

飲料水中のペルフルオロアルキル化合物と ポリフルオロアルキル化合物の定量

Agilent 6546 LC/Q-TOF による EPA メソッド 533 への準拠

著者

Kathy Hunt and Ralph Hindle
Vogon Laboratory Services
Cochrane, AB, Canada

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

James Pyke and Chris Klein
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA, USA

概要

飲料水中の特定のペルフルオロアルキル化合物とポリフルオロアルキル化合物 (PFAS) を分析するための米国環境保護庁 (US EPA) メソッド 533 では従来、液体クロマトグラフィー/トリプル四重極質量分析 (LC/TQ) を用いて分析感度を最大化しています。このアプリケーションノートでは、Agilent 6546 Q-TOF LC/MS を用いて EPA メソッド 533 の化合物を分析し、メソッド 533 で定められている感度レベルとすべての性能条件を満たせることを示します。また、LC-Q/TOF によってその他の PFAS のスクリーニングや、未知および新規の PFAS のノンターゲット同定を実行できることも説明します。

LC/TQ を用いたメソッド 533 における PFAS の分析 (抽出回収率、メソッドレポートレベル、精度などのメソッドパラメータを含む) については、以前に発行したアプリケーションノート 5994-1628JAJP を参照してください。メソッド 533 では、100 ~ 250 mL の飲料水の固相抽出の後に溶媒を 1 mL の 80 % メタノールに交換し、LC/TQ で分析する必要があります。このアプリケーションノートでは、検出器のみを交換し、TQ の代わりに LC/Q-TOF を使用することで、Agilent 6546 LC/Q-TOF で EPA メソッド 533 の性能基準を満たせることを示します。

はじめに

四重極飛行時間型 (Q-TOF) は質量精度を用いて化学式を明確に同定できる、高分解能の精密質量機器です。また Q-TOF では高い取り込みレートで質量分解能を低下させずにデータを取り込めるため、ターゲット化合物の定量にも使用できます。これがトラップベースの高分解能機器と異なる点です。定量の精度、堅牢性、感度を確保するためピーク全体で最大 20 個のデータポイントを必要とする場合は、トリプル四重極 (TQ) 機器による通常の分析と同様に、高い取り込みレートが必須となります。また高分解能を用いて、取り込んだデータのレトロスペクティブ分析を実行し、疑わしい化合物や未知の化合物を検出できます。

一般的な HRMS 機器を用いた標準の取り込みモードは次の 4 つです。

- MS (TOF のみ) モードは、フラグメンテーションなしのフル MS スペクトルによって非常に高い感度を実現します。All Ions 手法では (a) 低コリジョンエネルギー値 (一般的には 0 V、フル MS スペクトルで発生)、および (b) 1 つまたは複数の高エネルギー値、という異なる条件を用いてデータを取り込みます。低エネルギースペクトルでは主に化合物の分子 (またはプリカーサ) イオンのみが検出されます。一方、高エネルギースペクトルではプリカーサイオンとそのフラグメントイオンが検出されるため、プリカーサデータとフラグメンテーションデータを同時に収集できます。
- 自動 MS/MS はデータ依存の取り込みモードであり、ユーザーが指定するしきい値よりアバundanceが大きいプリカーサに対する四重極マスフィルタリングをトリガーします。

- ターゲット MS/MS モードは LC/TQ 分析に最も似ています。四重極が所定のリテンションタイムウィンドウ内でターゲットリストからプリカーサイオンを単離します。これでプロダクトイオンスペクトルを取り込むことができます。
- データ独立型取り込みモードは Quadrupole Resolved All-Ions (Q-RAI) とも呼ばれており、最大 100 amu の広い質量四重極単離ウィンドウを用いてプリカーサイオンをフィルタリングします。その後、プリカーサイオンはコリジョンセルに入り、フラグメント化されます。

メソッド 533 の取り込み要件を満たすため、ターゲット MS/MS モードを選択し、従来の LC/TQ と同じ方法でプロダクトイオンの定量を実行しました。メソッド取り込みレートとリテンションタイムウィンドウを最適化してピーク形状の再現性を確保し、感度を最大化して同時プリカーサの数を最小化しました。

LC 機器条件

表 1. EPA メソッド 533 用の LC メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
LC	Agilent 1290 Infinity II LC : Agilent 1290 Infinity II マルチサンブラ (G7167B)、Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)、Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
分析カラム	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、3 × 50 mm、1.8 μm (p/n 959757-302)
ディレイカラム	Agilent ZORBAX RR StableBond C18、4.6 × 50 mm、3.5 μm (p/n 835975-902)
カラム温度	50 °C
注入量	10 μL
移動相	A) 20 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (HPLC グレード) B) メタノール (HPLC グレード)
流量	0.4 mL/min
グラジエント	時間 (分) % B 0.0 5 0.5 5 3.0 40 16.0 80 18.0 80 20.0 95
ストップタイム	20.0 分
ポストタイム	6.0 分

実験方法

LC/MS 分析には、Agilent 1290 Infinity II LC と Agilent 6546 LC/Q-TOF を組み合わせて使用しました。LC 条件は表 1 のとおりです。バイナリポンプとマルチサンブラの間にディレイカラムを配置し、サンプルバイアルで発生する化合物からバックグラウンド混入異物を分離しました。内径 4.6 mm のディレイカラムによって、システム背圧が低く維持されます。分析カラムで、大半の PFAS をベースライン分離できました。システム制御には、Agilent MassHunter Acquisition ソフトウェアバージョン 10.1 を使用しました。データ処理には、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアバージョン 10.1 と MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアバージョン 10.0 を使用しました。Q-TOF メソッドパラメータを表 2 と表 3 に示します。

ターゲット MS/MS プリカーサ

このメソッドは、6546 LC/Q-TOF を用いてエレクトロスプレーネガティブモードで実行されるターゲット MS/MS 取り込みを使用します。

プリカーサイオンの選択とコリジョンエネルギーを含む化合物パラメータは、あらかじめ最適化されています。詳しくは、アプリケーションノート 5991-7951EN をご覧ください。デルタリテンションタイムはできるだけ狭くして、同時プリカーサを最小化しました。パラメータを表 4 に示します。

精密質量プロダクトイオンのトランジションについて定量を実行しました。

検量線用標準の調製

すべての分析対象物を含む 500 ng/mL の化合物希釈済み標準液で高濃度の標準溶液を調製しました。80 % のメタノールで高濃度の標準溶液を連続希釈して、その後使用するキャリブレーションを調製しました。同位体希釈標準および内部標準を添加した後分析を実施しました。

抽出

メソッド 533 に従い、ブランクと最低濃度最小報告レベル (LCMRL) の複製スパイクを含む水サンプル (250 mL) に同位体希釈類縁物を添加し、弱アニオン交換カートリッジを用いて抽出しました。サンプルは水酸化アンモニウム/メタノール溶液で溶出させ、乾燥させて濃度を高めたのち、80 % のメタノールで再溶解しました。分析前に内部標準を添加しました。

LC/MS 機器の条件

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF での EPA メソッド 533 用の LC/MS メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
MS	デュアル Agilent Jet Stream ESI イオン源付き Agilent 6546 LC/Q-TOF
イオン源パラメータ	
ガス温度	230 °C
ガス流量	4 L/min
ネブライザ	20 psi
シースガス温度	375 °C
シースガス流量	12 L/min
キャピラリー電圧 (負)	2,000 V
ノズル電圧 (負)	0 V
MS TOF	
フラグメント	95 V
スキマ電圧	65 V
Oct 1 RF Vpp	750 V

表 3. Agilent 6546 LC/Q-TOF での EPA メソッド 533 用のスペクトルメソッドパラメータ

スペクトルパラメータ	
MS	
質量範囲	100 ~ 1,000 <i>m/z</i>
取り込みレート	50 スペクトル/秒
MS/MS	
質量範囲	40 ~ 650 <i>m/z</i>
取り込みレート	5 スペクトル/秒

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF での EPA メソッド 533 用の化合物メソッドパラメータ (次のページに続く)

化合物	プリカーサイオン (<i>m/z</i>)	リテンションタイム (分)	デルタリテンションタイム (分)	コリジョンエネルギー (V)
PFBA	212.9813	4.25	0.6	8
¹³ C ₃ -PFBA	215.9893	4.25	0.6	8
¹³ C ₄ -PFBA	216.9926	4.25	0.6	8
PFMPA	228.9765	5.16	0.4	12
PFPeA	262.9788	6.18	0.4	8
¹³ C ₅ -PFPeA	267.9956	6.18	0.4	8
PFMBA	278.9739	6.85	0.4	12
HFPO-DA-CO ₂	284.9778	8.95	0.4	4
¹³ C ₃ -HFPO-DA- ¹³ CO ₂	286.9845	8.95	0.4	4
NFDHA	294.9823	7.70	0.8	5
PFBS	298.9460	6.64	0.4	45
¹³ C ₃ -PFBS	301.9563	6.64	0.4	45
PFHxA	312.9762	8.37	0.4	8
PFEESA	314.9412	7.53	0.4	24
¹³ C ₅ -PFHxA	317.9930	8.36	0.4	8
4:2 FTS	326.9779	8.17	0.4	20
¹³ C ₂ -4:2 FTS	328.9844	8.17	0.4	20

表 4. Agilent 6546 LC/Q-TOF での EPA メソッド 533 用の化合物メソッドパラメータ

化合物	プリカーサイオン (m/z)	リテンションタイム (分)	デルタリテンションタイム (分)	コリジョンエネルギー (V)
PFPeS	348.9435	8.69	0.4	40
PFHpA	362.9737	10.42	0.4	0
¹³ C ₄ -PFHpA	366.9869	10.42	0.4	0
ADONA	376.9731	10.71	0.4	12
PFHxS	398.9409	10.59	0.4	49
¹³ C ₃ -PFHxS	401.9509	10.59	0.4	45
PFOA	412.9711	12.16	0.4	4
¹³ C ₂ -PFOA	414.9777	12.16	0.4	4
¹³ C ₈ -PFOA	420.9978	12.16	0.4	4
6:2 FTS	426.9725	12.06	0.4	24
¹³ C ₂ -6:2 FTS	428.9791	12.06	0.4	24
PFHpS	448.9384	12.25	0.4	52
PFNA	462.9683	13.64	0.4	4
¹³ C ₉ -PFNA	471.9985	13.64	0.4	4
PFOS	498.9357	13.67	0.4	50
¹³ C ₄ -PFOS	502.9492	13.67	0.4	50
¹³ C ₈ -PFOS	506.9625	13.67	0.4	50
PFDA	512.9656	14.92	0.4	4
¹³ C ₆ -PFDA	518.9859	14.92	0.4	4
8:2 FTS	526.9676	14.86	0.4	28
¹³ C ₂ -8:2 FTS	528.9738	14.86	0.4	28
⁹ Cl-PF ₃ ONS	530.9015	14.43	0.4	28
PFUnDA	562.9631	15.99	0.4	5
¹³ C ₇ -PFUnDA	569.9865	15.99	0.4	5
PFDoA	612.9604	16.94	0.4	5
¹³ C ₂ -PFDoA	614.9604	16.94	0.4	5
¹¹ Cl-PF ₃ OUdS	630.8960	16.53	0.4	32

結果と考察

クロマトグラフィー

図 1 と図 2 のクロマトグラムは、化合物群ごとに分けられた 1.6 ng/mL の (バイアル内) キャリブレーションから得られたものです。

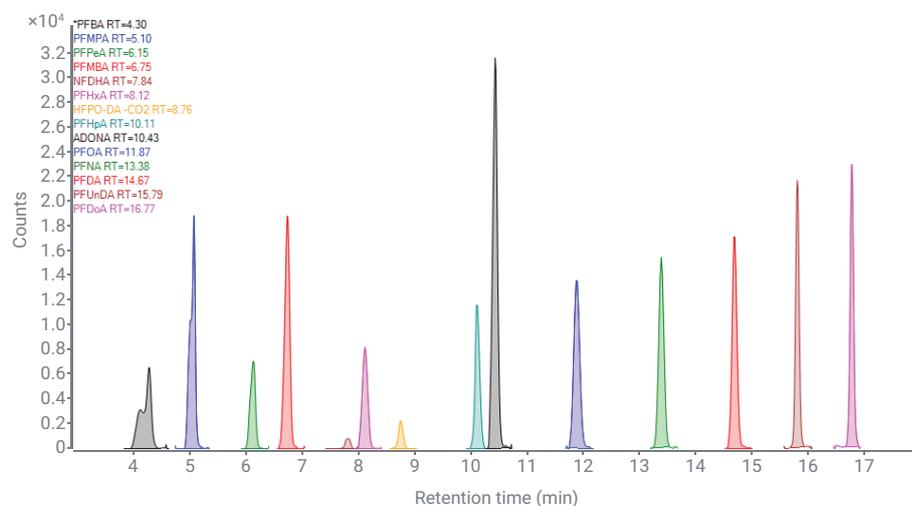


図 1. 1.6 ng/mL の PFAS キャリブレーションでの酸の分離

メソッド性能

すべてのターゲット化合物は、プリカーサイオンから精密質量プロダクトイオンへのトランジションで定量しました。定量時には、二次曲線近似、 $1/x$ の重み付けを使用し、メソッド 533 で定められている原点を適用しました。すべてのターゲットの検量線近似の R^2 が 0.98 を超え、大半が 0.995 を超えています。98 % を超えるプロダクトイオンの質量精度が 2 ppm 以下でした。

システムバックグラウンドを評価しました。ディレイカラムを使用した場合、LC/Q-TOF システムではターゲット化合物のリテンションタイムで PFAS 溶出が見られませんでした。抽出したラボ試薬のブランクでは微量濃度の PFAS が見られましたが、すべて LCMRL 値を大幅に下回りました。

表 5 に機器性能の結果を相対標準偏差 (RSD) で示します。これは中濃度のキャリブレーション (バイアル内で 6.3 ng/mL、水中では 25 ng/L に相当) を繰り返し注入 (n = 9) して算出したものです。すべての PFAS の RSD 値は、メソッド 533 で定められている EPA 要件 (20 %) を大幅に下回っています。この表からは、6546 LC/Q-TOF でターゲット MS/MS 取り込みを用いた場合の LCMRL 推奨値もわかります。これも EPA で定められているレベルより大幅に低くなっています。LCMRL は、EPA メソッド 533 で定義されているガイドラインに従って算出しました。

ノンターゲット分析とレトロスペクティブ分析

Q-TOF 分析の主な利点は、現在と将来のいずれの時点でもノンターゲット化合物を探せることです。分析全体にわたりフル質量スペクトルが収集されます。取り込みの目的がターゲット分析であり、フル MS スペクトルの取り込み時間が非常に短くても、化合物が高濃度で存在すれば、十分な情報を収集し、データベース検索によって正しく同定できます。図 3 に、25 ng/mL のキャリブレーションの 50 Hz のフル MS スペクトルを示します。25 種類の化合物がすべて MassHunter Qualitative Analysis

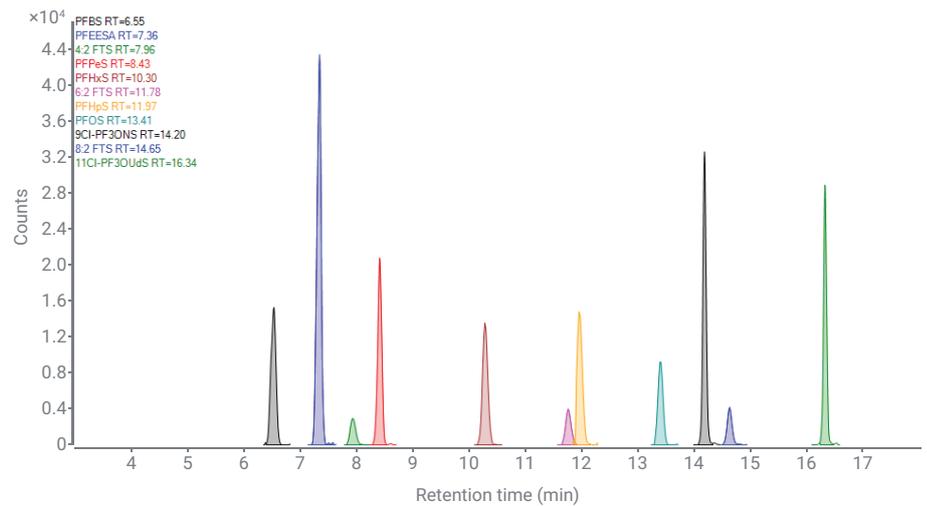


図 2. 1.6 ng/mL の PFAS キャリブレーションでのスルホン酸と FTS の分離

表 5. EPA メソッド 533 に関する Agilent 6546 LC/Q-TOF の性能

化合物	25 ng/L での RSD (n = 9)	Agilent 6546 LC/Q-TOF ターゲット MS/MS LCMRL (ng/L)	EPA メソッド 533 で報告されている LCMRL (ng/L)
PFBA	2 %	2.60	13.00
PFMPA	2 %	0.45	3.80
PFPeA	3 %	2.03	3.90
PFMBA	2 %	0.62	3.70
PFEESA	4 %	0.01	2.60
NFDHA	12 %	5.93	16.00
PFHxA	4 %	0.91	5.30
HFPO-DA-CO ₂	9 %	4.41	3.70
PFHpA	4 %	1.62	2.60
ADONA	4 %	0.61	3.40
PFOA	5 %	1.31	3.40
PFNA	6 %	1.40	4.80
PFDA	3 %	1.21	2.30
PFUnDA	3 %	0.35	2.70
PFDoA	4 %	1.05	2.20
4:2 FTS	6 %	2.91	4.70
6:2 FTS	8 %	4.48	14.00
8:2 FTS	6 %	3.57	9.10
PFBS	3 %	0.61	3.50
PFPeS	2 %	0.35	6.30
PFHxS	4 %	0.99	3.70
PFHpS	4 %	1.67	5.10
PFOS	4 %	0.77	4.40
⁹ Cl-PF ₃ ONS	3 %	0.65	1.40
¹¹ Cl-PF ₃ OUdS	4 %	0.66	1.60

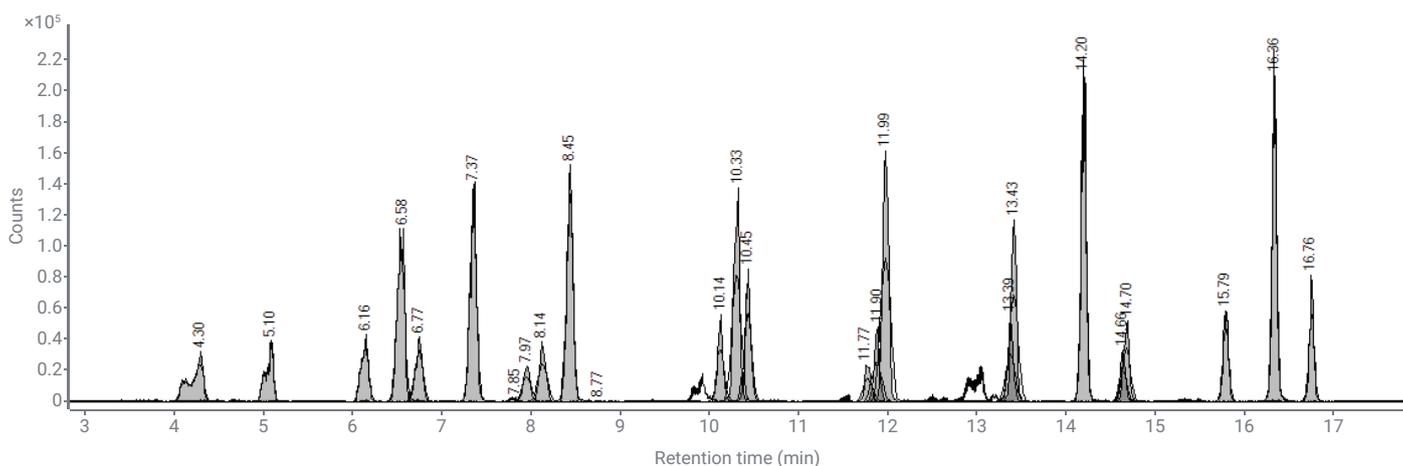


図 3. 25 ng/mL の PFAS キャリブレーションの 50 Hz のフル MS スペクトル

ソフトウェアで Find By Formula アルゴリズムを用いて同定され、このうち 92 % の一致スコアが 80 % を超えています。最低濃度のキャリブレーション（バイアル内で 0.4 ng/mL、水中では 1.6 ng/L に相当）の評価では、25 種類の化合物のうち 17 種類が、80 % を超える一致スコアで同定されています。これ以外にも 5 種類の化合物が最低濃度のキャリブレーションで同定されましたが、一致スコアは 80 % 以下でした。Q-TOF 分析は、サンプル内のターゲット化合物、および未知または新規の混入異物の定量分析に最適です。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 6546 LC/Q-TOF をターゲット MS/MS 取り込みモードで使用すると、US EPA メソッド 533 で定められている PFAS の定量分析の性能要件を満たすのに最適であることを実証しました。6546 LC/Q-TOF をターゲット MS/MS モードで使用すると、EPA 要件である 20 % を大幅に下回る RSD 値を達成できます。また 25 種類の化合物のうち 24 種類で RSD 値が 10 % 未満となります。LCMRL 値については、

EPA で報告されている LC/TQ 使用時の値を少し、または大幅に下回っています。25 種類の化合物のうち 21 種類で、3 ng/L 未満の LCMRL レベルを達成しています。取り込みに LC/Q-TOF を使用すると、EPA が定量要件としているターゲット MS/MS データと、新規の PFAS のスクリーニングとノンターゲット分析に使用できるフル MS スペクトルを同時に収集できます。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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. 2021
Printed in Japan, June 17, 2021
5994-3648JAJP
DE44342.5790625