブ	355	163	80	2	3	9.17	1.28	ポジティブ
チオジカルブ	355	108	80	14	3	9.17	1.28	ポジティブ
チオジカルブ	355	88	80	17	3	9.17	1.28	ポジティブ

結果と考察

EPA の定義する汚染物質候補リスト (CCL3 : the Third Contaminant Candidate List) のなかから、分析困難とされる 12 種類の汚染物質を選択しました。CCL3 汚染物質は、現時点では飲料水規則の規制対象にはなっていませんが、今後、安全飲料水法 (SDWA) のもとでは規制が求められる可能性があります [2]。

図 4 に、濃度 10 ppt (ng/L) の全 12 化合物とクオンティファイアイオンおよびクオリファイアイオンを含むキャリブレーション標準のクロマトグラムを重ねて表示しています。動作原理で説明した手順に従い、2 つの SPE カートリッジを切り替えて分析をおこないました。このクロマトグラムから、すべてのターゲット化合物で優れた再現性と良好なピーク形状が得られていることがわかります。すべての分析において、QC サンプルの回収率は、12 種類のターゲット化合物のほとんどで許容範囲内でした。

図 5 は、濃度 0.1 ppt の混合サンプルを分析したクロマトグラムを示しています。図からわかるように、化合物間のキャリーオーバーは見られず、シャープで良好なピーク形状が得られています。

図 6 では、濃度 1 ppt および 0.1 ppt の混合サンプルを分析したクロマトグラムを重ねて表示しています。この図から、いずれの濃度でも優れた感度が得られることがわかります。

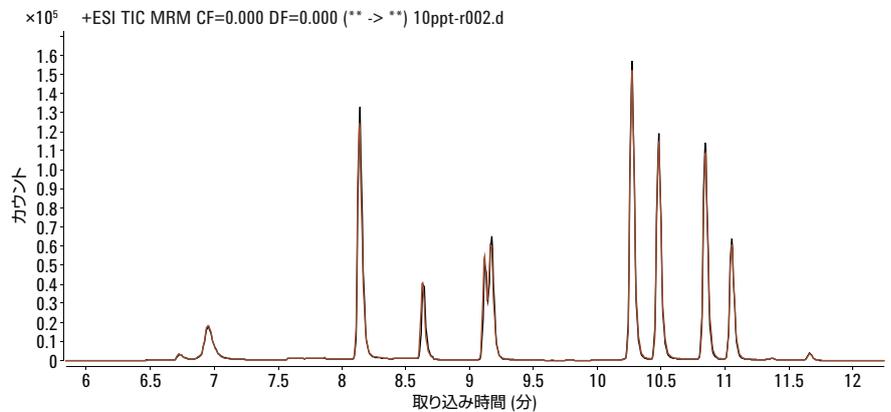


図 4. クロマトグラムの重ね表示により、2 つのカートリッジを用いた 2 回の分析について、リテンションタイムと面積の優れた再現性を示しています

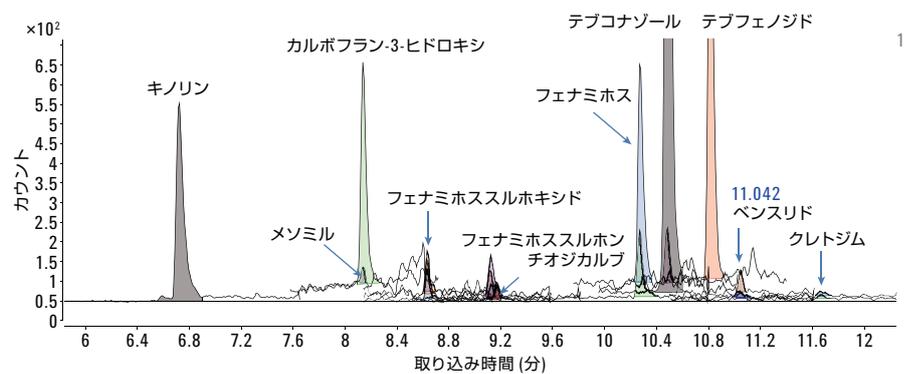


図 5. 濃度 0.1 ppt のサンプル混合物のクロマトグラム

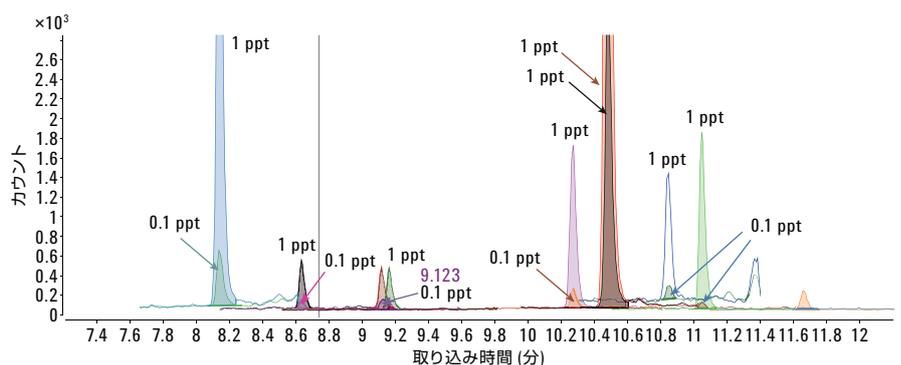


図 6. 濃度 1 ppt および 0.1 ppt のサンプルのクロマトグラムの重ね表示

図7は、m/z 308.1→70.0のクオンティファイアトランジションのクロマトグラムを示しています。これは、濃度0.1、0.5、1.0 pptにおけるターゲット化合物の1つである、テブコナゾールのピークです。この図から、濃度0.1 pptにおけるシグナル/ノイズ比が400:1を上回っていることがわかります。テブコナゾールは米国で芝生管理の際の殺菌剤として広く用いられているため、地下水などの環境分析で一般的に検出される化合物として認識されています。そのため、このアプリケーションにおいては重要なターゲット化合物です。

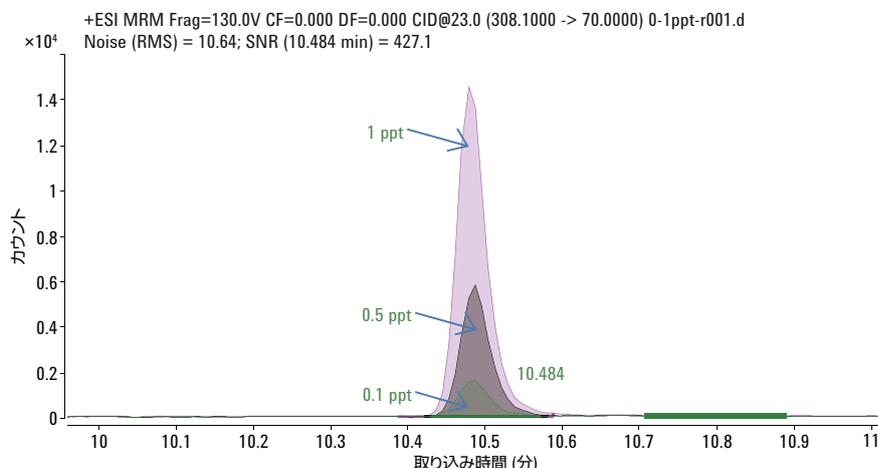


図7. 濃度0.1、0.5、1.0 pptにおけるテブコナゾールのクオンティファイアトランジション m/z 308.1 → 70.0のクロマトグラム

分析した12種類の化合物すべての検量線で優れた直線性が得られました。ほとんどの場合、7レベル検量線の相関係数は0.999を上回りました。重み付けはおこなわず、検量線は原点を通過させました。10レベル検量線の直線係数がもっとも低かったのは、キノリンの0.96でした。

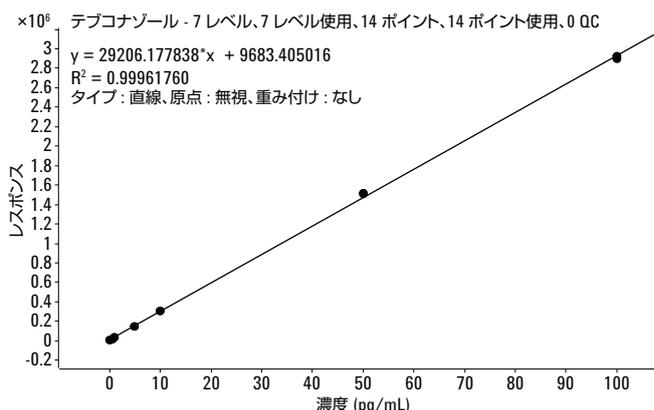


図8. 連続希釈により得られた0.1~100 pptの各溶液をもとにしたテブコナゾールの検量線

図8は、連続希釈で得られた0.1~100 pptの各溶液をもとに作成したテブコナゾールの検量線を示しています。各キャリブレーション標準を900 μLで2回注入し、SPEトラッピングカラムで濃縮しました。検量線の直線性は良好で、R²は0.999を上回りました。

実際の水サンプルとして、湖を水源とする都市水道(水道水)、住宅用井戸(地下水)、郊外の水源(ウェスト湖)、洪水調整池(スプリングクリーク)から試料を採取しました。湖および洪水調整池のサンプルには、視認できる水生生物が含まれていました。これらのサンプルについては、分析に先立ち、0.45-μm ディスクフィルターでろ過しました。分析結果は、クオンティファイアトランジション1つ(308.1→70.0)およびクオリファイアトランジション1つ(308.1→125.0)に関する繰り返し分析の平均にもとづいています。これらのトランジションは、芝生管理の際に殺菌剤として用いられるテブコナゾールに対応しています。ウェスト湖とスプリングクリークはいずれも、近隣の公共ゴルフコースおよびプライベートゴルフコースの排水場所となっています。図9に、この分析で得られたクロマトグラムを示しています。

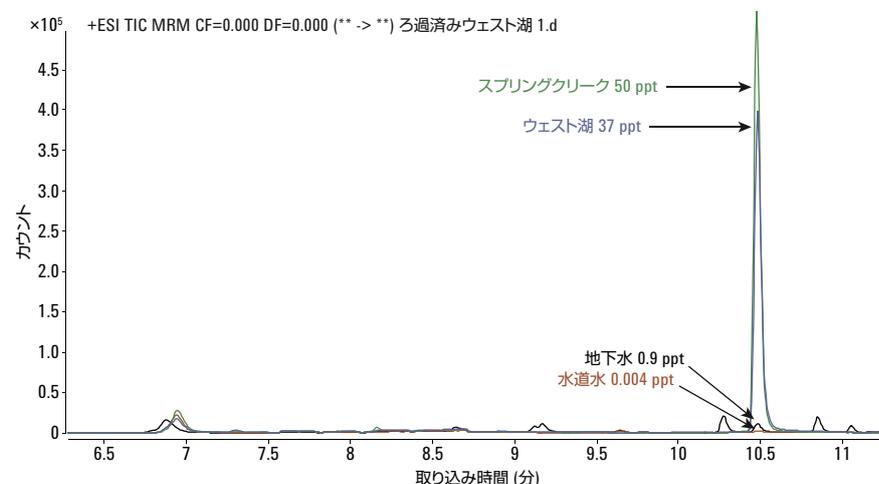


図9. 複数の水源から採取した水サンプルの分析

表 2 に、この分析で用いたすべての化合物に関する性能データをまとめています。0.1 ppt におけるシグナル/ノイズ比 (S/N) の算出値および S/N 約 10:1 における LOQ の推定値を示しています。S/N 算出値はピーク面積にもとづき、ノイズは RMS × 3 として算出しています。このデータは、メソッドの精度と S/N が優れていることを示しています。すべての化合物で、LOQ の推定値は 0.1 ppt 以下で、2 つのターゲット化合物については 0.002 ppt という低さでした。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1200 Infinity シリーズオンライン SPE ソリューションと Agilent 6460 トリプル四重極 LC/MS を組み合わせた、コスト効率の良いオンライン SPE-LC/MS/MS システムを紹介しています。このメソッドには、従来の SPE システムに一般的に伴う技術的障壁や、移行の際の技術的問題を解決しています。Agilent 1290 Infinity Flexible Cube LC モジュールの革新的な統合型パルプシステムを使えば、SPE カートリッジを LC/MS/MS システムに直接連結することが可能です。ダイナミック MRM を用いれば、複雑な混合物を効率的に分析することができます。このメソッドにより、CCL3 汚染物質リストにある 12 の分析困難な化合物を分析したところ、優れた性能が得られました。地下水、湖、洪水調整池などの実際のサンプルの分析において、テブコナゾールが検出され、定量できました。

参考文献

1. B. Schuhn, E. Naegle, T. Glauner, "Detection of Trace-Level Herbicides in Drinking, Surface, and Ground Water Using the Agilent Infinity series Online SPE Solution", Agilent Technologies Application Note 2013, Publication Number 5991-2405EN.
2. J. Shoemaker, D. Tettenhorst, "Evaluation of On-line Solid Phase Extraction -LC/MS/MS for the Analysis of Chemicals on U.S. EPA's Contaminant Candidate List 3".

表 2. 本研究で用いた全化合物の性能データ

化合物名	濃度 (ppt)	シグナル/ノイズ比 (S/N)	S/N 10:1 における推定 LOQ
4-4-ジアミノジフェニルメタン	0.1	25	0.04
ベンスリド	0.1	10.3	0.1
カルボフラン-3-ヒドロキシ	0.1	34.4	0.03
クレトジム	0.1	7	0.15
フェナミホス	0.1	301.2	0.005
フェナミホススルホン	0.1	7.9	0.15
フェナミホススルホキシド	0.1	8.2	0.15
メソミル	0.1	8.3	0.15
キノリン*	0.1	500	0.002
テブコナゾール	0.1	427	0.0025
テブフェノジド	0.1	9.4	0.15
チオジカルブ	0.1	9	0.15

*分解できないキャリアオーバーのために不確定

www.agilent.com/chem/jp

本資料記載の情報は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2013
Published in Japan, July 9, 2013
5991-2731JAJP



Agilent Technologies