



Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS と Mass Profiler ソフトウェアを用いた河川水の環境プロファイリング

アプリケーションノート

環境

著者

Dr. Christian Zwiener
University of Tübingen
Tübingen, Germany

Tiffany Payne
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, California

概要

環境中の新たな汚染物質検出と同定の必要が高まるにつれ、精密質量 LC/MS 分析と統計解析ソフトウェアの併用による綿密なデータ解析を導入した環境スクリーニングという新たなアプローチが求められています。ここで紹介するメソッドでは、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS と Agilent Mass Profiler ソフトウェアを用いて、下水処理場の上流および下流から採取した河川水サンプルを分析・解析しています。下流サンプルと上流サンプルにおける汚染物質の比較を行うことにより、汚染の発生状況が明らかになりました。検出された汚染物質は、下流河川水サンプルデータから抽出され、精密質量データベースおよびライブラリを用いて同定しました。最終的に、下流サンプルからは 890 の化合物が検出され、21 種類を同定しました。

はじめに

環境中の新たな汚染物質に対する懸念が、世界中の環境科学者や一般市民のあいだで高まっています。農薬、除草剤、医薬品、腐食防止剤、難燃剤などは、地表水や地下水、飲料水にとって脅威となる汚染物質です。また、水界生態系や公衆衛生にも悪影響を及ぼします^{1,2}。しかし、水サンプルに起因する細胞の酸化的ストレスのうち、既知の汚染物質の影響と関連づけられるのは、0.1% 未満です³。こうした事実から、さらなるスクリーニングアプローチが求められています。

質量分析による環境中の既知汚染物質の検出および定量は、十分に確立および活用されていますが、このテクニックでは想定外の汚染物質を検出することはできません。このニーズに対応可能な、高分解能な精密質量分析およびケモメトリック化学計量統計解析を用いた、ノンターゲットアプローチに対応できる新ツールおよびテクニックが開発されています。



Agilent Technologies

ここで紹介するアプローチでは、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS システム、Agilent Mass Profiler ソフトウェア (統計解析ソフト)、Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェア (定性解析) を用いて、河川水サンプルの未知汚染物質の分析、抽出、同定をおこないました。

実験方法

ドイツのアマー川にある下水処理場の上流と下流からサンプルを採取しました。採取した水は固相抽出 (HLB および ENBV+) により 500 倍濃縮しました。

分離は、Agilent 1260 Infinity バイナリポンプ (G4220A)、Agilent 1260 Infinity 高性能オートサンブラ (G4226A)、Agilent 1260 Infinity カラムコンパートメント (G1316C) を搭載する Agilent 1260 Infinity HPLC システムを使用しました。

Agilent 6550 iFunnel Q-TOF は、MassHunter Acquisition B.05.01 を 2 GHz 拡張ダイナミックモードで使用しました。採取レートは MS モードで 1 スキャン/秒、MS/MS モードで 3 スキャン/秒としました。ターゲット MS/MS 設定では、ターゲット質量リストと最適なコリジョンエネルギーを用いました。

実験パラメータ

UHPLC カラム	Phenomenex Synergi Polar-RP, 150 × 3 mm, 4 μm, 35 °C	
移動相	A) 水 + 0.1 % ギ酸 B) メタノール + 0.1 % ギ酸	
グラジエントプログラム	分	% B
	0	5
	1	5
	10	95
	17	95
ストップタイム	17 分	
流量	0.3 mL/min	

結果と考察

MassHunter Qualitative Analysis の Molecular Feature Extractor (MFE) アルゴリズムを用いて、データを解析しました。MFE は、LC/MS の全データから、設定された基準値に照らし合わせ、分析対象物質の抽出クロマトグラムを作成します。抽出されたクロマトグラムはフィーチャーと呼び、MS、RT、面積値を含む数値データとして、統計解析に用います。

下水処理場の下流で採取し、3 回抽出した水サンプルでは、1564 フィーチャーが検出されました。1043 フィーチャーは下流サンプルに特徴的なもので、下水処理場の排水が地表の河川水の水質に大きな影響を与えていることが示されました。リテンションタイムおよび質量データの調整、ブランク減算、3 つのレプリケートすべてでの発生率により、データの絞り込みをおこないました。下水処理場排水に起因する 1043 フィーチャーをさらに解析し、同定を試みました。分析対象フィーチャーの精密質量を用いて、Molecular Formula Generator (MFG) ソフトウェアにより計算をおこない、分子式候補を導出したのち、同位体パターン、同位体スペーシ

ング、割り当てられた分子式の理論上の精密質量と実際に得られたフィーチャーの精密質量との差から導き出されるスコアを用いて、精度を評価しました。たとえば、 m/z 264.1967 については、質量差のスコアが 94.5、同位体パターンのスコアが 99.7、同位体スペーシングのスコアが 99.4 で、総計して 97.1 のスコアで $C_{16}H_{25}NO_2$ と同定されました。5 ppm の質量精度で元素 C、H、N、O、S、P、Cl を用いて、全部で 894 の分子式を、測定した精密質量に割り当てることができました。

データベース検索による下流水サンプル中の主なフィーチャーの予備推定においては、水界系環境に関連する 450 以上の汚染物質を含む Agilent 社製データベースで 18 ヒット、Agilent パーソナル化合物データベース (法医学/トキシコロジー) で 144 ヒット、Agilent 農薬パーソナル化合物データベースで 26 ヒットが得られました。関連化合物を選択し、さらなる分析と同定をおこないました。選択した化合物を化合物リストにまとめました。このリストでは、さらなる Q-TOF LC/MS 測定の際に、プレカーションが自動的に MS/MS 分析用リスト (MS/MS インクルードリスト) へ送られます。

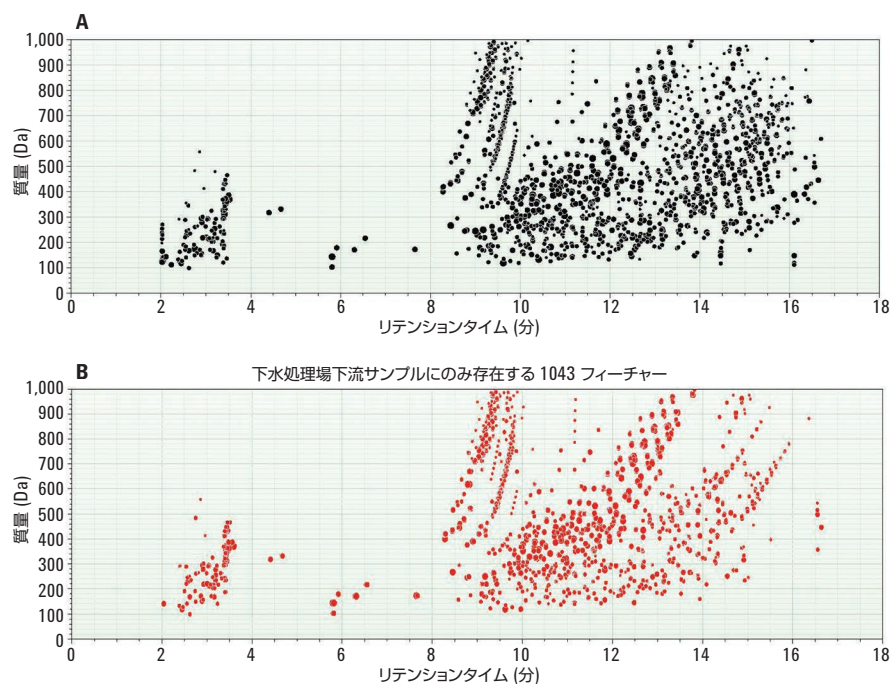


図 1. MFE により抽出された下水処理場下流の河川水サンプルのフィーチャー。
A) すべてのフィーチャー、B) 下水処理場のインプットに特徴的なフィーチャー。

その後、得られた精密 MS/MS データを Agilent パーソナル化合物データベース (法医学/トキシコロジー) およびライブラリで同定をおこないました。図 2 は、抗痙攣および精神安定剤のカルバマゼピンが同定された例を示しています。得られた質量スペクトルとライブラリの質量スペクトルが一致しています。この結果は、精密質量フラグメンテーション情報を含む包括的な質量スペクトルライブラリの有用性を示しています⁴。

精密質量データベースやライブラリでヒットしなかった化合物については、ChemSpider や PubChem といったパブリック化学データベースで分子式を検索しました。この検索により、数百の構造候補がヒットしました。各分子式の候補を絞り込み、ランクづけするために、Agilent Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアを用いて、コンピュータによるフラグメンテーション解析をおこないました。入力データは、分子式と、未知化合物について測定した精密質量 MS/MS データです。データを入力する

と、MSC ソフトウェアが総和分子式をもとに ChemSpider 検索をおこない、算出した質量フラグメントと測定した質量フラグメントの一致度をもとに、ポジティブヒットのランクづけをします。イオパミドールの例 (図 3) でわかるように、MSC で高いラン

クのついたヒットが、もっとも可能性の高い化学構造として選択されます。最終的な同定は、標準試料により確認する必要があります。

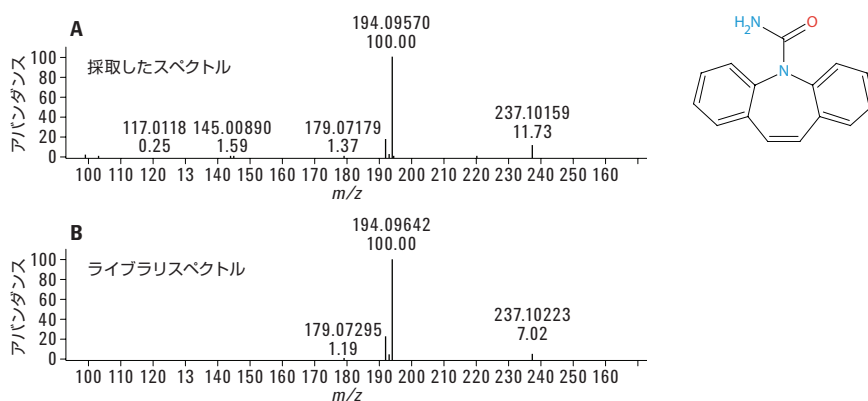


図 2. 下流水サンプルで検出された薬剤カルバマゼピンの構造、採取スペクトル (A)、ライブラリススペクトル (B)。

m/z	intensity	nom. mass	formula	d(Mpm)
404.9930	588.42	100.00	C19H14N2O5	2.9
404.9930	559.42	100.00	C19H16N2O5	-3.7
391.9189	105.32	17.60	C7H9NO7	-0.5
391.9189	105.32	17.60	C8H7N3O6	-4.6
391.9189	105.32	17.60	C10H11N3O4	7.6
374.9819	96.25	14.41	C10H14NO7	-2.4

図 3. プレカリーサイオンおよびプロダクトイオンの精密質量、Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェア、ChemSpider を用いたイオパミドールの同定。

結論

下水処理場の上流と下流で採取した河川水サンプルを、Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS および Agilent MassHunter 統計解析および定性分析ソフトウェアにより分析しました。ノンターゲットスクリーニングメソッドにより、890 を超える未知化合物が検出されました。精密質量データベースを用いて分析対象化合物を同定したところ、150 の汚染物質候補が得られました。ライブラリ検索を用いた MS/MS 分析により 21 の汚染物質を帰属し、標準試料を用いた確認によりさらに 32 の汚染物質を同定しました。データベースやライブラリに含まれていない化合物については、コンピュータによるフラグメンテーションと ChemSpider 検索しました。Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS と解析ソフトウェア (統計解析および定性分析) は新たな環境汚染物質の検出と同定に有効で、新たなスクリーニングアプローチを実現できます。さらにこの分析結果を利用すれば、精密質量データベースおよびライブラリに収録されている化合物数を拡大し、さらなる研究に役立てることが可能です。

参考文献

1. M. Gust, *et al.* "Effects of Short-Term Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Different Pharmaceutical Mixtures on the Immune Response of the Pond Snail *Lymnaea Stagnalis*" *Science of the Total Environment* 445–446(0): 210-218 (2013).
2. R.H.Triebskorn, *et al.* "Ultrastructural Effects of Pharmaceuticals (Carbamazepine, Clofibric Acid, Metoprolol, Diclofenac) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Common Carp (*Cyprinus Carpio*)" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4): 1405-1416 (2007).
3. B.I.Escher, *et al.* "Most Oxidative Stress Response in Water Samples Comes from Unknown Chemicals: The Need for Effect-Based Water Quality Trigger Values" *Environmental Science & Technology* (2013).
4. M. Zedda and C. Zwiener "Is Nontarget Screening of Emerging Contaminants by Lc-Hrms Successful? A Plea for Compound Libraries and Computer Tools." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(9): 2493-2502 (2012).

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., 2014
Published in Japan, February 27, 2014
5991-3967JAJP



Agilent Technologies