

UHPLC–Orbitrap質量分析計による環境汚染物質のターゲット分析、ノンターゲット分析

キーワード

ターゲット分析、ノンターゲット分析、精密質量、Orbitrap質量分析計

はじめに

環境において新たに懸念される汚染物質（CEC）は、一般には未知の物質で、人の健康と環境に危険を及ぼす可能性のある化合物です。CECのモニタリングは、分析能力と利用可能なリソース（ハードウェア、ソフトウェア、分析用標準物質、分析性能など）が限られていたため、全体を把握する方法ではなく、特定の化合物群に焦点を絞る方法で行われていました。このアプリケーションノートでは、61種類のCECのターゲット分析と312種類のCECのノンターゲット分析に使用できる新しい分析メソッドを紹介します。このメソッドには、固相抽出（SPE）、超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）分離、Thermo Scientific™ Orbitrap™ 質量分析計、Thermo Scientific TraceFinder™ソフトウェアを使用しました。また、廃水処理場（WWTP）サンプルを用いて、本メソッドを評価しました。

メソッド

サンプリング

サンプルは、硝化プロセスおよび紫外線消毒処理を行っている1カ所のパイロットWWTP（図1）および2カ所のWWTP（図2）から採取しました。スクリーニング後、廃水からの一次サンプルは、エアレーション沈殿槽（図1と図2のS1）および濃縮廃液活性汚泥槽（図1のS2）から採取しました。さらに、一次沈降（この時点で沈殿した固形物は除去）および最初の塩化第二鉄添加（沈殿中の亜リン酸を低減する目的）後のサンプルも一次廃水サンプルとしました（図2のS3）。二次廃水サンプルおよび最終サンプル（図2のS4およびS6）と、透過液サンプル（図1のS5）も採取しました。以上の10サンプルは分析開始まで4 ± 2 °Cで保存しました。

試薬、サンプル前処理、

UHPLC–Orbitrap質量分析計による分析

HPLCグレードのアセトニトリルおよびメタノールは、Fisher Scientific™製を用いました。水系移動相およびサンプル前処理には、Thermo Scientific Barnstead™ Nanopure™超純水装置で生成した水を用いました。Laboratory Services NBranch (LaSB) メソッド E34541にしたがって、ターゲット化合物の分析およびノンターゲット化合物スクリーニングのためのサンプル前処理を行いました。抽出にはWaters社製OASIS™ HLB固相抽出（SPE）カートリッジ（6 cc、500 mg）を使用しました。

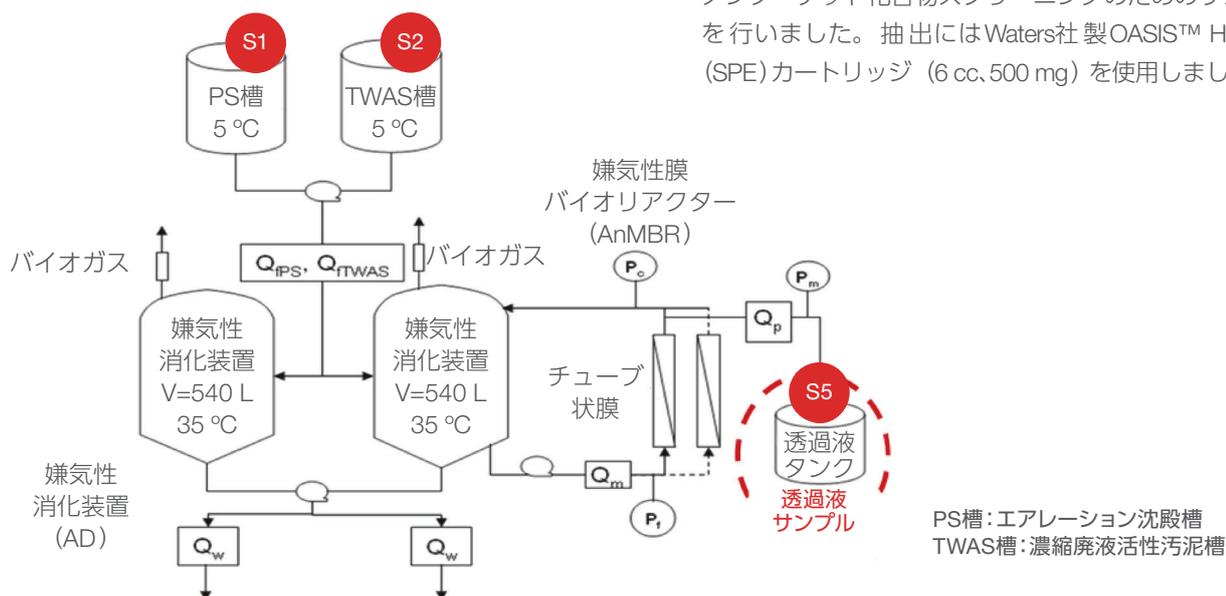


図1: パイロットWWTPの概略図 (S1、2、5がサンプリングポイント)

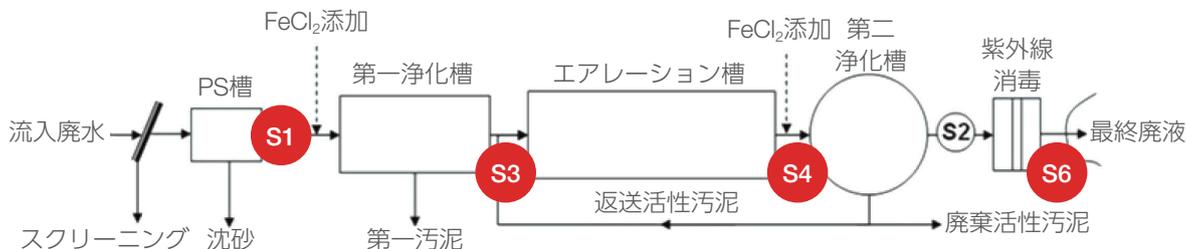


図2: 4カ所のサンプリングポイントが示されたWWTPの概略図

ターゲット化合物の標準物質は、Sigma-Aldrich社製を用いました。重水素 (D) および ^{13}C で標識した標準物質は、CDN Isotopes社製およびCambridge Isotope Laboratories社製を用いました。ターゲット化合物および同位体で標識した標準物質の原液とメタノールを混合し、混合標準溶液を調製しました。さらに混合標準溶液をメタノールで希釈して、5種類の濃度の分析用標準溶液を用意しました。

サンプル分析は、Thermo Scientific UltiMate™ HRG-3400RSバイナリポンプ、Thermo Scientific UltiMate WPS-3000オートサンプラー、Thermo Scientific UltiMate TCC-3400カラムコンパートメントで構成されるThermo Scientific Dionex™ UltiMate 3000 UHPLCを用いて実施しました。5 μ Lの抽出液をThermo Scientific Betasil カラム (ポジティブモード) およびAgilent XDB C-18、2.1x100 mmコアシェルテクノロジーカラム (ネガティブモード) にそれぞれ注入し、Orbitrap質量分析計により、それぞれ検出しました (参考文献1のHPLC条件参照)。UHPLCは、加熱エレクトロスプレーイオン化 (H-ESI II) インターフェイスを介してThermo Scientific Exactive™ Plusと接続しました。Exactive Plusは、標準混合物MSCAL5およびMSCAL6を注入して、ポジティブモードとネガティブモードでチューニング、キャリブレーションを行いました。ESIでは高純度窒素 (> 99%) を使用しました (35 L/min)。スプレー電圧は、ポジティブモードは2,500 Vとネガティブモードは3,200 Vでした。データは、分解能140,000 (m/z 200における FWHM) で取得し、オートゲインコントロール値を 1.6×10^6 、およびC-trap Injection Timeを50 msecとした場合は1秒間当たりのデータ取得は1.5回以上でした。

データ分析

TraceFinderソフトウェアを用いて61種類のCECを対象とした定量的ターゲット分析を行いました。また、312種類のCECを登録したデータベースも併用して、ノンターゲットスクリーニングを行いました。このデータベースには、医薬品由来化合物、ステロイド、ホルモン、界面活性剤、有材フッ素化合物のデータが登録されています。TraceFinderソフトウェアでは、データベースに登録されている化合物に関し、ポジティブモードでは $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、ネガティブモードでは $[M-H]^-$ を探索するように設定しました。

質量抽出範囲 (mass extraction window) を5 ppmとして、抽出イオンクロマトグラム (XIC) を作成しました。対象物質はXICの面積値の閾値が50,000 (化合物により約25~ 50 pg/mL [ppt]) 以上のものについて、モノアイソトピック質量 (M) の質量精度 5 ppm以内、同位体 (M+1) の相対強度変動10%未満、Fit threshold (相同性スコア) 90%以上という条件に基づいて自動的に同定しました。312種類のCECデータベースを用いた場合の平均的なスクリーニング分析に要する時間は、1サンプル当たり65秒でした。分析結果の上位10%にある化合物について個々に解析し、Microsoft™ Excel™にエクスポートしました。

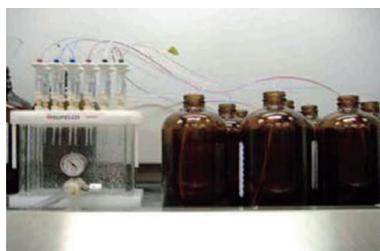
結果

ターゲット化合物スクリーニング分析

表1に、採取した各サンプルのターゲット化合物スクリーニング分析の結果と、今回のメソッドにおける各化合物の検出限界 (MDL) を示します。61種類のターゲット化合物のうち21種類が、分析対象の10サンプルから検出されました。



グラブサンプルは1 Lの茶色ガラスボトルに採取



ろ過したサンプルは、Waters HLB SPEカートリッジを用いてpH 7で抽出処理



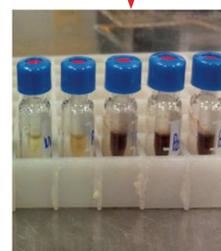
抽出物は乾固処理



TraceFinderソフトウェアを用いたノンターゲット分析



UHPLC-Orbitrap質量分析計による分析



250 μ Lのバイアルインサート中で100 μ LのH₂Oを加えて再水和

図3: サンプル前処理およびUHPLC-Orbitrap MSによる分析

表1: ターゲット化合物スクリーニング分析の結果 (#1はパイロットWWTP、#2と3は稼働WWTP)

(単位: ng/L)

	MDL	S1 (#1)	S1 (#2)	S1 (#3)	S2 (#1)	S3 (#2)	S3 (#3)	S4 (#3)	S5 (#1)	S6 (#2)	S6 (#3)
アセトアミドフェノール	100	<MDL	<MDL	578.5	111.5	1952.5	4026.5	<MDL	<MDL	105.0	<MDL
アテノロール	50	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	143.5	579.5	288.5	<MDL	<MDL	<MDL
アトルバスタチン	10	147.5	3419.5	3417.5	107.5	<MDL	165.0	<MDL	3419.5	110.0	72.5
ベザフィブラート	20	<MDL	<MDL	<MDL	49.0	53.0	109.0	23.0	<MDL	<MDL	<MDL
カフェイン	20	147.5	75.5	525.0	34.5	4426.5	<MDL	35.0	<MDL	288.0	105.5
カルバドックス	200	<MDL									
カルバマゼピン	2	332.5	<MDL	<MDL	107.0	24.0	235.5	115.0	<MDL	262.0	183.5
シプロフロキサシン	100	918.0	289.0	289.5	316.0	304.5	319.5	315.0	298.5	606.5	536.0
DEET	150	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	338.5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
ジクロフェナクナトリウム	100	<MDL	<MDL	<MDL	166.5	<MDL	148.5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
ヒドロコルチゾン	5	1781.5	<MDL	<MDL	7.5	8.0	11.0	9.5	<MDL	976.5	636.5
リドカイン	10	38.0	<MDL	<MDL	114.0	<MDL	118.5	54.5	<MDL	32.5	35.5
オキシリニン酸	20	<MDL	<MDL	<MDL	81.0	<MDL	125.5	49.0	<MDL	<MDL	<MDL
プロゲステロン	20	29.0	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	957.5	<MDL	<MDL	108.5	<MDL
ビスフェノール A	200	4458.0	617.5	1252.5	522.0	1211.0	1675.5	213.0	249.0	3621.5	3383.5
エキリン	50	1619.0	449.5	<MDL	<MDL	678.0	1531.0	1337.0	<MDL	1441.0	345.5
エストリオール	200	<MDL	472.5	<MDL	1006.0	216.5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
ゲムフィブロジル	10	<MDL	121.5	193.0	281.0	174.0	125.0	77.5	127.0	260.0	227.0
オキシベンゾン	50	158.5	346.0	<MDL	170.0	237.0	166.5	170.0	196.0	159.5	159.5
トリクロカルバン	50	<MDL	734.0	429.0	366.5	1176.5	532.0	247.5	411.0	<MDL	<MDL
トリクロサン	120	3068.5	<MDL	<MDL	2422.0	<MDL	<MDL	<MDL	343.5	777.5	912.0

※ MDL: メソッド検出限界

ノンターゲット化合物のスクリーニング分析

ノンターゲット化合物の同定には、モノアイソトピックピークMおよび同位体 (M+1) ピークの精密質量、M/ (M+1) ピークの相対強度、ハロゲン化合物の同位体パターンを使用します。また、マススペクトルの主要なフラグメントイオンに関するXICクロマトグラムを個々に解析すると、分析結果の信頼性が向上します。図4は、合成ピレスロイド系殺虫剤の一般的な一次代謝産物である3-フェノキシ安息香酸 (図4A)、生体異物であるハロゲン含有3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸 (図

4B)、人工甘味料であるスクラロース (Splenda™) (図4C) の陽性同定例です。図5は、農薬アトラジンの環境代謝産物であるデセチルアトラジンの偽陽性同定例です。モノアイソトピックピークMの質量誤差が0.2454 ppmで、XICが左右対称なピーク形状を示しているため、デセチルアトラジンの陽性同定例とも考えられます。しかし、同位体パターンの塩素の部分が一致していないことから、この化合物はデセチルアトラジンではないと結論づけることができます。

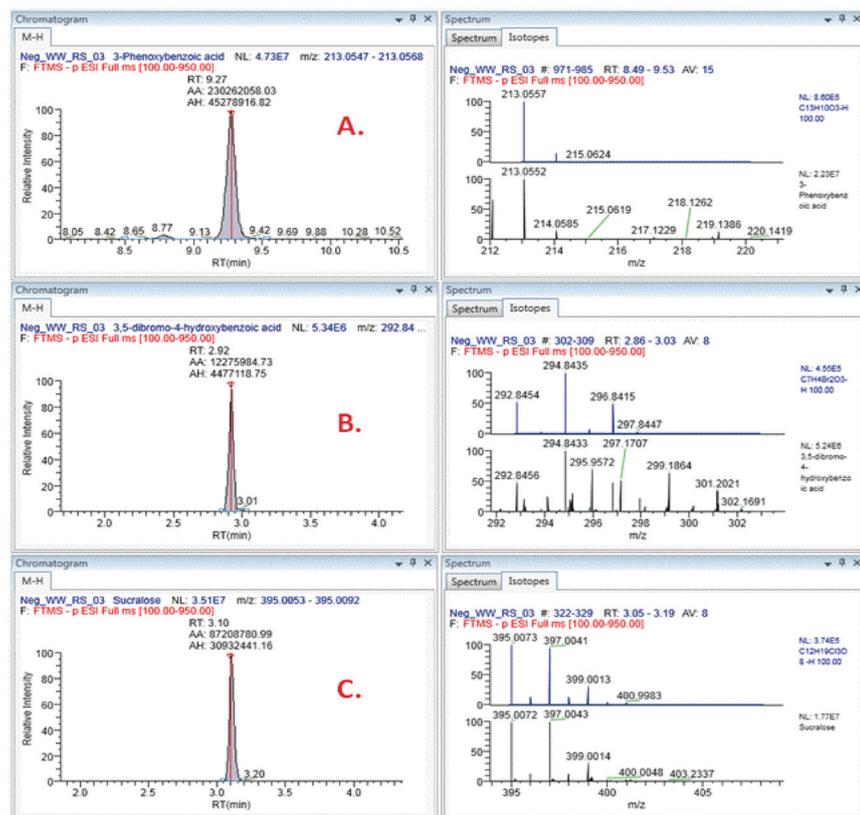


図4: 陽性同定例

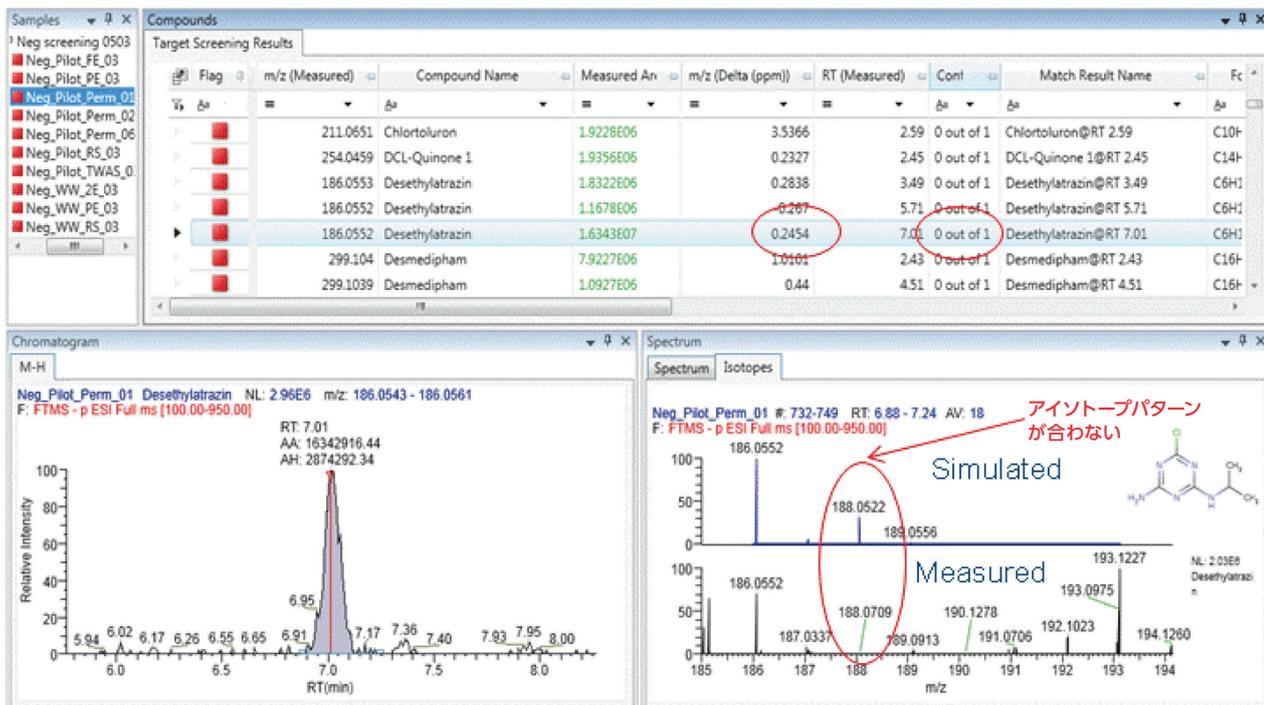


図5: 偽陽性同定例

表2に、WWTPから採取した10サンプルのノンターゲット化合物スクリーニング分析の結果と、312種類のCECデータベースを用いたポジティブモードとネガティブモードにおける検出率を示します。上位10%にあたる48化合物のうち、同定された化合物はビスフェノールAのみでした。

表2: ノンターゲット化合物スクリーニング分析の結果

化合物名	出現率
ベンゾトリアゾール	100%
メチルベンゾトリアゾール	100%
N,N-ジデスベンラファキシン	100%
N-デスベンラファキシン	100%
O-デスベンラファキシン	100%
トラマドール	100%
ベンラファキシン	100%
ラモトリギン	100%
メトプロロール	100%
アクリジン	100%
ジノセブ	100%
n-ペルフルオロオクタン酸	100%
ガラキソリドン	100%
ノニルフェノールモノエトキシレート	100%
ペルフルオロオクタンスルホン酸塩	100%
カルバマゼピン-10,11-エポキシド	100%
10,11-エポキシド-カルバマゼピン	100%
OH-カルバマゼピン	100%
フェノフィブリン酸	100%
3-フェノキシ安息香酸	90%
スクラロース	90%
ノニルフェノールジエトキシレート	90%
Di-OH-カルバマゼピン	90%
ペルフルオロヘキサンスルホン酸	90%

化合物名	出現率
ジメチルイソプロピロチロン	80%
プリミドン	80%
3-(4-メチルベンジリデン)-カンファー	70%
パルサルタン	70%
アクリドン	60%
ジメタクロル	60%
2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾール	50%
4-メトキシけい皮酸-2-エチルヘキシル	50%
クラリスロマイシン	50%
パルサルタン	80%
OH-ジクロフェナク	80%
2-(2,4-ジクロロフェノキシ)-フェノール	80%
5-クロロ-2-(2-クロロフェノキシ)-フェノール	80%
5-クロロ-2-(4-クロロ-2-ヒドロキシ-フェニル)フェノール	80%
5-クロロ-2-(4-クロロフェノキシ)-フェノール	80%
イルベサルタン	70%
ベンタゾン	70%
エトフメセート	70%
オキサゼパム	70%
プロメトン	60%
テルブメトン	60%
フェナゾン (アンチピリン)	60%
プリミドン	60%
フルコナゾール	60%

結論

UHPLC-Orbitrapにより、医薬品由来化合物、内分泌かく乱化合物、環境代謝産物を含む、ターゲット化合物およびノンターゲット化合物スクリーニング分析を実現しました。また、Orbitrap質量分析計とTraceFinderソフトウェアの組み合わせにより、汚染物質のターゲット分析およびノンターゲット分析においてデータ品質が向上し、信頼性の高い分析結果が得られることが証明されました。

ターゲットおよびノンターゲット化合物を明確に同定するには、半値幅が3~5秒のクロマトグラムピークが得られる2.1x100 mm UHPLCカラムを用いて、質量分解能140,000で分離する必要があります。Orbitrap質量分析計は、これらの分析に十分な分解能を有しています。

また、モノアイソトピック (M) および同位体 (M+1) ピークの精密質量と、その相対強度 $M / (M+1)$ に基づいて同定することにより、信頼性の高い結果が得られます。SANCO (参考文献2) によって提案されているフラグメントイオンによる確認、ライブラリ検索、UHPLCの補足的データが結果の信頼性向上に寄与できます。

参考文献

1. “The Determination of Emerging Organic Pollutants in Environmental Matrices by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)”, Ontario Ministry of the Environment method E3454. laboratoryservicesbranch@ontario.caより入手可能。
2. “Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed”, Document N° SANCO/12495/2011.

本アプリケーションノートの内容は、ASMS2013ポスターから抜粋しました。

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. 無断複写・転写を禁じます。 LCMS008_B171110B
ここに記載されている会社名、製品名は各社の商標または登録商標です。
ここに記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

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC