

LC-HRAM分析による 飲料水に混入した物質のスクリーニング

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

キーワード

ノンターゲット分析、スクリーニング、HRAM、高分解能・精密質量、Orbitrap

はじめに

近年、人工化合物およびその分解生成物による水質汚染や環境汚染などが、自然、公衆衛生に悪影響を及ぼす可能性について、社会的懸念が高まってきました。このため、従来のトリプル四重極質量分析法に比べて多数の汚染物質をより効率的にスクリーニングできる分析法に対する関心が高まっています。高分解能・精密質量（HRAM）フルスキャン分析では、化合物ごとにパラメーターを最適化する必要がなく、目的化合物とマトリクス由来の夾雑物質を正確に分離できます。また、ワークフローに対応したソフトウェアパッケージを組み合わせる使用することにより、データの取得および処理をまとめて実行できます。さらに、水循環の各段階に関する複数の調査データをまとめてデータマイニングすることにより、汚染物質の全体像を把握できます。

HPLC条件

HPLC	Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000
カラム	Thermo Scientific Hypersil™ GOLD aQ C18 カラム、100 x 2.1 mm、粒子径 3.0 μm
カラム温度	25 °C
サンプル注入量	0.25 ~ 5 mL
移動相 A	0.05 % 酢酸・5 mM 酢酸アンモニウム水溶液
移動相 B	メタノール

グラジエント:

Time	A%	B%	μl/min
0.0	100.0	0.0	500.0
10.0	100.0	0.0	500.0
11.0	80.0	20.0	500.0
18.0	0.0	100.0	500.0
25.0	0.0	100.0	500.0
25.1	100.0	0.0	500.0
30.0	100.0	0.0	500.0



メソッド

サンプル前処理

各地点の水サンプルは、分析前に 0.25 μm PTFEシリンジフィルターでろ過しました。

MS条件

質量分析計	Thermo Scientific Q Exactive™
HRAM スキャン範囲	120 ~ 1200 (m/z)
極性切り替え	オフ
分解能	70k (フルスキャン)、35k (ddMS ²)
HCD フラグメンテーション	コリジョンエネルギー、35 eV
イオン源	加熱 ESI イオン源
スプレー電圧 (正 / 負)	4800 V / 3800 V
キャピラリー温度	300 °C
シースガス	60
AUX ガス	15
イオンスイープガス	1
Vaporizer 温度	350 °C

データ処理ツール

ターゲットスクリーニング用

Thermo Scientific ExactFinder™

完全自動データ処理でフルスキャン MS および ddMS² データを解析。同位体パターンマッチング、化合物データベース、スペクトルライブラリなどにより対象化合物を特定。

ノンターゲットスクリーニング用

Thermo Scientific SIEVE™

Thermo Scientific MetWorks™

Thermo Scientific Mass Frontier™

精密質量シグナルに対して提示される元素組成に基づいて ChemSpider で検索。1回の分析で得られたフルスキャン MS と All Ion Fragmentation MS² の情報によりさまざまな側面から解析可能。

結果

SIEVE ソフトウェアを用いた水循環のマッピング

下水処理場 (WWTP) を中心とする数 km² 圏内の数カ所でサンプリングを行いました。具体的には、浄水場、浄水場の放流口、WWTP とその貯水池、病院がある地域の流入経路です。WWTP から浄水場までの各地点に対する WWTP の影響を調べるため、SIEVE ソフトウェアを用いて、カルバマゼピン、フェナゾン、シマジン、トラマドールなど、飲料水源で汚染物質として確認されている 70 の対象化合物をモニタリングしました。これらの化合物は環境残留性が確認されているため、トレーサー物質として使用できます。

各地点から採取したサンプルの差異解析を行いました (図 1)。この際、ブランクをリファレンスとすると、サンプル間の違いに関する情報がスコアとして得られ、スコアが近いサンプルはサンプリング地点が近いことを示します。各地点のサンプルに含まれる対象化合物の傾向は、重ね描きのクロマトグラムとして表示されます。

図 2 に、カルバマゼピンの汚染傾向を示します。カルバマゼピンは、WWTP を通過して浄水場に至っていることが分かります。

図 3 に、SIEVE により WWTP の放流水から流入水のデータを差し引いた結果を示します。この機能により、機器のバックグラウンドノイズを除去することもできます。

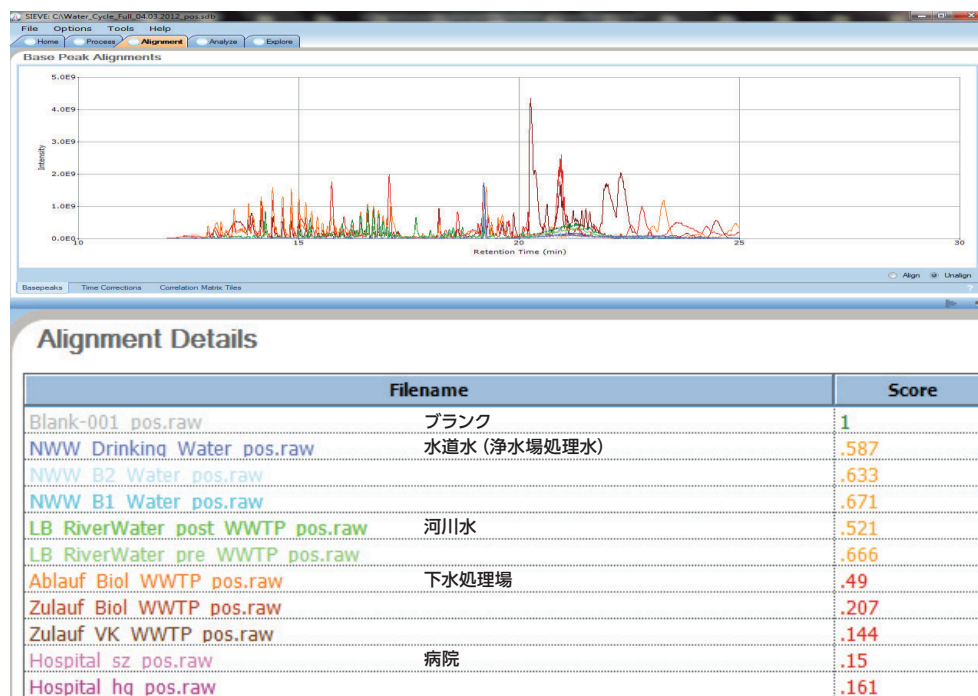
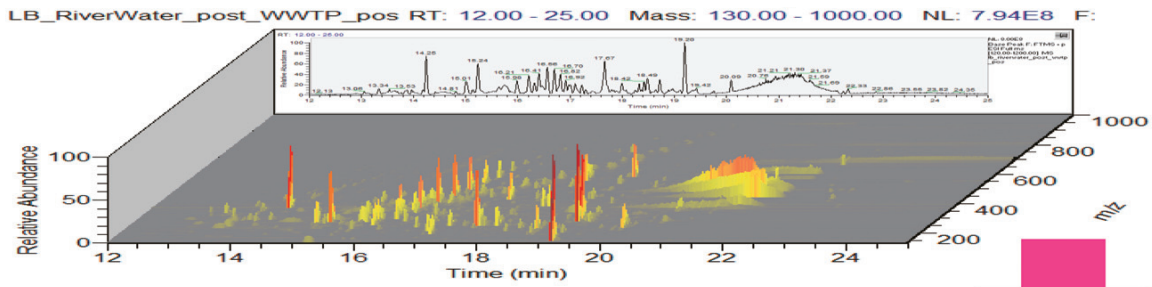


図 1: サンプルの特性比較

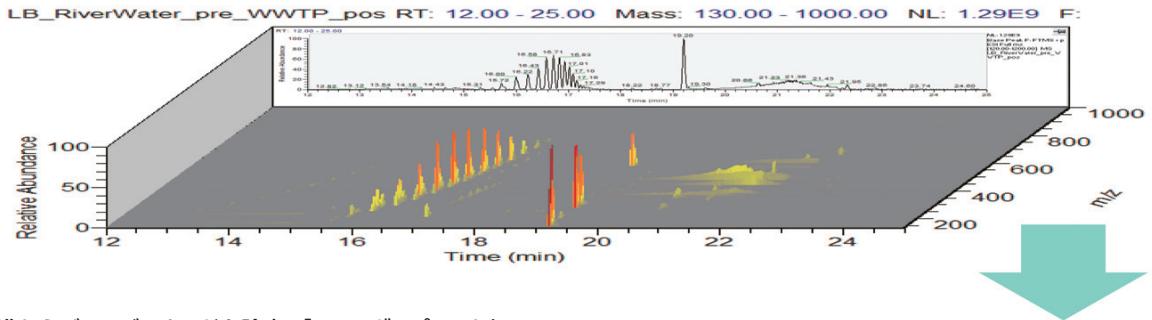


図 2: 各地点におけるカルバマゼピンの分析結果

WWTP放流水 (基準)



WWTP流入水 (バックグラウンド)



基準からバックグラウンドを除去: 「フィンガープリント」

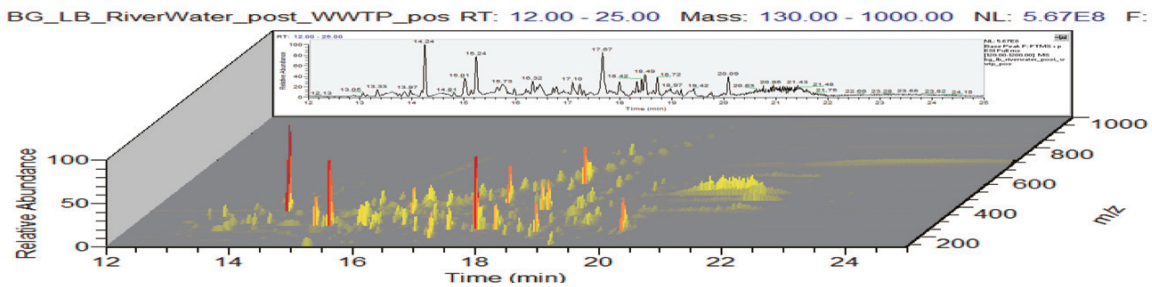


図 3: WWTP流入および放流サンプルのデータ処理 (バックグラウンド除去)

Thermo ExactFinder Method: "Water_Cycle_pos_Gismo" Supr | Log Out | Help

Workflow Method Development Review
Screening Reporting

Type a description to easily identify the method.

General Settings

Lab Name: EFS_FM
Assay Name: Env QE
Description:

Use RT Limits: ☒ Search from: 10.00 minutes to: 20.00 minutes
Use Matrix Blank: ☐ Amplifier: 1
Mass Tolerance: 5 ppm
Smoothing Points: 3
Chromatogram View Width: 1.00 minutes
Use Source CID Scans: ☐

Target Screening Settings

Compound Databases:

Enabled	Database Name
☐	EF5_Database
☒	Water_Cycle_Pos_Final_pos_IL_15.02.2012

Identification and Confirmation Settings

Peaks: ☒ m/z Threshold Override: ☒ 100,000
S/N Ratio Threshold: 3.0

Retention Time: ☒ Identify ☐ Confirm Ignore if Not Defined: ☒
Window Override (sec): ☒ 30

Fragment Ions: ☐ Identify ☐ Confirm Ignore if Not Defined: ☐
Min. # of Fragments: 1
Intensity Threshold: 10,000
Mass Tolerance: 5 ppm

Isotopic Pattern: ☒ Identify ☐ Confirm Fit Threshold (%): 85
Allowed Mass Deviation (ppm): 5
Allowed Intensity Deviation (%): 10
Use Internal Mass Calibration: ☐

Library Search: ☐ Identify ☒ Confirm Score Threshold (%): 50
Use Reverse Library Searching Only: ☐

図 4: ExactFinder メソッド設定

ExactFinder ソフトウェアを用いた同定、確認、定量

一つの処理ステップで確認と定量の両方を行うために、ExactFinder ソフトウェアを使用して、生データから情報を抽出しました。この処理メソッドでは、同定基準として保持時間、精密質量、同位体パターンを用い、確認基準として ddMS² スペクトルを用いたスペクトライブラリマッチングを行いました。メソッド設定の画面を図 4 に示します。

図 5 には、カルバマゼピンの抽出イオンクロマトグラム (XIC) (マストレランス 5 ppm) を示します。同定基準として、標準サンプルとの比較によって確認する精密質量と保持時間に加え、新しい視覚化モードにおける同位体パターンマッチングも使用しました。

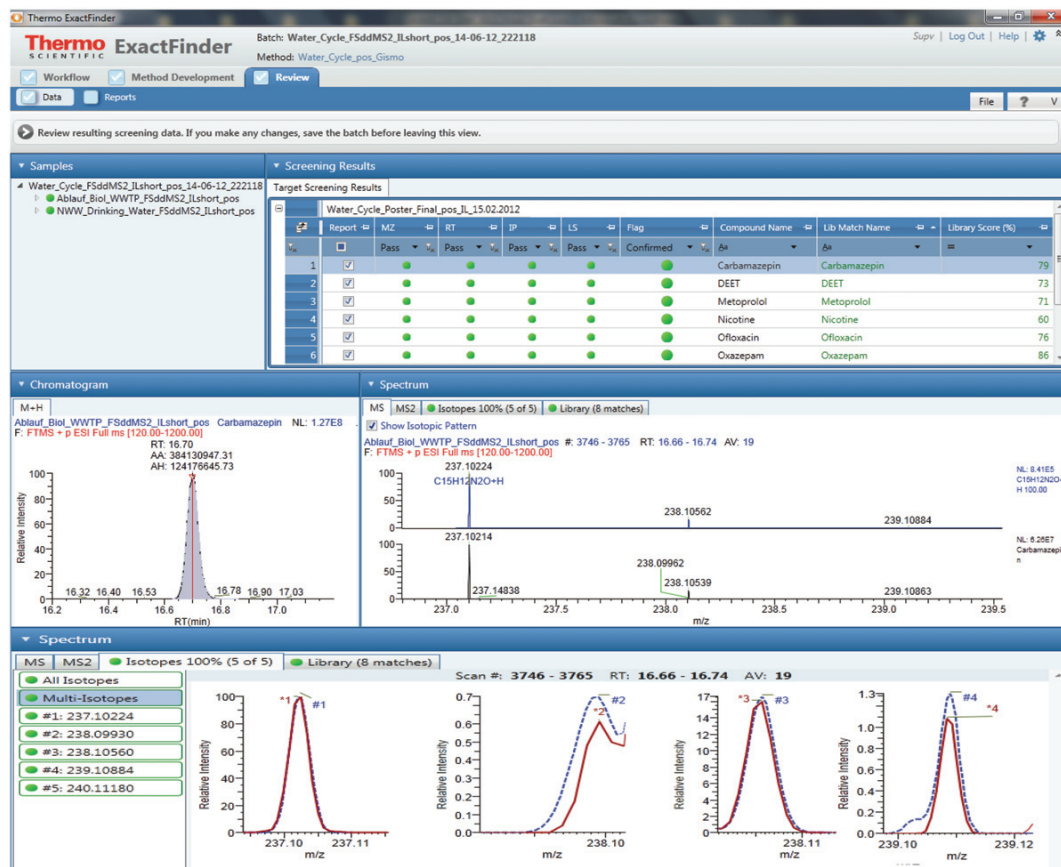


図 5: ExactFinder を用いたターゲットスクリーニングおよび同位体パターンマッチング

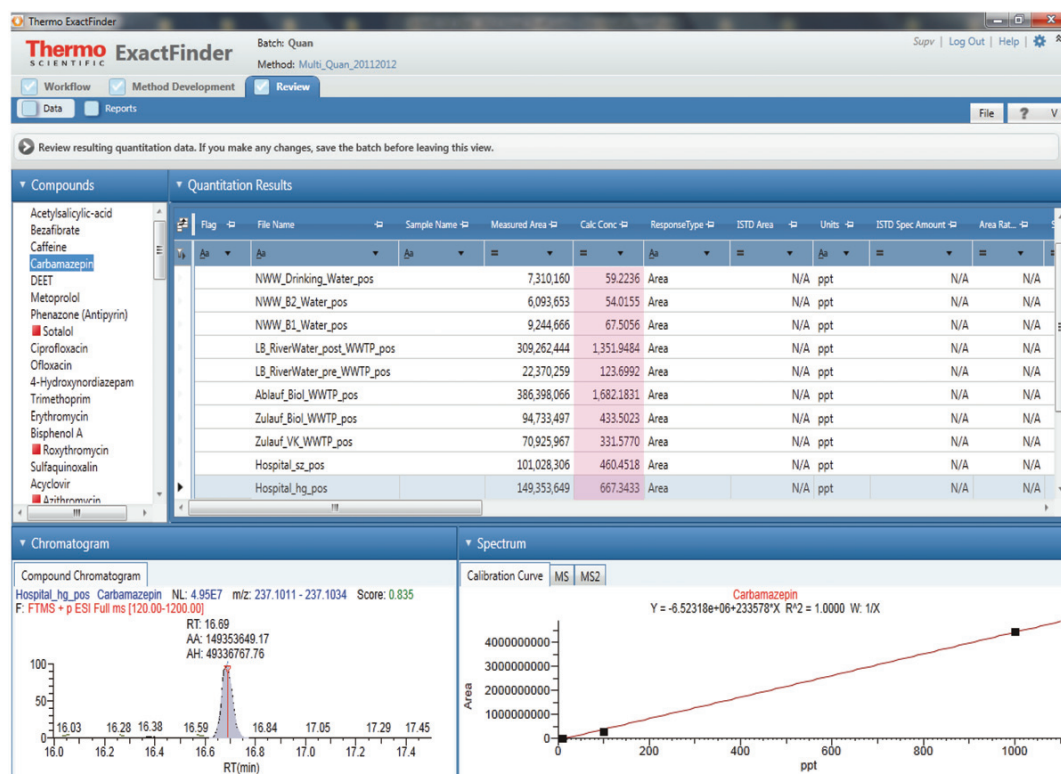


図 6: フルスキャン MS データによるカルバマゼピンの定量

図 6 に定量結果を示します。調査対象とした病院、WWTP 河川水および浄水場処理水におけるカルバマゼピンの濃度が計算されています。フルスキャン MS データに基づいて計算された浄水場処理水サンプルの濃度は、54 ppt および 59 ppt であり、検量線は、10 ~ 1,000 ppt の一次回帰線で作成しました。

図 7 は、スペクトルライブラリとの比較によりカルバマゼピンと確認されたことを示しています。

図 8 は、ddMS² スペクトルと All Ion Fragmentation MS² スペクトルとの比較です。両スキャンとも、同じサンプルバイアルから生成されました。ddMS²では、四重極によってプリカーサーイオンを選別してからフラグメント化するため、鮮明なスペクトルが得られ、スペクトルライブラリとの比較による詳細な確認にも使用できます。これに基づいて、既知化合物スクリーニングまたはターゲットスクリーニングを実施できます。

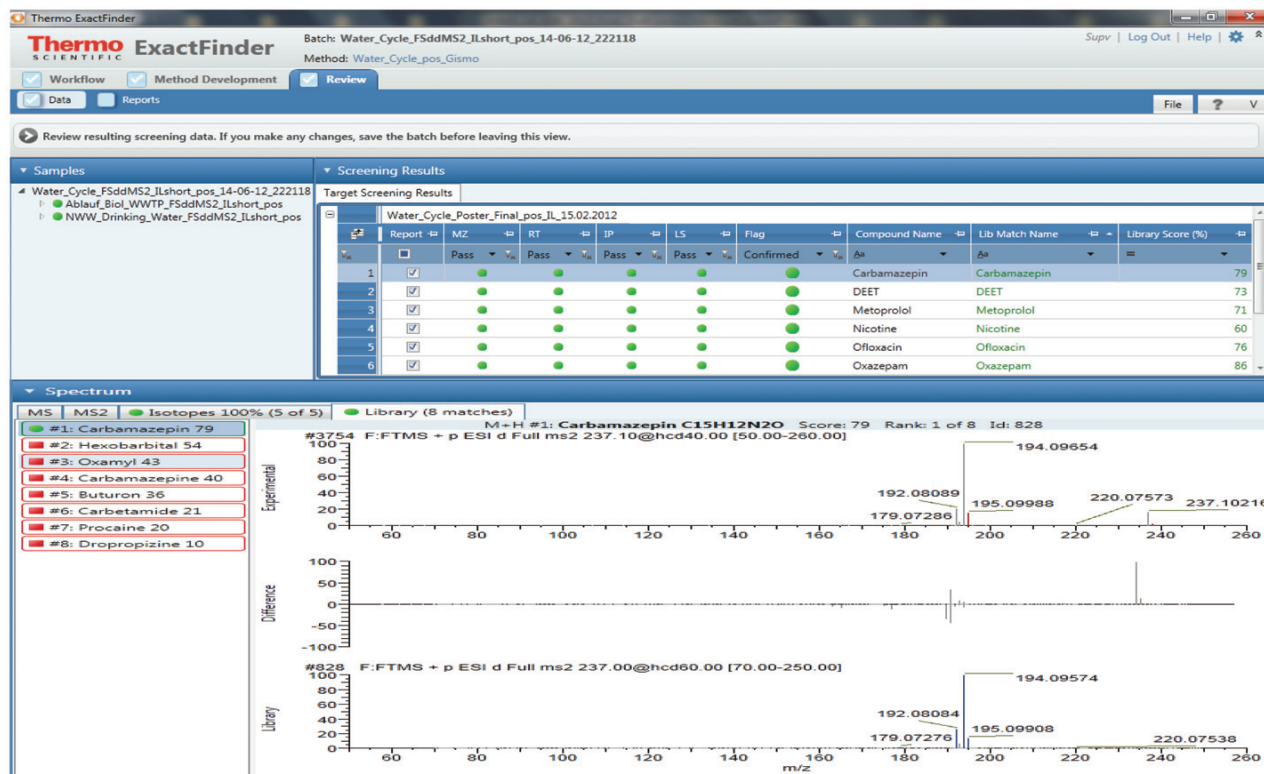


図 7: ExactFinder を用いたスペクトルライブラリによる確認

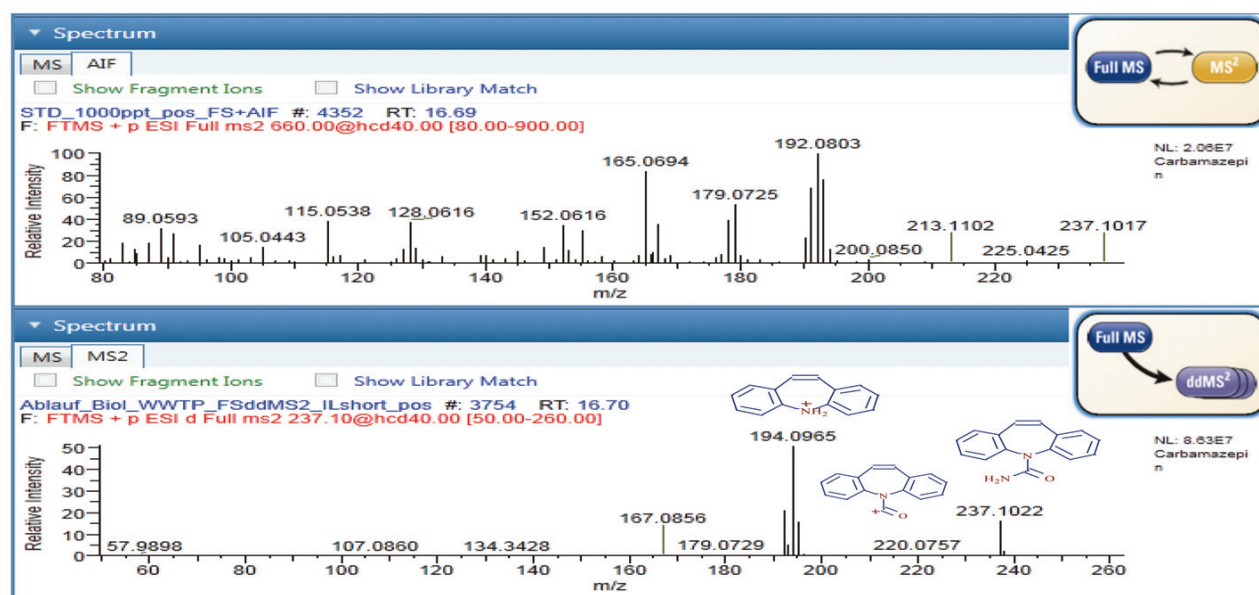


図 8: Q Exactive MS の鮮明なスペクトル (ddMS² データに基づく)

結論

本試験のデータは、Q Exactive フルスキャン MS データと ddMS² データに基づいており、ターゲットスクリーニングのみを目的としています。ノンターゲットスクリーニングでは、フルスキャン MS データと All Ion Fragmentation MS² データを取得することをおすすめします。この手法では、クロマトグラフィーの全時間にわたるフラグメント情報を得ることができます。それに対し、ddMS² による測定法は、保持時間ウィンドウとプリカーサーイオン質量を事前に設定したインクルージョンリストに厳密に基づいてデータを取得します。そのため、これらの情報をインクルージョンリストにあらかじめアップロードしておく必要があります。Q Exactive のインクルージョンリストファイルは、マウスを 1 回クリックするだけで、化合物データベースファイルから生成できます。

ExactFinder ソフトウェアと Q Exactive を併用することで、遡及的データ解析を含め、スクリーニングデータ、および定量データを簡単に解析できます。同位体パターンマルチビューなどの新機能と、改良されたスペクトルライブラリ比較アルゴリズムにより、目的とするデータの探索と抽出をすばやく行うことができます。一方、SIEVEによって地点ごとにデータを比較できるため、ExactFinder 上でモニタリングデータの追加調査とケミカルマスバランスにより、汚染発生源を推測することができます。エクスポートデータには完全な互換性があります。

本アプリケーションノートは、ASMS2013ポスターから抜粋しました。

©2014 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転載を禁じます。

ここに掲載されている会社名、製品名は各社の商標、登録商標です。

ここに掲載されている内容は、予告なく変更することがあります。

ここに記載されている製品は研究用機器であり、医療機器ではありません。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
分析機器に関するお問い合わせはこちら

 TEL 0120-753-670 FAX 0120-753-671
〒221-0022 横浜市神奈川区守屋町3-9

E-mail: Analyze.jp@thermofisher.com
www.thermoscientific.jp

E1404

Thermo
SCIENTIFIC
Part of Thermo Fisher Scientific