

Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムによる 飲料水中 sub ng/L レベルの 内分泌かく乱化学物質の測定

アプリケーションノート

著者

László Tölgyesi
Agilent Technologies Sales and Services
GmbH & Co. KG, Chemical Analysis
Group,
Hewlett-Packard-Str.8, 76337
Waldbronn, Germany

Dan-Hui Dorothy Yang, Bernhard Wuest,
and Anabel Fandino
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd,
Santa Clara, CA 95051-7201,
USA

概要

このアプリケーションノートでは、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (DMRM) および高速極性 (ポジティブ/ネガティブ) 切り替えモードで動作する新しい Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムを使用して飲料水中の低濃度 (ng/L) の内分泌かく乱化学物質 (EDC: Endocrine-Disrupting Chemicals) を高い精度、真度、堅牢性で測定する方法について説明します。固相抽出 (SPE) メソッドによる手間と時間がかかるサンプル濃縮の代わりに、この LC/MS システムの高い感度を利用し、水道水サンプルの大容量ダイレクト注入を使用することで分析を簡素化しました。



Agilent Technologies

はじめに

水相系における EDC の存在に対し、水環境の汚染と人の健康影響への関連から、懸念が高まっています¹。人や動物が排泄した EDC は、人の排泄物や農業廃水への直接的な排出を経由して地下水に入り、廃水処理プラントに到達します。さまざまな処理プロセス (酸化や活性炭など) でこれらの EDC を除去しないと、飲料水系が汚染されることがあります。高い濃度の EDC は内分泌系に干渉し、生物またはその子孫に健康被害を引き起こすことがあります。エストロゲンとアンドロゲンは魚の雌性化と雄性化を引き起こすため、近年ではこれら双方の化合物が大きな注目を集めています²。

都市水道の EDC のレベルは複数の政府機関により ppt レベルまで規制されています (EPA メソッド 539、EPA メソッド 1698)^{3, 4}。このように低濃度 (ng/L または pg/L) であるために分析上では大きな問題が生じます。汎用型のトリプル四重極 LC/MS システムを用いて検出を行う場合は、固相抽出 (SPE) または液液抽出 (LLE) を使用します。多くの場合、サンプル濃縮が必要で、大量の溶媒消費や手間のかかる手順が必要とされます⁵。

このアプリケーションノートでは、以前のアプリケーションノートに対する改良点を説明し、6495 トリプル四重極 LC/MS の感度向上を利用した分析ワークフローの合理化を示します⁵。トリプル四重極 LC/MS システムにいくつかの変更が行われ、分析性能が向上しました。改良点として、新しいフロントエンドイオン光学系によるプリカーサイオン透過率の向上、新たに設計されたカーブおよびテーパードコリジョンセルによる MS/MS スペクトル信

頼性の向上、20 kV までのダイノード加速電圧で動作する新しいイオン検出器、新しいチューンアルゴリズムによる速度および感度の向上などがあります。さらに、6495 トリプル四重極 LC/MS システムでは定評ある Agilent JetStream イオンソースをデュアルステージイオンファネルおよびヘキサボアキャピラリーと組み合わせることで、より効率の高いイオン生成とサンプリングを実現しています。感度の向上によって水サンプルを大量に注入できるようになり、ng/L 未満の検出下限 (LOD) の要件を満たすためのサンプル濃縮が不要になります。

実験方法

試薬および薬品

試薬および溶媒は、すべて HPLC-MS または分析グレードのものを用いました。メタ

ノールおよびアセトニトリルは Honeywell から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak) を備えた Milli-Q Integral システムで生成しました。フッ化アンモニウムは Fluka から購入し (338869-25 g)、ここから適切な量のフッ化アンモニウムを Milli-Q 水に溶解して 5 M の原液を調製しました。1 つの混合標準に標的ホルモンが次の濃度で含まれる EPA 539 キャリブレーション標準原液を RESTEK から購入しました: アンドロステンジオン (99.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、エキリン (200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、17- β -エストラジオール (250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、エストリオール (E3) (200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、エストロン (E1) (200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、17- α -エチニルエストラジオール (EE) (351.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、テストステロン (100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。これらのホルモンの化学構造を図 1 に示します。

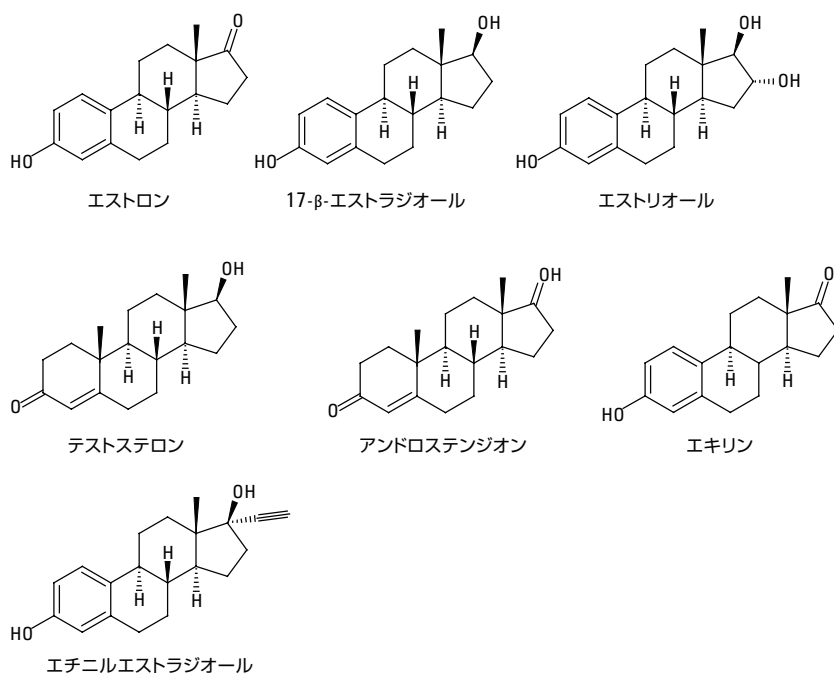


図 1. ホルモンの構造

希釈

EPA 539 キャリブレーション標準原液を使用し、メタノール:水 (1:1 v/v) 溶液で実用標準溶液を調製しました。

実用標準溶液の化合物濃度は次のとおりです。

- アンドロステジオン: 10 ng/mL
- エキリン: 20 ng/mL
- 17-β-エストラジオール (E2): 25 ng/mL
- エストリオール (E3): 20 ng/mL
- エストロン (E1): 20 ng/mL
- 17-α-エチニルエストラジオール (EE): 35 ng/mL
- テストステロン: 10 ng/mL

実用標準溶液を使用して、表 1 に詳細に示したキャリブレーション系列を水道水で調製しました (供給元: 米国、カリフォルニア州、サンタクララ)。

使用機器

クロマトグラフによる分離を、Agilent 1260 バイナリポンプ (G1312B)、Agilent 1260 Infinity 標準オートサンブラ (900 μL ループを備えた G1329B)、サンプル冷却器 (G1330B)、Agilent 1290 Infinity カラムコンパートメント (G1316C) で構成される Agilent HPLC システムで行いました。HPLC システムを Agilent G6495 トリプル四重極 LC/MS システムに結合しました。

トリプル四重極 LC/MS システム (バージョン B 07.00) 用の Agilent MassHunter データ取り込みをデータ取り込み処理に、Agilent MassHunter 定性 (バージョン B 06.00) および Agilent MassHunter 定量ソフトウェア (バージョン B 07.00) をデータ処理に使用しました。

メソッド

溶媒 A として 0.4 mM フッ化アンモニウムを、溶媒 B としてメタノール:アセトニトリル (1:1、v/v) を用いたバイナリグラジエントメソッドを使用しました。Agilent Poroshell Phenyl Hexyl 2.1×100 mm、2.7 μm カラム (p/n 695775-912) を流量 0.4 mL/min で使用しました。グラジエントの詳細を表 2 に示します。カラム温度を 40 °C に保持し、900 μL の注入量を使用しました (吸引/排出速度: 1,000 μL/min、バイアルでのニードル洗浄: 100 % メタノール)。MS パラメータと化合物固有の取り込み設定を表 3 お

よび 4 にそれぞれ示します。ダイナミック MRM 取り込みモードではサイクル時間を 500 ms に調整し、最小および最大デュエルタイムは 34.1 および 249.1 ms でした。

測定対象であるホルモン化合物の MRM トランジションと関連するコリジョンエネルギーは、MassHunter Optimizer ソフトウェアを使用し、フロー注入分析によりポジティブおよびネガティブモードで自動的に測定されました。イオン源パラメータは、MassHunter ソース最適化ツールを使用して最適化しました。

表 1. 水道水 (カリフォルニア州、サンタクララ) で調製したキャリブレーション系列

レベル	テストステロン (ng/L)	アンドロステジオン (ng/L)	エキリン (ng/L)	E3 (ng/L)	E1 (ng/L)	EE (ng/L)	E2 (ng/L)
6	10	10	20	20	20	35.1	25
5	5	5	10	10	10	17.55	12.5
4	1	1	2	2	2	3.51	2.5
3	0.5	0.5	1	1	1	1.76	1.25
2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.7	0.5
1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.35	0.25

表 2. グラジエントの表

時間 (分)	% B
0.0	1
4.2	1
5.5	35
12.0	95
12.1	1
ストップタイム	16
ポストタイム	6

表 3. MS パラメータ - ポジティブおよびネガティブ極性

パラメータ	値
ガス温度	210 °C
ガス流速	15 L/min
ネブライザ	45 psi
シースガス温度	375 °C
シースガス流速	12 L/min
キャピラリ電圧	3,500/4,000 ± V
ノズル電圧	0/0 ± V
デルタ EMV	250/250 ± V
HP RF 電圧	190/190 ± V
LP RF 電圧	80/100 ± V

結果と考察

メソッド性能の向上

6495 トリプル四重極 LC/MS の設計の拡張により、イオン透過率が大幅に向上したことがわかりました。さらに、この検出器設計は、特にネガティブイオンで信号ゲインを提供します。図 2 に、6495 トリプル四重極 LC/MS での 0.25 ng エストロンの応答を示します。6490 機器と比較したときの応答の増加は、この実験で調べた 7 種類のホルモンで 2~5 倍になりました。

装置検出下限 (IDL) および 定量下限 (LLOQ)

IDL は、特定の信頼度でバックグラウンドノイズから統計的に区別できる信号を生成するために必要な分析対象物の最小量を指します。このアプローチは、化学的ノイズの変動と、シグナル/ノイズ比 (S/N) のさまざま決定方法に関連する不明確性の回避に役立ちます。機器の感度と、飲料水中のホルモンを ppt 未満のレベルで検出可能かどうかをテストするために、表 1 に従い、実用標準溶液を使用して標的化合物を水道水で希釈しました。

IDL の計算式について次に説明します。ここで t は、 $n-1$ の自由度における 99 % (1- α) の信頼度に対応し (n = 繰り返し注入の回数、この場合は 8)、RSD % は、 n 回の繰り返し注入での測定量におけるシグナル強度の相対標準偏差 (精度) です⁶。

$$IDL_{LCMS} = t \cdot SD = t \cdot \left(\frac{RSD\%}{100} \right) \cdot amount_measured$$

表 4. ターゲット化合物の DMRM パラメータ

化合物名	プリカーサイオン	MS1 分解能	プロダクトイオン	MS2 分解能	RT	RT ウィンドウ	CE (V)	CAV (V)	極性
17- α -エチニル エストラジオール	295.2	ワイドスト	145	ワイド	12.4	1	47	2	-
17- α -エチニル エストラジオール	295.2	ワイドスト	159	ワイド			43	2	-
17- β -エストラ ジオール	271.2	ワイドスト	183	ユニット	12.2	1	47	2	-
17- β -エストラ ジオール	271.2	ワイドスト	145	ユニット			51	2	-
アンドロステ ンジオン	287.2	ユニット	108.9	ユニット	12.7	1	26	2	+
アンドロステ ンジオン	287.2	ユニット	96.9	ユニット			24	2	+
エキリン	267.1	ユニット	265.1	ユニット	12.5	1	28	4	-
エキリン	267.1	ユニット	143.1	ユニット			42	2	-
エストリオール	287.2	ワイドスト	171.2	ワイドスト	10.8	1	44	2	-
エストリオール	287.2	ワイドスト	145	ワイドスト			50	2	-
エストロン	269.2	ユニット	145	ユニット	12.7	1	43	2	-
エストロン	269.2	ユニット	143	ユニット			61	2	-
テストステ ロン	289.2	ユニット	108.9	ユニット	12.4	1	28	2	+
テストステ ロン	289.2	ユニット	96.9	ユニット			22	2	+

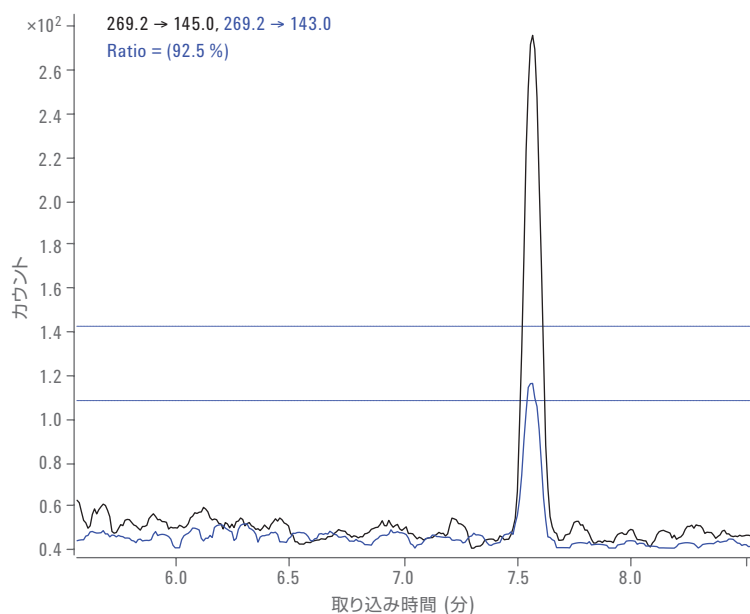


図 2. Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムのシグナル強度 (カラム上に 0.25 pg のエストロン)

表 5 に、RSD % と IDL に加えて計算を行ったスパイク濃度を示します。

図 3 に、メソッドの分離効率を示すために、標的化合物 (クオンティファイヤおよびクオリファイヤトランジション) の MRM クロマトグラムを重ねて表示します。

クオンティファイヤ (ピーク間)、面積 RSD % < 20、および 80~120 % の真度値について LLOQ 値を計算しました (S/N > 10)。観察された LLOQ 値は、0.1~1.75 ng/L の IDL 値 (データは示していない) と優れた相関関係を示しました。

表 5. 計算した IDL および RSD % 値

化合物名	濃度 (ng/L)	RSD%	IDL (ng/L)
17- α -エチニルエストラジオール	1.8	14.8	0.78
17- β -エストラジオール	0.5	13.5	0.20
アンドロステンジオン	0.2	4.3	0.03
エキリン	0.2	3.7	0.02
エストリオール	1.0	5.6	0.17
エストロン	0.2	7.2	0.04
テストステロン	0.1	10.3	0.03

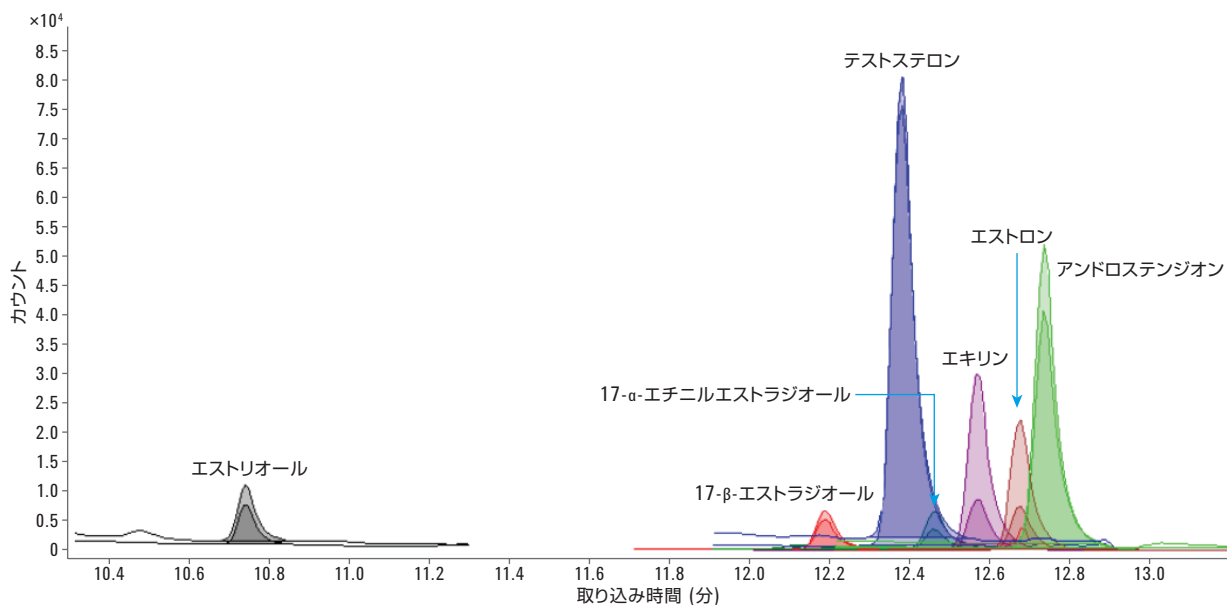


図 3. メソッドの分離効率を説明するために重ねて表示した 7 種類のすべてのホルモンを含むキャリブレーション標準 5 のクロマトグラム (クオンティファイヤおよびクオリファイヤトランジション)。

LL0Qレベルでの、またはそれに近いクロマトグラムを7つのすべてのホルモンについて図4に示しました。

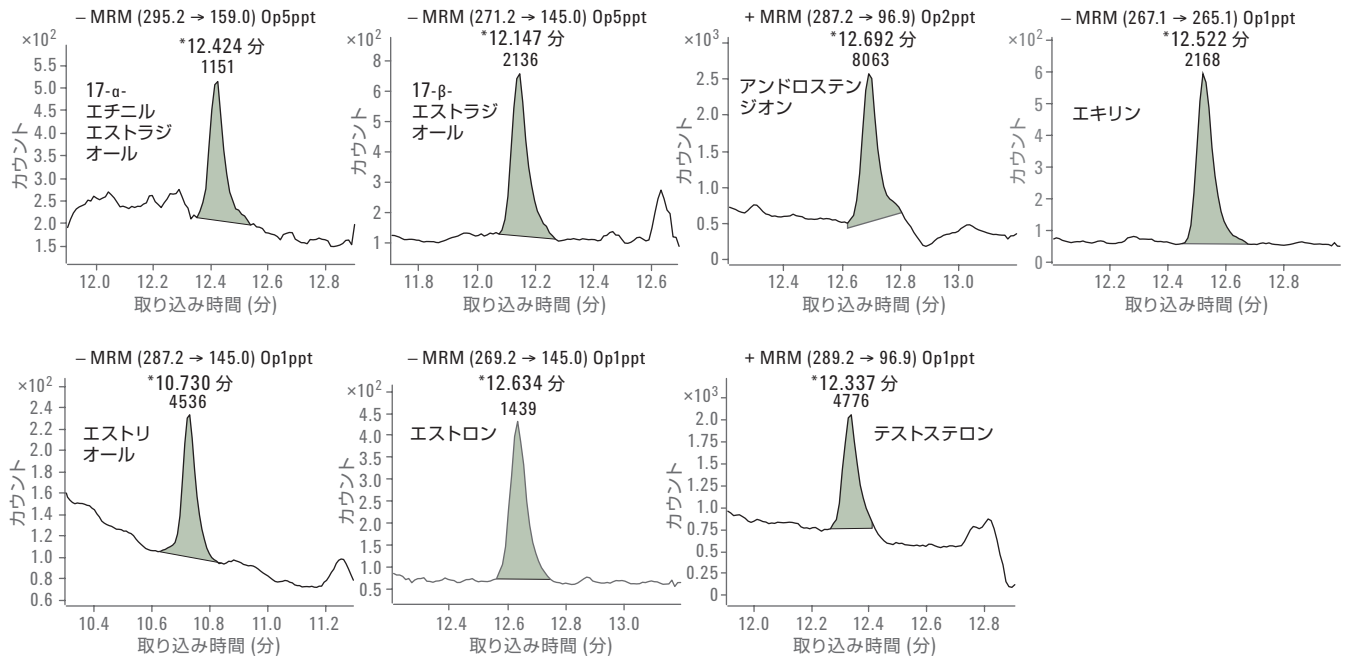


図4. LL0Qレベルに近い7種類のすべてのホルモンの抽出クオリファイヤ MRM トランジション

直線性

直線性は、2桁の濃度範囲に対応するスパイクした水道水サンプルを使用して評価しました(表1)。エキリンおよび17- β -エストラジオールの検量線を図5に示し

ます。すべての対象化合物の直線適合と対応する相関係数(R²)の式を表6に示します。それぞれに重み付け係数1/xを適用しました。

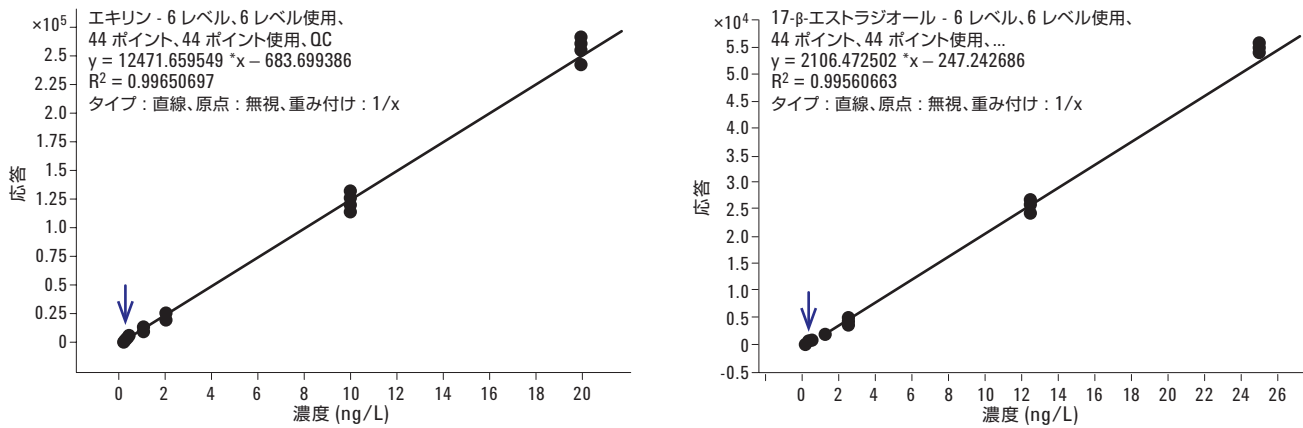


図5. スパイクした水道水サンプル中のエキリンおよび17- β -エストラジオールの検量線

表 6. 線形回帰パラメータ

	線形方程式	R ²
17-a-エチニルエストラジオール	$y = 804.12x - 255.39$	0.996
17-b-エストラジオール	$y = 2106.47x - 247.24$	0.996
アンドロステンジオン	$y = 43246.58x + 2273.65$	0.995
エキリン	$y = 12471.66x - 683.70$	0.997
エストリオール	$y = 2257.79x + 277.07$	0.997
エストロン	$y = 8749.02x - 656.93$	0.996
テストステロン	$y = 65307.71x - 2825.52$	0.994

結論

EPA メソッド 539 の規制対象ホルモンの高感度、高精度、高真度の定量のための高速で容易な LC/MS/MS メソッドを、Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムを使用して開発しました。0.02～0.78 ng/L の範囲の機器の検出下限 (IDL) を使用し、シグナル強度の精度に基づいて機器の感度向上を示しました。時間と手間のかかるオフライン固相抽出ではなく、水道水サンプルのダイレクト注入を用いた簡素化された分析ワークフローで、ng/L 未満の IDL を達成しました。

参考文献

1. Flores-Valverde, A.M.; Horwood, J.; and Hill, E.M. Disruption of the steroid metabolome in fish caused by exposure to the environmental estrogen 17alpha-ethinylestradiol. *Environ.Sci.Technol.* **2010**, *44*(9) pp 3552-8.
2. Jenkins, R., *et al.*, Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environ.Toxicology and Chem.* **2001**, *20*(6) pp 1325-1331.
3. EPA, Method 1698: Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS. **2007**.
4. EPA, EPA Method 539 – Determination of Hormones in Drinking Water by Solid Phase Extraction (SPE) and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS), O.o.W.M.140), Editor. **2010**.
5. Hindle, R., Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS, *Agilent Technologies*, publication number 5991-2473EN, **2013**.
6. Parra, N.P; Taylor, L. 「機器検出下限 (IDL) がトリプル四重極 LC/MS システムの感度評価指標として優れている理由」アジレント技術資料、publication number 5991-4089JAJP, **2014**.

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, June 24, 2014
5991-4685JAJP



Agilent Technologies