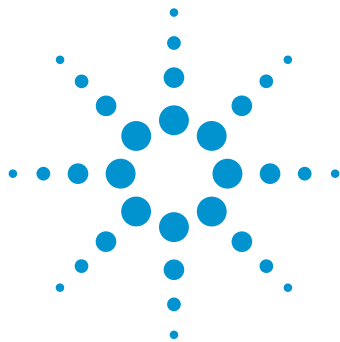




高感度 UHPLC トリプル四重極 LC/MS によるサイクルタイムの最適化と水中 PPCP のハイスループット分析

アプリケーションノート

環境分析

著者

Behrooz Zekavat, Thomas Glauner, Craig Marvin, André Santos, Tarun Anumol, and Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

概要

医薬品およびパーソナルケア製品 (PPCP) は表流水中の汚染物質となります。表流水中の PPCP の存在は野生生物に有害な作用を及ぼします。一方、低濃度の PPCP は、液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析システム (LC/MS/MS) の前に時間のかかる固相抽出 (SPE) を使用するため、ハイスループット分析を実現する上で重大な分析課題をもたらします。さらに、PPCP は化合物クラスおよび化学的特性もきわめて多様です。このために、ハイスループットで包括的な分析を実現するには、ポジティブおよびネガティブイオン化機能を搭載した高感度 MS システムが必要です。

このアプリケーションノートでは、イオンファンネルを搭載したトリプル四重極 LC/MS システムで PPCP 分析のスループットを高めるために MRM 間ディレイタイムを最適化する変更を加えたソフトウェアおよびファームウェアを評価しています。また、これにより、SPE が不要でサンプルのダイレクト注入が可能となります。

表流水サンプルに 0.5 ng/L の低い濃度で含まれる 32 種類の PPCP 候補物質のスクリーニングと定量分析から得られた、高真度かつ高精度の評価結果も示しています。



Agilent Technologies

実験方法

試料調製

選択した PPCP の純粋な標準溶液 (EPA メソッド 1694 と事前に報告された水質汚染物質からの 32 種類の化合物) は、Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) から購入しました。標準溶液は Milli-Q 水で 0.1 ng/L ~ 1,000 ng/L の範囲に調整しました。ドイツの 2 つの異なる川の表流水 (サンプル 2A と 3A) と廃水処理施設からの流出物 (サンプル 4A) を含む 3 種類の由来の異なる水サンプルを PPCP について定量的に分析しました。サンプル前処理は、それぞれのサンプル量を 0.22 mm フィルタを通してサンプルバイアルへ入れるフィルタリングで構成しました。その後、40 µL を LC/MS/MS システムに直接注入して分析しました。PPCP は MRM を極性切り替えモードで使用して検出しました。

LC/MS/MS

UHPLC-MS/MS 分析は、Agilent 1290 Infinity II UHPLC システムと Agilent Jet Stream (AJS) イオン源を搭載した Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS システムで実行しました。

結果と考察

水サンプル中 PPCP の
高速 LC/MS/MS 分析

調整した PPCP 標準を使用して UHPLC/MS/MS メソッドの初期最適化を行いました。図 1 は水に含まれる選択済みの 32 種類の 20 ng/L 濃度の PPCP の MRM クロマトグラムの重ね表示です。ほとんどの化合物を 0.5 ng/L の低い濃度で検出できサンプル濃縮は不要でした。

表 1. Agilent Jet Stream イオン源を搭載した Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS の条件。

パラメータ (s)	設定
乾燥ガスの温度および流量	250 °C および 16 L/min
ネブライザ圧力	40 psi
シースガスの温度および流量	400 °C および 12 L/min
キャピラリ電圧	3 kV (pos)/3 kV (neg)

表 2. Agilent 1290 Infinity UHPLC の条件。

パラメータ	設定														
カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus RRHD C18、2.1 × 50 mm														
カラム温度	60 °C														
注入量	40 µL														
オートサンブラ温度	4 °C														
ニードル洗浄	15 秒 (80 % MEOH/20 % 水)														
移動相	A) 水 (0.03 % ギ酸) B) アセトニトリル														
流量	0.5 mL/min														
溶媒のグラジエント (ポストラン = 1 分)	<table><tr><th>時間 (分)</th><th>%B</th></tr><tr><td>0.0</td><td>15</td></tr><tr><td>0.5</td><td>15</td></tr><tr><td>6.0</td><td>60</td></tr><tr><td>6.1</td><td>100</td></tr><tr><td>6.4</td><td>100</td></tr><tr><td>6.5</td><td>15</td></tr></table>	時間 (分)	%B	0.0	15	0.5	15	6.0	60	6.1	100	6.4	100	6.5	15
時間 (分)	%B														
0.0	15														
0.5	15														
6.0	60														
6.1	100														
6.4	100														
6.5	15														

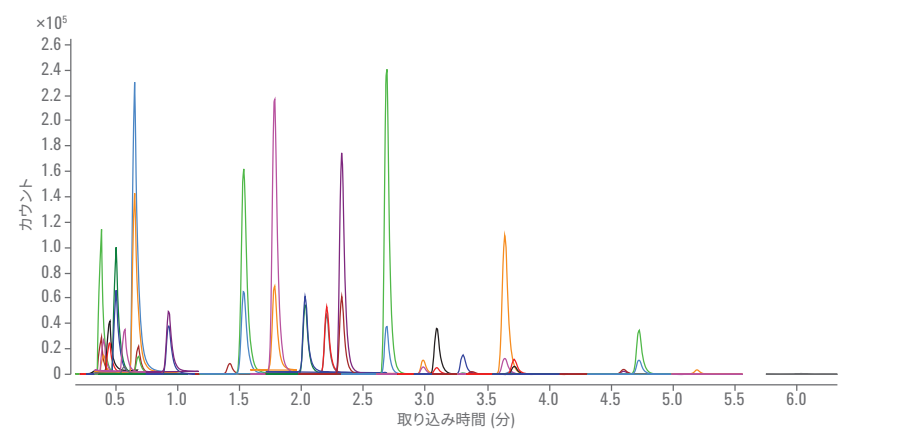


図 1. Agilent 6495 トリプル四重極 LC/MS で分析した 20 ng/L 混合物の 40 µL 注入による選択済み PPCD の MRM クロマトグラムの重ね表示。分析は 6 分以内に終了しました。

モニタリングした PPCP MRM トランジションのほとんどを 0.5 ms ドウェルタイムで検出できました。5 ms ドウェルタイムと比較してシグナルのロスはさきめて少ないものでした。図 2 は、最適化した MRM 間ディレイタイムを使用して収集したベンラファキシンとカルバマゼピンのドウェルタイム 0.5 ms および 5.0 ms での MRM クロマトグラムを示しています。図 2 のデータは、イオンシグナルを短いドウェルタイムで維持するために、適切な MRM 間ディレイタイムの使用が重要であることを示しています。

水中の PPCP 分析の真度と精度

PPCP の真度と精度は 0.5 ng/L ~ 1,000 ng/L の濃度で評価しました。

図 3 は、0.5 ng/L の定量下限 (LLOQ) から 1 µg/L の定量上限 (ULOQ) までの範囲で最大 11 種類の標準濃度で評価したジクロフェナク (ネガティブモード) とベンラファキシン (ポジティブモード) の検量線を示しています。真度と精度は各濃度で 10 回繰り返し注入して計算しました。優れた分析精度 (LLOQ で RSD % < 10 %) と平均真度 (85 ~ 112 %) が得られました。

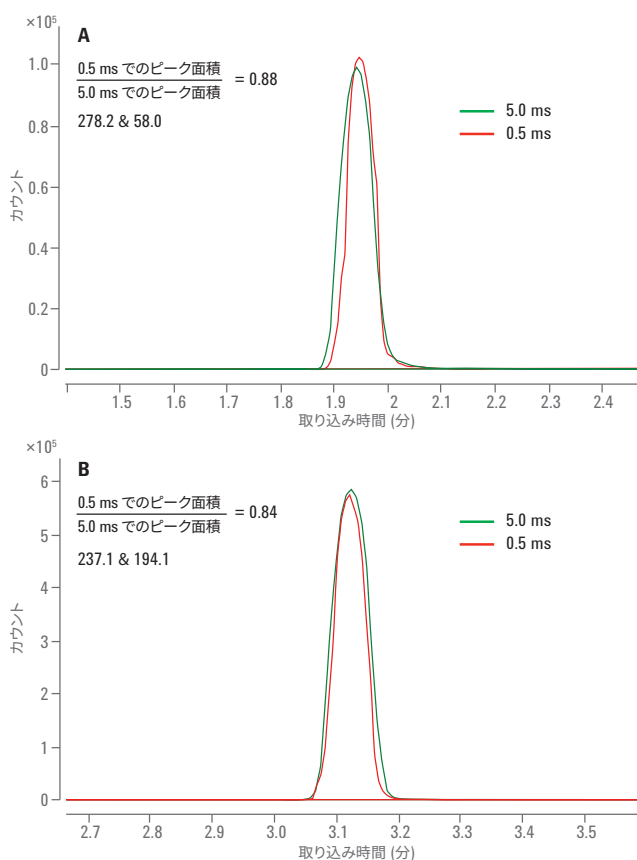


図 2. 最適化した MRM 間ディレイタイムを使用したドウェルタイム 0.5 および 5.0 ms でのベンラファキシン (A) とカルバマゼピン (B) (100 ng/L) の MRM クロマトグラムの重ね表示。

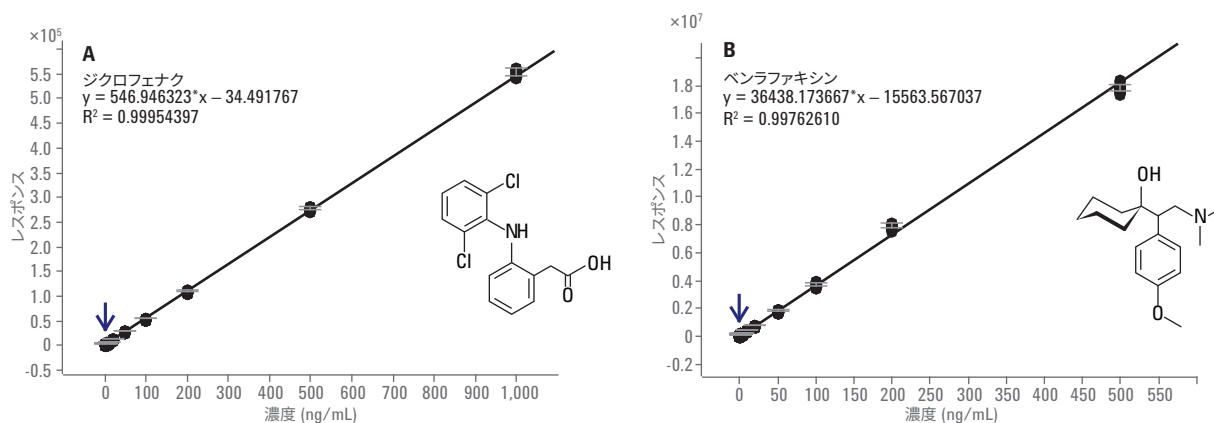


図 3. 定量の真度とピーク面積 RSD を評価した水中のジクロフェナク (ネガティブモード) とベンラファキシン (ポジティブモード) の検量線。

図 4 は今回の調査で 0.5 ng/L で評価した 2 種類の PPCP サンプルの MRM クロマトグラムの重ね表示です。再現性のある応答 (RSD % < 10 %) をアトラジン (4A) とジルチアゼム (4B) のクオンティファイアイオンとクオリファイアイオンの両方について対象分析物のサブ ng/L 濃度で観測しました。

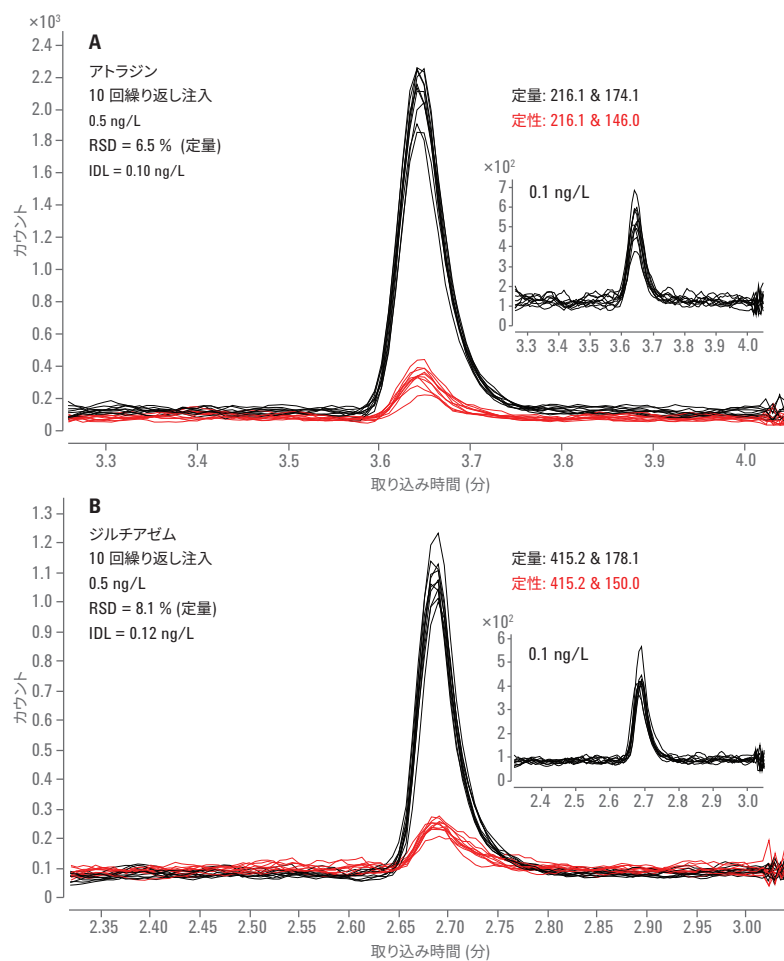


図 4.アトラジン (A) とジルチアゼム (B) の 0.5 ng/L レベルでの 10 回繰り返し注入から得られた MRM クロマトグラムの重ね表示。

表流水サンプル中の PPCP のスクリーニング

図 5 は、UHPLC/MS/MS メソッドによる 3 種類の表流水サンプルの分析で得た PPCP のスクリーニング結果です。図 5 のデータは分析した 3 種類の水サンプルの異なる PPCP プロファ

イルを示しています。このデータを使用すると、表流水の汚染の出所源の特定や水処理施設の効率のモニタリングを行うことができます。

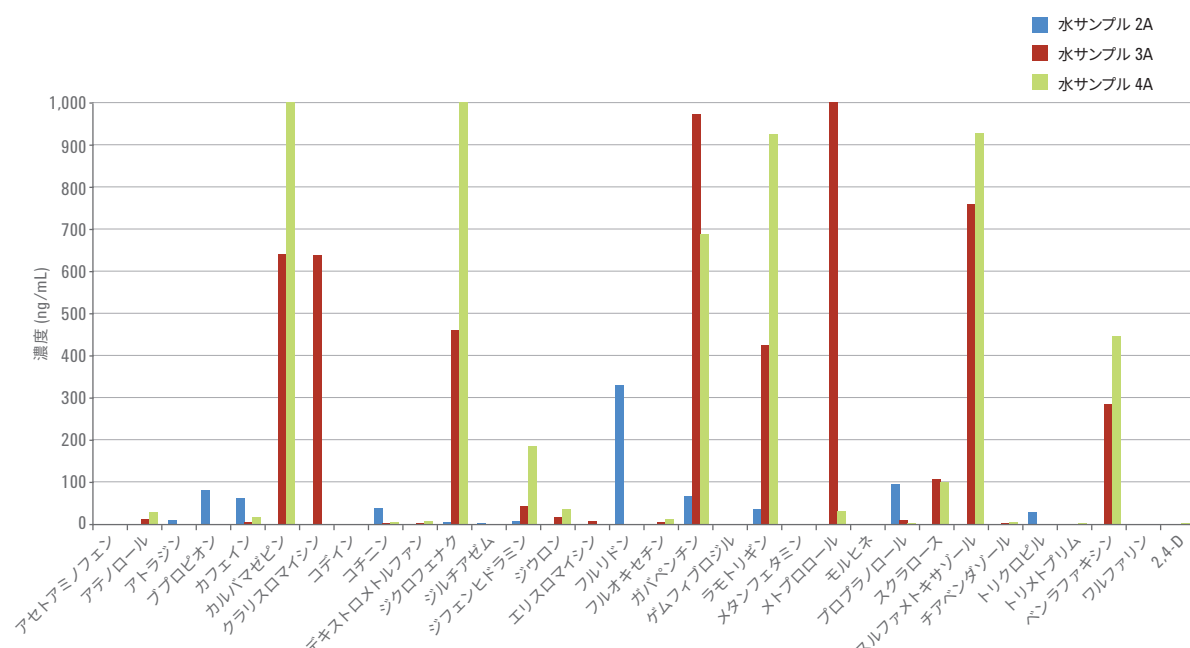


図 5. 3 種類の表流水サンプルについての PPCP スクリーニング結果

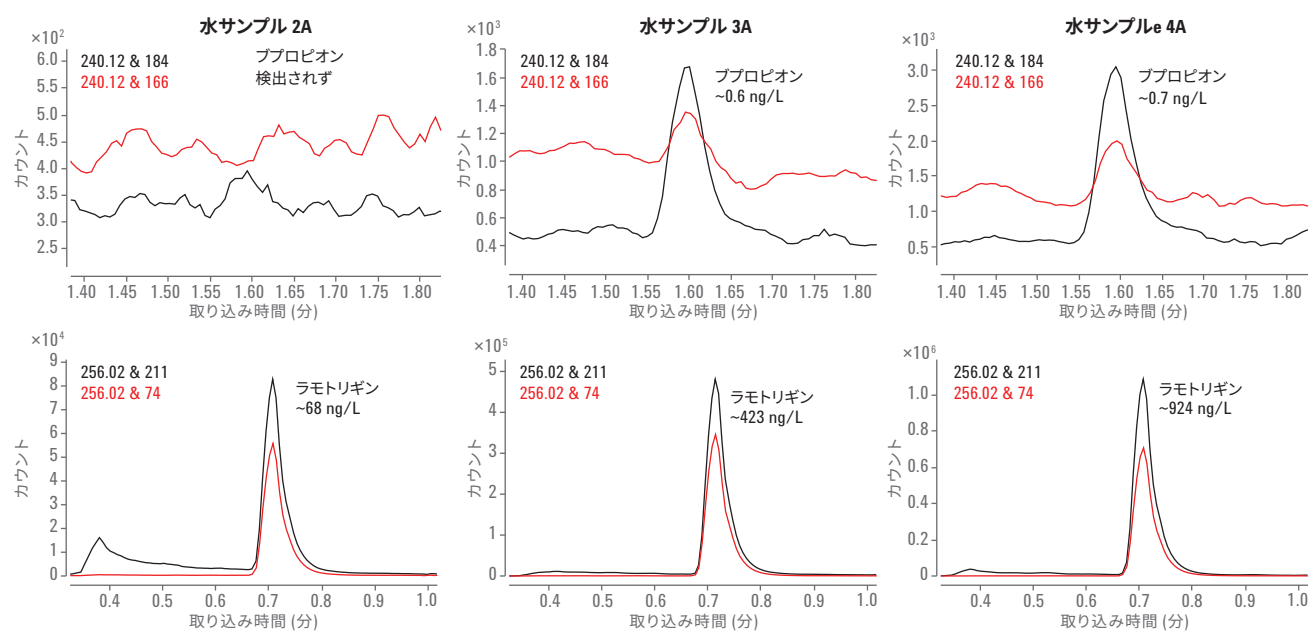


図 6. 分析した表流水サンプル中で検出された 2 種類の PPCP の MRM クロマトグラムの例。

結論

最適化した MRM 間ディレイタイムにより 0.5 ms の短いドウェルタイムの使用が可能になり、分析対象物のシグナルのロスを最小に低減できました。

大容量注入 (LVI) と UHPLC と短い MRM ドウェルタイムの組み合わせにより、全 32 種類の PPCP の 6 分以内でのハイスループット分析が低い定量下限で可能になりました。これは表流水分析において重要な点です。

本アプリケーションノートで報告した極性切り替え UHPLC/MS/MS メソッドにより、ポジティブ/ネガティブ ESI モードでイオン化した水サンプル中の PPCP 候補物質の高速スクリーニングが高い定量真度および精度で可能になります。対象分析物の時間のかかる SPE 予備濃縮は不要です。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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. 2016

Printed in Japan, December 23, 2016

5991-7299JAJP



Agilent Technologies