

Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS による ダイレクト注入を用いた下水処理水中の 指標化合物 20 種の同定

アプリケーションノート

環境

著者

Shimin Wu,
Mauricius Marques dos Santos, Kevin Daniels, and
Shane Snyder
Department of Chemical & Environmental Engineering
BI05 Institute
University of Arizona
Tucson, AZ, USA

Tarun Anumol
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

概要

廃水中の微量有機化合物の検出用に開発された、水系ダイレクト注入法とわずか 80 μ L のサンプルを用いる高速 LC/MS/MS メソッドにより、下水処理水中に存在する 20 種類の指標化合物を同定しました。このメソッドのサイクルタイムは 14 分未満、最大残留基準値 (MRL) はほぼすべての化合物で 3~39 ng/L でした。また、マトリックス効果は、ほとんどの化合物で 30 % 未満、日内および日間変動率は、20 種類の指標化合物のうち 1 種類を除くすべてについて 5 % 未満でした。



Agilent Technologies

はじめに

世界中の下水処理水には、医薬品、農薬、産業化合物、パーソナルケア製品などの微量有機化合物 (TOrCs) が含まれています。下水処理水を利用した水再利用構想の実施に伴い、これが汚染経路となり、TOrCs が飲料水源へと排出される可能性が懸念されています。米国では、このような汚染についての研究結果がいくつか発表されています [1]。今後、この問題は、淡水源の減少によりさらに深刻化することが予測されます。また、環境には、日々数千種類もの化学物質が放出されています。

一部の TOrCs が野生動物やヒトに対して健康被害をおよぼすことはわかっていますが、飲料水中に低濃度で含まれる TOrCs 混合物での長期的暴露がどのようなリスクをもたらすかは解明されていません。TOrCs の種類は莫大な数にのぼります。また、その数が今もなお増え続けていることから、上水道中の TOrCs を一つずつモニタリングするのは現実的ではありません。効率的なモニタリングには、上水道が廃水により汚染されていることを示す指標化合物のリストが必要です。このリストの候補となる指標化合物は、その発生頻度、リスク評価、環境条件への影響、および排水処理の有効性にもとづいて評価することができます。

このアプリケーションノートでは、米国内の下水処理水における TOrCs の検出頻度と発生の程度を文献で調査することにより実用的な指標化合物リストを作成し、廃水処理施設 4 箇所をモニタリングしてこのリストの有用性を評価した、発表済みの文献 [1] の内容をまとめます。

これまで TOrCs の分析に使用されてきたメソッドは、多くの労力と時間のかかる抽出および濃縮手順を必要とします。また、これらの前処理により、分析のサイクルタイムが長くなり、再現性が低下する可能性もあります。この調査で用いたメソッドは、高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析 (HPLC/MS/MS) システムに大容量のサンプルを直接注入して抽出手順を排除することで、再現性を最大限に高め、分析時間を短縮しています。大容量とは言っても、必要サンプル量はきわめて少ないため、大量のサンプルを採取する必要がありません。同位体標識サロゲート標準物質 (およびコスト) も少量で済みます。また、高速極性切り替え機能とダイナミック MRM を備えた Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS の同時ポジティブ/ネガティブイオン化機能を用いることで、全 20 種類の化合物の採取パラメータをすばやく最適化できました。この機能も 13 分という短いサイクルタイムに貢献しています。

このメソッドにより、20 種類の TOrCs を同定することができました。そのすべてが、廃水処理施設 4 箇所のうち 3 箇所以上で少なくとも 1 回検出されました。また、一部の化合物は、分析したすべてのサンプル中に存在し、しかも飲料水への希釈後も検出されるほど高濃度でした。

実験方法

試薬および標準物質

すべての試薬および標準物質の入手先は、[1] に記載のとおりです。マトリックス効果の測定には、同位体標識サロゲート標準物質 (ILSS) を使用しました。

機器

分析メソッドは、Agilent 1260 Infinity HPLC ポンプに 100 μ L シリンジループを装着して実行しました。Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムでは、クロマトグラフィーカラム (Agilent Pursuit XR_s C-8、100 \times 2.0 mm、3 μ m) を使用しました。システムの動作条件は、Agilent Source Optimizer 機能により最適化しました。これを表 1 に示します。

サンプルの採取と前処理

廃水処理施設 4 箇所の処理水から 1 年にわたり 4 回、それぞれ異なる時期にグラブサンプリングで採取しました。日内変動の影響を排除するために、すべてのサンプルは午前 8~10 時の間に採取しました。サンプルには、アスコルビン酸とアジ化ナトリウムを、それぞれ反応停止剤および微生物増殖阻害剤として添加しました。各サンプル 1 mL に ILSS 混合物を 2 μ g/L で添加し、Agilent 0.2 μ m ポリエチレンスルホン酸 (PES) シリンジフィルタでろ過して、分析用のオートサンプリングバイアルに回収しました。

表1. HPLC および MS の機器条件

| HPLC 条件 | | MS 条件 | | |
|---------|---|---------|---|-----------|
| 分析カラム | Agilent Pursuit XR _s C-8、100 × 2.0 mm、3 μm (p/n A6011100X020) | 採取パラメータ | ESI モード、高速極性切り替えによる同時ポジティブ/ネガティブイオン化、ダイナミック MRM | |
| 注入量 | 80 μL | 遅延時間 | 0.5 分 | |
| カラム温度 | 30 °C | | ポジティブ ESI | ネガティブ ESI |
| 移動相 | A) 0.1 % (v/v) 塩酸水溶液 B) アセトニトリル | シースガス温度 | 350 °C | 350 °C |
| 分析時間 | 11.5 分 + ポストタイム 1.5 分 = サイクルタイム 13 分 | シースガス流量 | 11 L/min | 11 L/min |
| 流量 | 0.4 mL/min | 乾燥ガス温度 | 275 °C | 275 °C |
| グラジエント | 時間 (分) %B | 乾燥ガス流量 | 18 L/min | 18 L/min |
| | 0 2 | ネブライザ圧力 | 45 psig | 45 psig |
| | 1.5 2 | ノズル電圧 | 1,500 V | 0 V |
| | 8 60 | Vcap | 3,000 V | 3,000 V |
| | 10.5 100 | 高圧 RF | 150 V | 90 V |
| | 11.5 2 | 低圧 RF | 60 V | 60 V |
| ポストタイム | 1.5 分 | D EMV | 400 V | 400 V |

分析パラメータ

表 2 に、指標化合物として選択した 20 種類の化合物の一覧とそのサロゲート内部標準のマルチプルリアクションモニタリング (MRM) トランジションを示します。

表2. MRM ESI 分析パラメータ

| 化合物 | リテンション タイム (分) | プリカー サイオン (m/z) | プロダクト イオン (m/z) | フラグメンタ 電圧 (V) | コリジョン エネルギー (V) | ESI モード |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| アセスルファミン | 5.2 | 162 | 82.1 | 380 | 13 | ネガティブ |
| アセスルファミン-d ₄ | 5.2 | 166.1 | 86.1 | 380 | 10 | ネガティブ |
| アテノロール | 4.2 | 267.1 | 190.1 145 | 380 380 | 15 20 | ポジティブ ポジティブ |
| アテノロール-d ₇ | 4.2 | 274 | 190.1 | 380 | 15 | ポジティブ |
| カフェイン | 5.4 | 195.1 | 138 110.1 | 380 380 | 24 16 | ポジティブ ポジティブ |
| カフェイン- ¹³ C ₃ | 5.4 | 198.1 | 140 | 380 | 16 | ポジティブ |
| カルバマゼピン | 8.0 | 237 | 194 179 | 380 380 | 15 35 | ポジティブ ポジティブ |
| カルバマゼピン-d ₁₀ | 8.0 | 247 | 204 | 380 | 15 | ポジティブ |
| DEET | 8.8 | 192 | 119 91 | 380 380 | 15 30 | ポジティブ ポジティブ |
| DEET-d ₅ | 8.8 | 198 | 119 | 380 | 15 | ポジティブ |
| ジクロフェナク | 10.3 | 294 | 250 214 | 380 380 | 4 16 | ネガティブ ネガティブ |
| ジフェンヒドラミン | 6.5 | 256.2 | 167.1 165.1 | 380 380 | 4 44 | ポジティブ ポジティブ |
| ジフェンヒドラミン-d ₅ | 6.5 | 261.2 | 172.1 | 380 | 4 | ポジティブ |

| 化合物 | リテンション タイム (分) | プリカー サイオン (<i>m/z</i>) | プロダクト イオン (<i>m/z</i>) | コリジョン エネルギー (V) | ESI モード |
|---|-------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------|
| ゲムフィブロジル | 10.8 | 249.2 | 121 | 6 | ネガティブ |
| ゲムフィブロジル-d ₆ | 10.8 | 255 | 121 | 6 | ネガティブ |
| ヒドロクロロチアジド | 6.0 | 296 | 268.9 204.7 | 10 15 | ネガティブ ネガティブ |
| イオヘキソール | 4.2 | 821.9 | 803.8 | 20 | ネガティブ |
| イオプロミド | 4.8 | 791.8 | 572.8 558.8 | 22 28 | ポジティブ ポジティブ |
| イオパミドール-d ₃ | 2.3 | 781 | 562 | 22 | ポジティブ |
| メプロバメート | 7.0 | 219 | 158 55 | 5 20 | ポジティブ ポジティブ |
| メプロバメート-d ₃ | 7.0 | 222.1 | 161.1 | 5 | ポジティブ |
| ブリミドン | 6.3 | 219.3 | 162.1 91.1 | 9 25 | ポジティブ ポジティブ |
| スクラロース | 5.9 | 419 | 239 221 | 15 15 | ポジティブ ポジティブ |
| スクラロース-d ₆ | 5.9 | 425 | 243 | 15 | ポジティブ |
| スルファメトキサゾール | 7.1 | 254 | 156 92 | 10 30 | ポジティブ ポジティブ |
| スルファメトキサゾール- ¹³ C ₆ | 7.1 | 260 | 162 | 10 | ポジティブ |
| TCEP | 9.0 | 285 | 223 | 10 | ポジティブ |
| TCEP-d ₁₂ | 8.6 | 297 | 232 | 13 | ポジティブ |
| TCPP | 9.8 | 327 | 99 81 | 16 70 | ポジティブ ポジティブ |
| トリクロカルバン | 11.0 | 313 | 160 126 | 5 25 | ネガティブ ネガティブ |
| トリクロカルバン- ¹³ C ₆ | 11.0 | 318.9 | 160 | 5 | ネガティブ |
| トリクロサン | 11.1 | 289 287 | 37 35 | 5 5 | ネガティブ ネガティブ |
| トリクロサン- ¹³ C ₁₂ | 11.1 | 299 | 35 | 5 | ネガティブ |
| トリメトプリム | 5.1 | 291 | 261 230 | 25 25 | ポジティブ ポジティブ |
| トリメトプリム-d ₃ | 5.1 | 294 | 264 | 25 | ポジティブ |

結果と考察

指標化合物の選択

米国内の文献の調査にもとづいて、48種類のTOrCsからなる指標化合物候補リストを作成し、優先順位採点システム(PSS)を用いて各化合物を評価しました。PSSでは、文献での検出頻度(DF)、平均濃度(発生)、および各化合物が下水処理水中で検出された関連文献件数(調査)を基準としました。3つの各基準の最高スコアを3とし、化合物の最高PSSスコアが9になるようにしました。PSSスコアが7以上だった20種類の化合物のみを指標化合物として選択しました。その結果を表3に示します。

表3. 米国内の文献の調査をもとに選択した指標化合物20種

| 化合物 | スコア | | | |
|-------------|-----|-----|-----|----|
| | DF* | 発生† | 調査‡ | 合計 |
| アセスルフアム | 3 | 3 | 1 | 7 |
| アテノロール | 3 | 3 | 2 | 8 |
| カフェイン | 1 | 3 | 3 | 7 |
| カルバマゼピン | 3 | 1 | 3 | 7 |
| DEET | 3 | 3 | 3 | 9 |
| ジクロフェナク | 2 | 2 | 3 | 7 |
| ジフェンヒドラミン | 3 | 3 | 1 | 7 |
| ゲムフィプロジル | 2 | 2 | 3 | 7 |
| ヒドロクロロチアジド | 3 | 3 | 1 | 7 |
| イオヘキソール | 3 | 3 | 1 | 7 |
| イオプロミド | 3 | 2 | 2 | 7 |
| メプロバメート | 3 | 2 | 2 | 7 |
| プリミドン | 3 | 2 | 2 | 7 |
| スクラロース | 3 | 3 | 2 | 8 |
| スルファメトキサゾール | 3 | 3 | 3 | 9 |
| TCEP | 3 | 2 | 2 | 7 |
| TCPP | 3 | 3 | 2 | 8 |
| トリクロカルバン | 3 | 2 | 2 | 7 |
| トリクロサン | 3 | 1 | 3 | 7 |
| トリメトプリム | 3 | 1 | 3 | 7 |

* 米国内の文献でのDF(検出頻度): 1 (51~70%), 2 (71~85%), 3 (86%以上)

† 発生スコア(平均濃度にもとづく): 1 (51~200 ng/L)、

2 (201~500 ng/L)、3 (501 ng/L以上)

‡ 調査スコア(文献件数にもとづく): 1 (2~4件)、2 (5~9件)、3 (10件以上)

メソッド性能

各分析対象物の最大残留基準値(MRL)と機器の定量下限(LOQ)を[1]に記載の方法で測定しました。その結果を表4に示します。20種類の化合物のMRLは、スクラロースを除き、3~37 ng/Lの範囲でした(表4)。スクラロースのMRLは比較的高い値でしたが(302 ng/L)、下水処理水では、これより数倍高い濃度のスクラロースが検出されています。LOQは、20種類の化合物のほとんどが20 ng/L未満で、全体では2~100 ng/Lの範囲でした(表4)。

表4. 指標化合物20種のMRLとLOQ

| 指標化合物 | MRL (ng/L) | LOQ (ng/L) |
|-------------|------------|------------|
| アセスルフアム | 4 | 5 |
| アテノロール | 37 | 20 |
| カフェイン | 8 | 5 |
| カルバマゼピン | 3 | 2 |
| DEET | 34* | 10 |
| ジクロフェナク | 14 | 10 |
| ジフェンヒドラミン | 7 | 5 |
| ゲムフィプロジル | 23 | 50 |
| ヒドロクロロチアジド | 15 | 10 |
| イオヘキソール | 13 | 10 |
| イオプロミド | 39 | 20 |
| メプロバメート | 8 | 10 |
| プリミドン | 9 | 10 |
| スクラロース | 302 | 100 |
| スルファメトキサゾール | 5 | 5 |
| TCEP | 20 | 20 |
| TCPP | 22* | 10 |
| トリクロカルバン | 14 | 10 |
| トリクロサン | 15 | 10 |
| トリメトプリム | 11 | 5 |

* 機器汚染がほとんどないことから、MRLをブランク濃度の2倍に調整

廃水処理施設 (WWTP) 2 箇所で採取した処理水に各化合物を 1,000 ng/L および 5,000 ng/L で添加し、全 20 種類の指標化合物の添加回収率を測定しました。スクラロース (WWTP 1 サンプルについて 5,000 ng/L で 67 %) およびイオヘキソール (WWTP 1 サンプルについて 1,000 ng/L で 46 %) を除き、回収率は、どちらの WWTP でも両添加濃度で 83~138 % でした。WWTP 1 の処理水には、添加濃度 1,000 ng/L の 20 倍を超える濃度のスクラロースとイオヘキソールが含まれていました。これが、これらの化合物の回収率が低かった原因と考えられます。添加回収率の測定精度はきわめて高く、20 種類の化合物のほぼすべての相対標準偏差 (RSD) は、どちらの WWTP についても、またどちらの添加濃度でも 5 % 未満でした。

下水処理水のマトリックス効果の測定には、超純水に ILSS を添加したときの面積カウントに対する、処理水に同じ ILSS を添加したときの面積カウントの比を用いました。その結果、下水処理水のマト

リックス効果が 20 種類の指標化合物のほとんどについて 30 % 未満であることがわかりました。一方、ヨード X 線造影剤であるイオヘキソール、イオパミドール、およびイオプロミドでは、高い抑制 (最大 60 %) を示す結果が得られました (図 1)。また、下水処理水マトリックスでは、アセスルファムおよびスクラロースの信号強度が高くなりました。一方、その他 18 種類の化合物については、マトリックス抑制が見られました。

各化合物の MRL をわずかに上回る濃度から 10 µg/L までの範囲の検量線を作成したところ、20 種類の指標化合物のうち 15 種類の相関係数 (R^2) が 0.995 を超え、また全 20 種類の化合物の R^2 値が 0.99 を上回りました (表 5)。定量精度の測定には、各化合物の標準物質を 2 µg/L で用いました。その結果、日内測定値の相対標準偏差 (RSD) はすべて 5 % 未満でした (表 5)。また、日間測定値の RSD は、20 種類の化合物のうち 14 種類で 5 % 未満、全体では TCEP (14 %) およびスクラロース (12 %) を除き 10 % 未満でした。

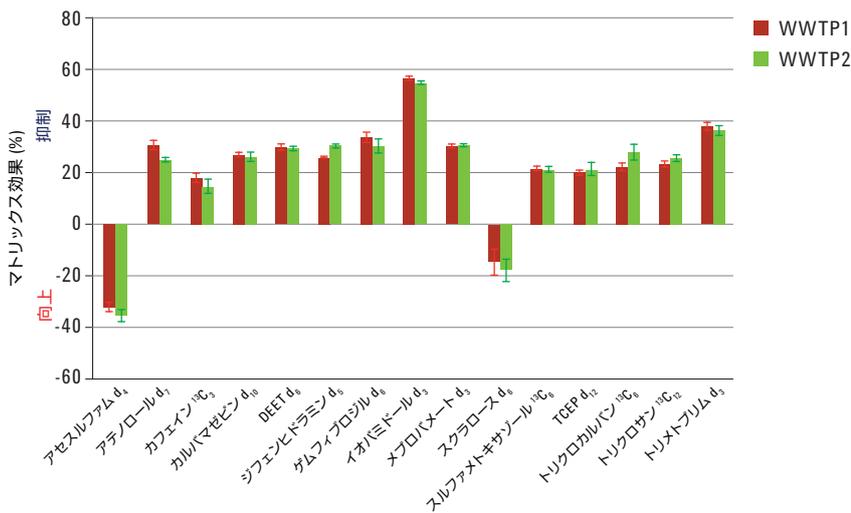


図 1. ILSS にもとづく、下水処理水のマトリックス効果 (n = 5)

表5. 指標化合物 20 種のキャリブレーションの精度と直線性

| 化合物 | 日間変動率 (%) | 日内変動率 (%) | 直線性 (R ²) |
|-------------|-----------|-----------|-----------------------|
| アセスルファミン | 1.4 | 0.35 | 0.9987 |
| アテノロール | 7.7 | 1.3 | 0.9964 |
| カフェイン | 0.69 | 3.8 | 0.9967 |
| カルバマゼピン | 6.2 | 1.5 | 0.9989 |
| DEET | 0.47 | 4.6 | 0.9951 |
| ジクロフェナク | 2.0 | 1.0 | 0.9982 |
| ジフェンヒドラミン | 2.7 | 2.1 | 0.9904 |
| ゲムフィブロジル | 3.3 | 3.8 | 0.9974 |
| ヒドロクロロチアジド | 1.0 | 2.5 | 0.9983 |
| イオヘキソール | 0.48 | 1.9 | 0.9988 |
| イオプロミド | 2.2 | 1.8 | 0.9975 |
| メプロバメート | 1.2 | 1.5 | 0.9975 |
| プリミドン | 0.12 | 2.7 | 0.9963 |
| スクラロース | 12 | 0.55 | 0.9970 |
| スルファメトキサゾール | 0.30 | 2.2 | 0.9971 |
| TCEP | 14 | 0.84 | 0.9974 |
| TCPP | 5.6 | 2.4 | 0.9924 |
| トリクロカルバン | 9.9 | 2.3 | 0.9929 |
| トリクロサン | 1.1 | 1.0 | 0.9927 |
| トリメトプリム | 0.97 | 2.8 | 0.9941 |

下水処理水の分析

WWTP 4 箇所のそれぞれにおいて 1 年にわたり合計 4 回処理水をサンプリングし、分析しました。20 種類の TOrCs 指標化合物すべてが、4 施設のうち少なくとも 3 施設で 1 回以上検出されました。また、ヒドロクロロチアジド、アセスルファミン、スクラロース、TCPP、イオヘキソールなどの化合物がすべてのサンプルで検出されました。しかも、その濃度は、飲料水への希釈後にも理論的に検出されるほど高濃度でした。このことから、これらの化合物は、廃水汚染を示す汎用指標化合物としてふさわしい化合物と言えます。

その他の指標化合物は、それぞれの MRL を超える濃度でほぼすべてのサンプルに存在していたことから、WWTP の処理プロセスの有効性、使用パターンおよび消費パターン、および季節変動を示す指標として役立ちます。これには、トリクロサン、スルファメトキサゾール、カフェイン、カルバマゼピン、DEET など含まれます。この 20 種類の指標化合物は、同じ分類または類似した分類に属する化学物質群に分けることができます。これにより、重複性や、下水処理水の化合物組成の季節的および地理的な違いを明らかにすることができます。この調査で作成したような堅牢な指標化合物リストは、TOrCs の最終的な状態と減衰を追跡し、水の再利用への影響を研究するうえで不可欠です。

結論

下水処理水に含まれる一連の指標化合物を評価するための、ダイレクト注入 LC/MS/MS 法を用いた迅速かつ堅牢なメソッドを開発しました。このメソッドの使用サンプル量はわずか 80 µL です。また、長い分析時間、スループットの低下、メソッドの真度および精度の低下につながる面倒な抽出手順が不要です。このメソッドでは、20 種類の指標化合物のうち 1 種類 (スクラロース、302 ng/L) を除くすべての化合物の MRL が 3~37 ng/L に収まっていました。精度を示す日内および日間変動率は、ほぼすべての化合物で 5 % 未満でした。また、マトリックス効果の測定により、ほとんどの化合物の信号変化が 30 % 未満に抑えられることがわかりました。このメソッドを使用することで、一連の指標化合物をもとに、廃水による飲料水の汚染を検出することができます。また、下水処理施設で用いられている処理プロセスの効率や季節的および地理的変動のモニタリングにも役立てることができます。

参考文献

1. T. Anumol, et al. "Rapid direct injection LC-MS/MS method for analysis of prioritized indicator compounds in wastewater effluent" *Environ Sci: Water Res Technol* DOI: 10.1039/c5ew00080g (2015).

詳細情報

本書に記載されたデータは典型的な結果です。アジレントの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。

本資料に記載の情報、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。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

October 1, 2015

5991-6114JAJP