

水中の微量有機汚染物質の高感度分析

Agilent 1290 Infinity FlexCube オンライン SPE
Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS

著者

Dan-Hui Dorothy Yang,
Patrick Batoon, Tarun
Anumol, Theresa Sosienski,
and Mark Sartain
Agilent Technologies Inc.,
Santa Clara, California, USA

概要

このアプリケーションノートは、Agilent 1200 Infinity シリーズオンライン SPE ソリューションと Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS による、水中の低濃度レベル (ng/L) の微量有機汚染物質を分析する方法について解説します。このメソッドでは水サンプルの大容量注入の利点を活用して、手間のかかるオフラインでのサンプル前処理やサンプル濃縮を回避します。Ultivo は多くの技術革新を搭載しており、占有スペースの低減と感度の維持を両立することができます。今回の実験では、高速極性切替を使用し 51 種類の化合物を同時ポジティブ/ネガティブエレクトロスプレーイオン化モードで分析しました。システム性能を、直線性、検出下限 (LOD)、相対標準偏差 (RSD) によって示しました。

はじめに

農薬、医薬品、パーソナルケア製品、工業用化学物質が日常生活において広く使用されると、水源の汚染を招くこととなります。系統的な環境汚染により、健康に対する懸念が世界中で高まりました。行政機関は、表流水および飲料水に含まれる化学汚染物質を監視するための規制を定めています。化学汚染物質の管理は、欧州連合の飲料水指令 98/83/EC¹、米国 EPA ガイドラインドキュメント^{2,3}などの規制によって指示されています。世界保健機構は、飲料水の安全性についてのガイドラインを発行し、水系でよく見られる 30 種類以上の農薬について限界値を設定しました⁴。世界的に見ると、特に飲料水中におけるこれらの有機汚染物質の測定要件は、1 ppt (ng/L) に満たないレベルから低 ppt レベルまでの幅があります。この低濃度レベルの定量を確実なものとするために、通常は LC/MS 分析前のサンプル濃縮ステップの使用が不可欠になります。代表的なオフライン濃縮では、固相または液相抽出で大容量のサンプルを使用します。しかし、これは時間がかかるだけでなく、大量の化学廃棄物も排出します。Agilent FlexCube オンライン SPE ソリューションでは、バルブシステムを使用して濃縮カートリッジへのサンプルローディングの切り替えを制御し、自動化されたオンラインサンプル濃縮を実現しています^{5,6}。モジュールは現行の LC/MS 構成とシームレスに組み合わせることができ、単一の統合型ソフトウェアプラットフォームから操作できます。

Ultivo LC/TQ は、現在のルーチンユーザーが直面する数多くの課題に対応できるようにデザインされています。Ultivo に搭載された革新的な技術により、大型の MS システムと同等の感度および性能を維持しつつ、全体の占有スペースを削減することができます。サイクロンイオンガイド、ポルテックスコリジョンセル、プレ/ポストバーチャルフィルタ、双曲型四重極など、機器設計の進歩により、定量性能が最大限に高まるとともに、機器の信頼性と堅牢性も向上します。このすべてが稼働時間とスルーputを大幅に向上させることとなります。Ultivo では、ユーザーのシステムメンテナンスの負担の必要性を低減しているため、経験豊富なユーザーでなくてもシステムの運用やメンテナンスの管理を行うことができます。また、Agilent MassHunter ソフトウェアを使用すると、データ取り込み、メソッド設定、データ解析、レポート作成を容易に実行できます。さらに、Quant-My-Way により、各ユーザーのワークフロー要件に合わせてデータ処理およびレポート作成を効率化できるため、データサンプリングからレポート作成までの時間を大幅に短縮できます。

今回は、代表的な 51 種類の汚染物質を分析しました。分析対象物には、農薬、農薬代謝物、医薬品、ペルフルオロ化合物、可塑剤などが含まれていました。約 25 % の化合物が、低濃度レベルの有機汚染物質を分析する決め手となる Ultivo の高速極性切替を利用してネガティブイオンモードで分析されました。

分析方法

装置構成

Agilent Infinity シリーズオンライン SPE ソリューション

- Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプ (G7112B)
- Agilent 1260 Infinity II マルチサンプル (G7167A)、900 µL ヘッド/ループおよび冷却器付き
- Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブ (G4227A)、1 個の 2 ポジション/10 ポートクイックチェンジバルブヘッドとそれぞれに対応したキャピラリーを提供するオンライン SPE スタータセット (G4742A) 付き
- Agilent 1260 Infinity II MCT (G7116A)

MS 検出器

Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS
(Agilent Jet Stream ESI ソース搭載)

分析カラム

- Agilent Poroshell 120 EC C18、3.0 × 50 mm、2.7 µm (p/n 699975-302)
- 2 × ガードカラムハードウェアキット (p/n 820999-901)
- トラッピングカラム (G4742A の一部)、Agilent PLRP-S カートリッジ、2.1 × 12.5 mm、15 ~ 20 µm (p/n 5982-1271)

表 1 に、Agilent 1260 Infinity II バイナリポンプメソッドと FlexCube オンライン SPE メソッドの条件を示します。従来の EPA メソッドがオフライン SPE を採用し数百ミリリットルのサンプルを必要とするのに対して、FlexCube オンライン SPE では 900 µL というわずかな注入量のサンプルを使用するだけです。濃縮と分析にかかる全サイクル時間は 21 分でした。一方、オフライン SPE メソッドでは数時間を要する場合があります。表 2 に Agilent Jet Stream ESI ソースのパラメータを、表 3 に今回分析した化合物を示します。

表 1. Agilent バイナリポンプと Agilent FlexCube の条件

パラメータ	設定値														
分析カラム	Agilent Poroshell 120 EC C18, 3.0 × 50 mm, 2.7 μm														
カートリッジのロード	Agilent PLRP 2.1 × 12.5 mm, 15 ~ 20 μm														
移動相	バイナリポンプ: A) H ₂ O + 0.01 % 酢酸 + 1 mM 酢酸アンモニウム + 0.1 mM フッ化アンモニウム B) 0.01 % 酢酸のアセトニトリル溶液 FlexCube: A1) H ₂ O + 0.1 % 酢酸 B2) ACN: IPA=1:1														
カラム温度	40 °C														
注入量	900 μL														
バイナリポンプ グラジエントプログラム	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>4</td><td>2</td></tr> <tr><td>6</td><td>40</td></tr> <tr><td>16.5</td><td>98</td></tr> <tr><td>18</td><td>98</td></tr> <tr><td>18.1</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>	時間 (分)	%B	0	2	4	2	6	40	16.5	98	18	98	18.1	2
時間 (分)	%B														
0	2														
4	2														
6	40														
16.5	98														
18	98														
18.1	2														
ストップタイム	19 分														
ポストタイム	2 分														
FlexCube タイムテーブル	<table border="1"> <thead> <tr> <th>時間 (分)</th> <th>操作</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.00</td> <td>ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入</td> </tr> <tr> <td>0.00</td> <td>右バルブのポジションを変更: ポジション 1 (FlexCube)</td> </tr> <tr> <td>4.05</td> <td>左バルブのポジションを変更: バルブポジションを増大</td> </tr> <tr> <td>4.10</td> <td>ポンプボリューム: チャネル B2 から 1 mL/min で 240 秒ポンプで注入</td> </tr> <tr> <td>8.15</td> <td>ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入</td> </tr> </tbody> </table>	時間 (分)	操作	0.00	ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入	0.00	右バルブのポジションを変更: ポジション 1 (FlexCube)	4.05	左バルブのポジションを変更: バルブポジションを増大	4.10	ポンプボリューム: チャネル B2 から 1 mL/min で 240 秒ポンプで注入	8.15	ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入		
時間 (分)	操作														
0.00	ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入														
0.00	右バルブのポジションを変更: ポジション 1 (FlexCube)														
4.05	左バルブのポジションを変更: バルブポジションを増大														
4.10	ポンプボリューム: チャネル B2 から 1 mL/min で 240 秒ポンプで注入														
8.15	ポンプボリューム: チャネル A1 から 1.5 mL/min で 240 秒ポンプで注入														
流量	0.40 mL/min														

表 2. Agilent Jet Stream ESI ソースパラメータ

パラメータ	設定値
ドライガス温度	250 °C
ドライガス流量	11 L/min
ソースガス温度	375 °C
ソースガス流量	12 L/min
ネブライザ圧力	45 psi
ノズル電圧 (V)	500 (+), 500 (-)
キャピラリ電圧 (V)	4,000 (+), 3,500 (-)

表 3. 分析した化合物

化合物	化合物	化合物
3-ヒドロキシカルボフラン	ゲムフィブロジル	PFHxA
アラクロール	ヒドロコルチゾン	PFHxS
アトラジン	イブプロフェン	PFNA
ベンゾトリアゾール	インドキサカルブ	PFOA
カフェイン	イソゾホス	PFPeA
カルバマゼピン	メプロバメート	PFUdA
キノメチオネート	メタラキシル	プリミドン
クロフィリン酸	メソミル	プロプラノロール
DEET	メビンホス (シス)	プロボスキル
ジクロフェナク	ナプロキセン	プロピルバラベン
ジルチアゼム	ノルゲストレル	シマジン
ジメトエート	オキサジキシル	スルファメトキサゾール
ジスルホトンスルホキシド	ベンジメタリン	TCEP
エチオン	PFBS	テストステロン
エトプロホス	PFDA	トリクロカルバン
フェナミホス	PFDoA	トリメトプリム
フェンシルホチオン	PFHpA	バミドチオンスルホキシド

今回の調査で使用した Agilent 1290 Infinity FlexCube は、2 ポジション/10 ポートバルブで構成されます。メソッドセットアップでバルブ位置をプログラミングすることによって、2 個のトラッピングカラムをサンプルロードに交互に使用しました。FlexCube には往復ピストンポンプおよび溶媒選択バルブが含まれ、サンプルのトラッピングカラムへのフラッシュ、カートリッジのクリーニング、カートリッジの平衡化を行います (図 1)。サンプルをロードするバルブ位置が選択されると、FlexCube 内のピストンポンプがオートサンプルラに接続されてトラッピングカラムにサンプルがフラッシュされます (SPE 1)。もう 1 つのトラッピングカラム (SPE 2) が分析ポンプに接続され、分析カラムに溶出されます。トラッピングカラムにサンプルをロードした後、バルブが切り替えられ、トラッピングカラムの位置が交換されます。ここで、LC ポンプによって、トラッピングカラム (SPE 1) から分析カラムへと濃縮された分析対象物がグラジエント溶出されます。同時に、直前の分析時に溶出されたトラッピングカラム (SPE 2) がさらにクリーニングされ、再コンディショニングされます。このクリーニング手順は、溶媒選択バルブでクリーニング溶媒を用い、FlexCube のピストンポンプによって実行されます。

分析対象物のさまざまなクラスを代表する 51 種類の汚染物質が、ダイナミックマルチプルリアクションモニタリング (dMRM) メソッドを使用して分析されました。

試薬および標準試料

LC グレードのアセトニトリルは Honeywell 社 (米国) から購入しました (015-4)。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 社) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。イソプロパノール (IPA) は Honeywell 社から購入しました (323-4)。酢酸アンモニウムは Fluka 社から固体で購入して、5 M 溶液を調製しました (14267-25G)。酢酸は Sigma-Aldrich 社から購入しました (338826-25ML)。5 M ギ酸アンモニウム溶液はアジレントで調達しました (G1946-85021)。

ペルフルオロアルキル化合物標準は Wellington Laboratories 社 (カナダ) から購入しました。他のすべての標準試料は Ultra Scientific 社 (米国)、Sigma-Aldrich 社 (米国) から購入するか、共同研究者から入手しました。

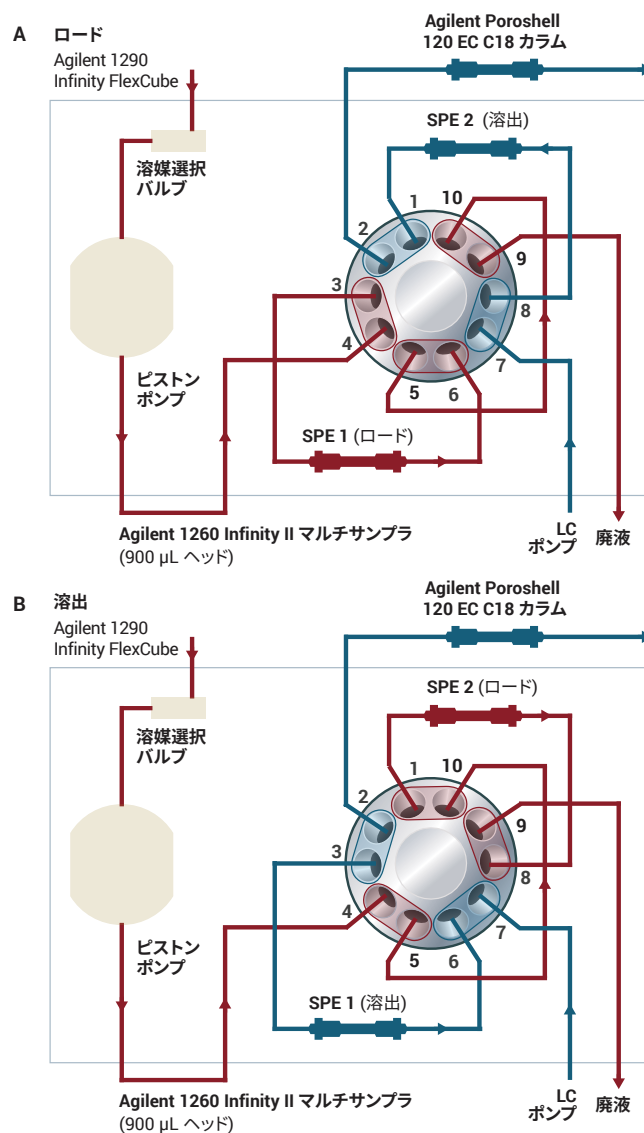


図 1. FlexCube オンライン SPE バルブダイアグラム

結果と考察

メソッドの直線性

フッ素化合物を除くすべての分析対象物を含む 0.5 ppm ストック溶液は、アセトニトリルで調製しました。14 μL の上記のストック溶液と 3.5 μL のフッ素化合物 (2 ppm ストック溶液) を、13.98 mL の Millipore 水に加えて、500 ng/L のスパイク濃度となるようにしました。この溶液から、8 つのキャリブレーションレベルを作成しました (200、100、50、20、10、5、2.5、1.25 ng/L)。濃度レベルに従って繰り返し注入を 6 回行いました。

直線フィッティングおよび $1/x$ の重み付けで、ほとんどの検量線の R^2 値は 0.99 を上回りました。図 2 は、6 種類の化合物について今回の分析で得られた代表的な検量線です。3-ヒドロキシカルボフラン、メソミル、ジスルホトンスルホキッドは、EPA メソッド 540 に記述のある化合物です。この 3 種類の化合物は 1.25 ng/L の最小スパイクレベルで正確に定量できました。水系でよく見られる化合物クラスのイブプロフェン (医薬品)、ペルフルオロアルキル化合物 (PFOA)、テストステロン (ホルモン) も、最小のキャリブレーションレベルで定量できました。このことは、Ultivo LC/TQ と 1290 Infinity FlexCube オンライン SPE システムが水中の微量有機物の分析に最適な組み合わせであることを実証しています。

一部の疎水性物質、例えばインドキサカルブやベンジメタリンでは、二次曲線フィッティングが必要でしたが、 $R^2 = 0.994$ と良い値を示しました。二次曲線フィッティングとなったのはおそらく、分析対象物が直接接触した容器表面での非常にわずかな水中への分析対象物の損失が原因です。

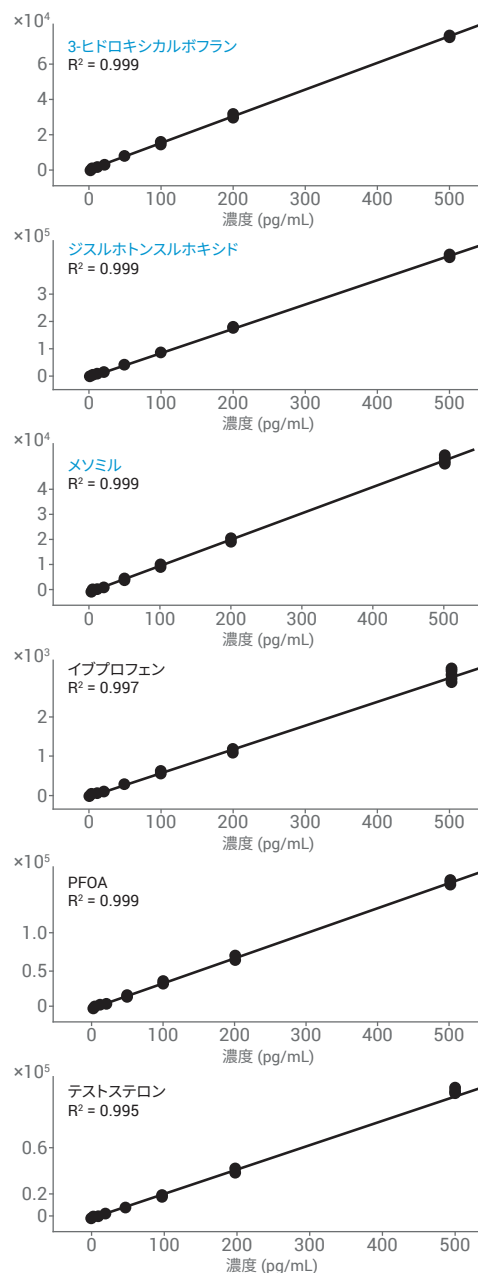


図 2. 選択した検量線。EPA メソッド 540 に記載された化合物は青色でハイライト

メソッドの感度

図3は、水中の51種類の化合物の10 ng/Lでのシグナル応答を示しています。化合物の多くをこれよりも大幅に低い濃度で分析できることは明らかです。多くの化合物はシグナル応答が優れており、分析対象物によっては最小キャリブレーションポイントの1.25 ng/Lよりも大幅に低い濃度レベルでも分析されました。

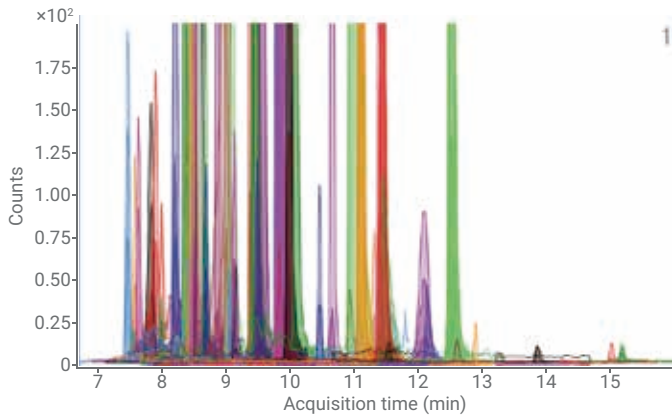


図3. 900 μL 注入による10 pptでのシグナル応答

10以上のS/N比で最小のキャリブレーションポイントを用いて定量下限(LOQ)を算出し、6回の繰り返し注入で4回以上について80~120%内で定量精度が特定されました。図4は、分析対象化合物の検出感度を示しています。分析対象物の86%が10 ng/L未満で正確に定量できたことが観察されました。

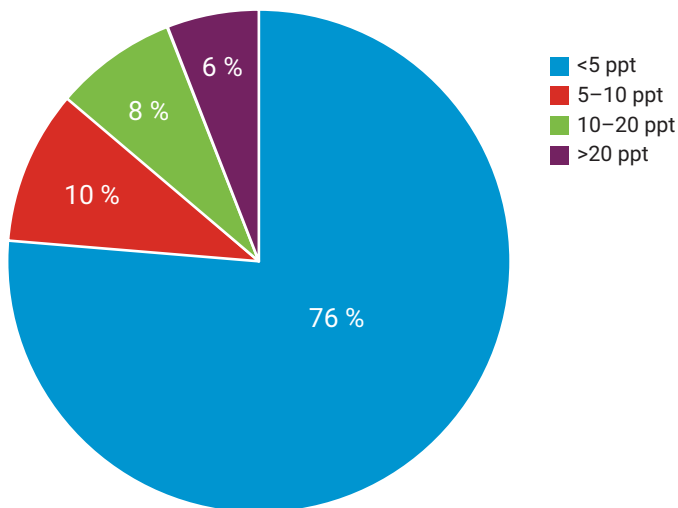


図4. 51種類の汚染物質のLOQ分布(真度80~120%)

メソッドの精度

1.25 ng/L ~ 500 ng/Lの各濃度で繰り返し注入を6回実施しました。正確な定量となるよう、最低濃度で% RSDが算出されました(6回の繰り返しのうち4回以上が80~120%の真度)。図5に示すように、1つの化合物を除き、すべての% RSDが20%以下でした。この良好な% RSDは、2個の交互濃縮カートリッジの一貫性のある性能を示すものでもあります。図6は、複数注入における面積およびリテンションタイムの安定性を示しています。ブランクサンプルが目的の分析対象物を含んでいる場合もあります。今回の調査では、DEETのみがブランクサンプル中に存在し、その濃度は10 ng/Lよりも非常に低いものでした。

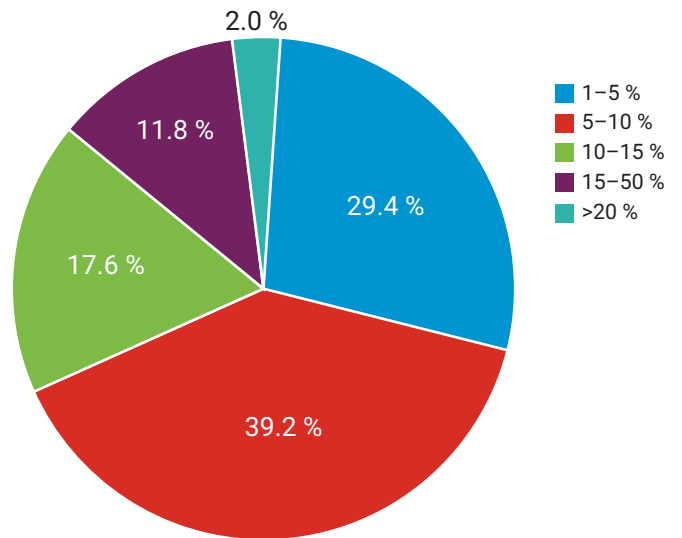


図5. 測定精度(% RSD, n=6)

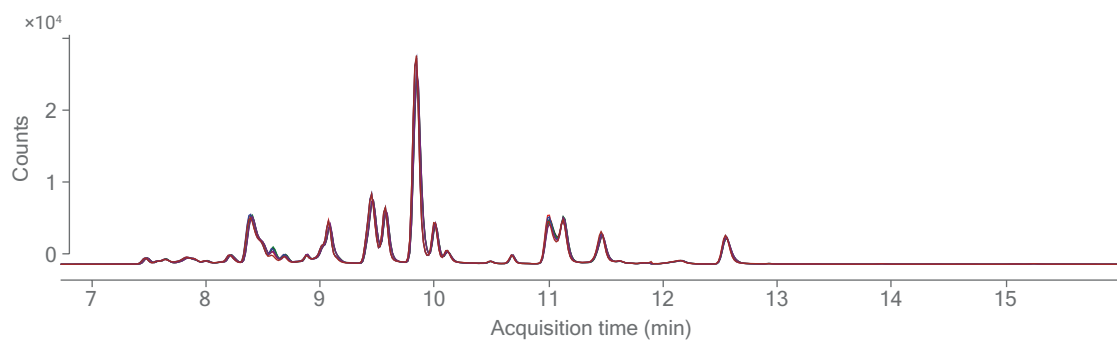


図 6. 濃縮カートリッジを切り替えて 20 ng/L で 6 回注入した場合のクロマトグラムの重ね表示

結論

Agilent 1290 Infinity FlexCube オンライン SPE と Agilent Ultivo トリプル四重極 LC/MS を用いて、水中の微量有機汚染物質を高感度で分析できることが、結果により実証されました。ほとんどの分析対象物を、900 μ L 注入により低 ng/L レベルで正確に定量することができました。1 つの化合物を除き、優れた直線性と精度が得られました。今回のメソッドは、分析レベルが現行のオフライン SPE メソッドと同等でありながら、分析時間の短縮、労力の低減、溶媒の使用量削減が可能になります。

参考文献

1. European Union Drinking Water Directive 98/83/EC http://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/index_en.html
2. EPA METHOD 540: Determination of Selected Organic Chemical In Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)
3. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf
4. Guidelines for Drinking-water Quality (4th Edition), World Health Organization, **2011**, ISBN 978 92 4 154815 1.
5. Quantification of trace-level herbicides in drinking water by online enrichment with the Agilent 1200 Infinity Series Online-SPE Solution and Triple Quadrupole MS Detection, Agilent Technologies Application Note, publication number 5991-1738EN, **2013**.
6. Comparison of Direct Injection and Online SPE for Quantification by LC/MS of Trace-Level Herbicides in Water, Agilent Technologies Technical Note, publication number 5991-2140EN, **2013**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2017
Printed in Japan, December 22, 2017
5991-8767JAJP