Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

超高感度UPLC/MS/MSを用いた飲料水中の酸性除草剤の直接定量分析

Claude R. Mallet, Dimple Shah, Jennifer Burgess
Waters Corporation, Milford, MA, U.S.A.

アプリケーションの利点

- ACQUITY UPLC® BEH C_{18} カラムを用いた高速分析
- 5 ppt の LOQ における高感度と高選択性の UPLC®/MS/MS 分析
- 前処理やサンプル調製が不要

ACQUITY UPLC I-CLASS システム

Xevo® TQ-S タンデム四重極型質量分析計
ACQUITY UPLC BEH C_{18} カラム
RADAR ™ テクノロジー
Quanpedia ™ データベース

キーワード

フェノキシ酢酸、飲料水、直接注入

はじめに

フェノキシ酢酸は除草剤に分類される化合物です。除草剤は 1940 年代から 1950 年代中盤まで世界中の農業分野で広く使用されました。フェノキシ酢酸は広く林業で使用されており、家庭菜園でもある程度使われ、また農業用の除草剤の約 70%を占めています。[1] 従って、これらの除草剤は地表水や地下水の環境モニタリング、飲料水のモニタリングの指標とされます。

これらの化合物が農作物に使用される際には、毒性は重要なファクターとして取り上げられ、しばしばリスクアセスメントと健康評価の対象となります。例えば、芝の調整に使用される 2,4-D は、野菜やフルーツなどさまざまな農作物に使用されます。この除草剤は米国で規制されており、陸上や水中生物に対する暴露は最小に管理されています。また、2,4-D は土壌中の微生物により速やかに分解され、適正に使用する上では残留や蓄積、地下水への流入はありません。[2] 2005 年には U.S.EPA が 70 µg/L の最大汚染レベル（MCLG）まで使用の継続を承認しました。[3] EU もまた 2,4-D を評価し使用の農薬リストに加え、残留レベルがヒトや動物に害を及ぼす健康被害の問題とならないとしました。[4]

全てのフェノキシ酢酸類が低いレベルの毒性を示すわけではなく、例えば 2,4,5-T の毒性はベトナム戦争中に明らかになりました。フェノキシ酢酸類は広葉植物に対し即効性があり、“Agent Orange” のコードネームで枯葉剤として広く使用されました。[5] 2,4,5-T と 2,4-D の基本構造は同じです。その毒性は高い毒性を示すダイオキシン類と関連があります。[6] 1985 年に U.S.EPA は米国内にある全ての 2,4,5-T の使用を禁じました。

これらのフェノキシ酢酸類の商業用としての使用を申請するために、EU 議会はヒトが摂取する水中には個々の農薬に対し 100 ng/L 以下、全ての農薬の合計で 500 ng/L 以下と定めました。[7] 米国では EPA メソッド 515.4（GC/ECD）（MDL が 50 ng/L）、EPA メソッド 555（LC/UV）（MDL が 100 ng/L）を用いてモニターを実施しています。

分析条件

UPLC 条件

UPLC システム：ACQUITY UPLC I-Class

分析時間：8.0 分

カラム：ACQUITY BEH C_{18} 2.1 × 100 mm、1.7 µm

カラム温度：60℃

移動相 A：0.5%　ギ酸水溶液

移動相 B：0.5%　ギ酸含有アセトニトリル

グラジエント：　5 分間で B 5% から 95%

流速：0.5 mL/min

注入量：100 µL（直接注入）

MS 条件

MS システム：Xevo TQ-S

イオン化モード：ESI ネガティブ

キャピラリー電圧：2.0 kV

コーン電圧：20 V

ソース温度：140℃

脱溶媒ガス温度：550℃

脱溶媒ガス量：1100 L/hr

コーンガス量：50 L/hr

本アプリケーションノートでは、ACQUITY UPLC システムと超高感度タンデム四重極型質量分析計 Xevo TQ-S を用いた飲料水中のフェノキシ酢酸類の新しい分析法について紹介します。この分析法では、サンプル前処理を施さず飲料水の直接注入を行っており、トレースレベルは 2.5 ng/L です。前処理工程を行わないことと、ACQUITY UPLC I-Class の使用により、分析時間を短縮し速やかなアウトプットを得ることができます。

本アプリケーションの対象農薬の構造式と MRM 条件を、Fig.1 および Table1 に示します。

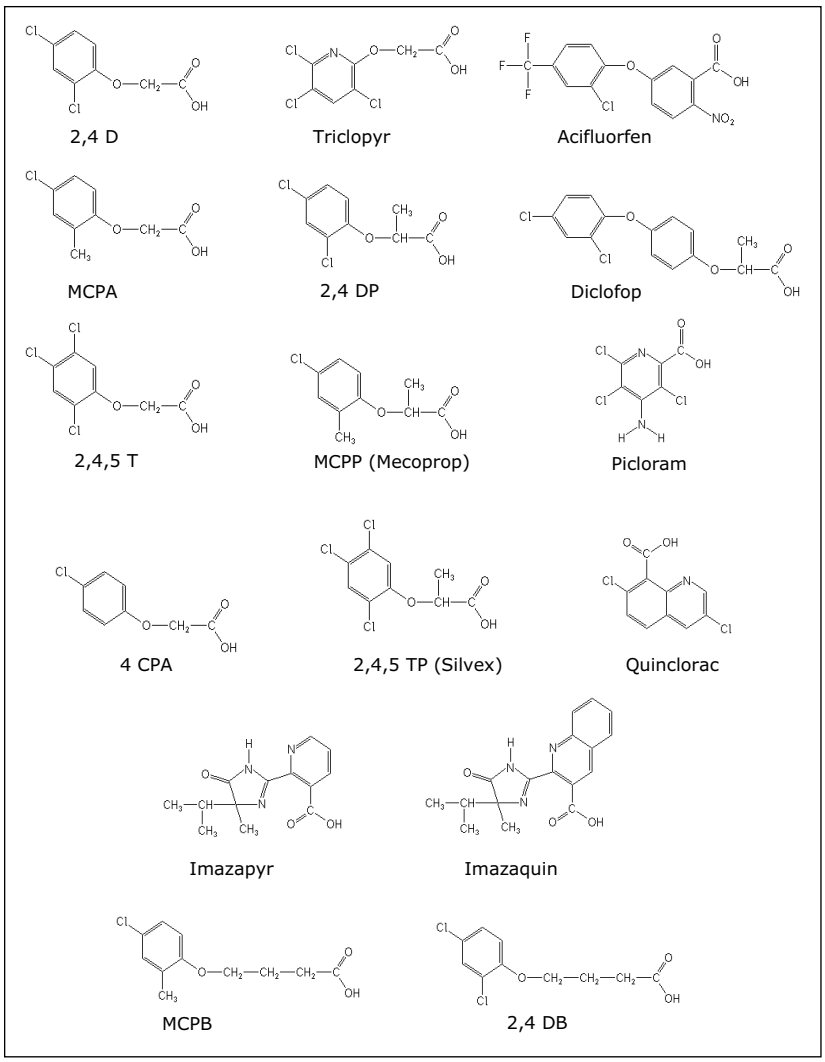

Fig.1　フェノキシ酢酸類の構造式

アプリケーションは、IntelliStart ™ により最適化された各化合物の取り込み条件を蓄積した Quanpedia データベースより MRM 条件を選択することにより始まります。Quanpedia は定量的な LC/MS や LC/MS/MS メソッドを簡単かつ定量用メソッドを迅速に作成できるよう拡張性と検索性にすぐれたデータベースです。IntelliStart は直感的に装置のセットアップ、チューニング、キャリブレーション、さらに MS 条件の自動最適化の操作を行えるソフトウェアです。クロマトグラフ分離には ACQUITY UPLC I-Class システムと ACQUITY UPLC BEH C_{18} カラム（2.1 × 100 mm）を使用しました。LC 条件は 0.5% ギ酸含有の水とアセトニトリルによる 5 分間のリニアグラジエントを行い、検出器には Xevo TQ-S タンデム四重極型質量分析計を用いました。フェノキシ酢酸類の標準溶液は Sigma Aldrich 社製を使用しました。2,4-D の d 体を IS に使用し、水サンプルは天然の湧き水を使用しました。

Herbicides	Precursor	Product	Cone	Collision
4CPA	185.0	90.9	20	40
	185.0	127.0	20	15
MCPA	199.0	105.0	20	40
	199.0	141.0	20	15
MCPP	213.0	105.0	20	40
	213.0	141.0	20	15
2,4 D	218.9	125.0	20	40
	218.9	160.9	20	15
MCPB	227.0	105.0	20	40
	227.0	141.0	20	15
2,4,5 T	254.9	160.9	20	40
	254.9	196.9	20	15
2,4DP	233.0	125.0	20	40
	233.0	160.9	20	15
2,4,5 T	254.9	160.9	20	40
	254.9	196.9	20	15
Triclopyr	255.9	175.7	20	30
	255.9	197.8	20	10
Imazapyr	260.0	173.0	20	20
	260.0	216.0	20	10
2,4,5 TP	268.9	160.9	20	40
	268.9	196.9	20	15
Imazathapyr	288.0	201.1	20	25
	288.0	244.1	20	15
Diclofop	324.9	145.0	20	25
	324.9	253.0	20	15
Haloxyfop	359.0	252.0	20	25
	359.0	288.0	20	15
Acifluorfen	359.9	194.9	20	20
	359.9	315.9	20	10

Table 1　フェノキシ酢酸類の MRM 条件

結果および考察

ng/L オーダーのトレースレベルを分析する際は、目標となる感度に到達するために抽出のプロトコールが重要となります。この要求感度を達成するためには大量のサンプル水を濃縮することが必要です。StepWave ™ イオン光学系を搭載した Xevo TQ-S 質量分析計ではトレースレベルを満足する卓越した高感度分析が可能です。高感度分析では飲料水中の汚染物質のトレースレベルでの検出で必要な濃縮操作が不要となります。サンプル水は ACQUITY UPLC I-Class と Xevo TQ-S のシステムにおいて大量注入（100 µL まで）により直接分析カラムに濃縮されます。

定量

本アプリケーションでは、天然水の定量のため標準溶液の希釈溶媒として MilliQ 水（メルクミリポア製）を使用しました。2,4-D と 2,4,5-T の検量線結果を Fig.2 に示します。両化合物ともに 5 ～ 1000 ng/L で R^2=0.995 以上と良好な直線性であり、他のフェノキシ酢酸類についても同様の濃度範囲において R^2=0.995 ～ 0.999 の直線性を示しました。トリクロピルは 25 ～ 1000 ng/L の範囲で R^2=0.995 の直線性を示しました。

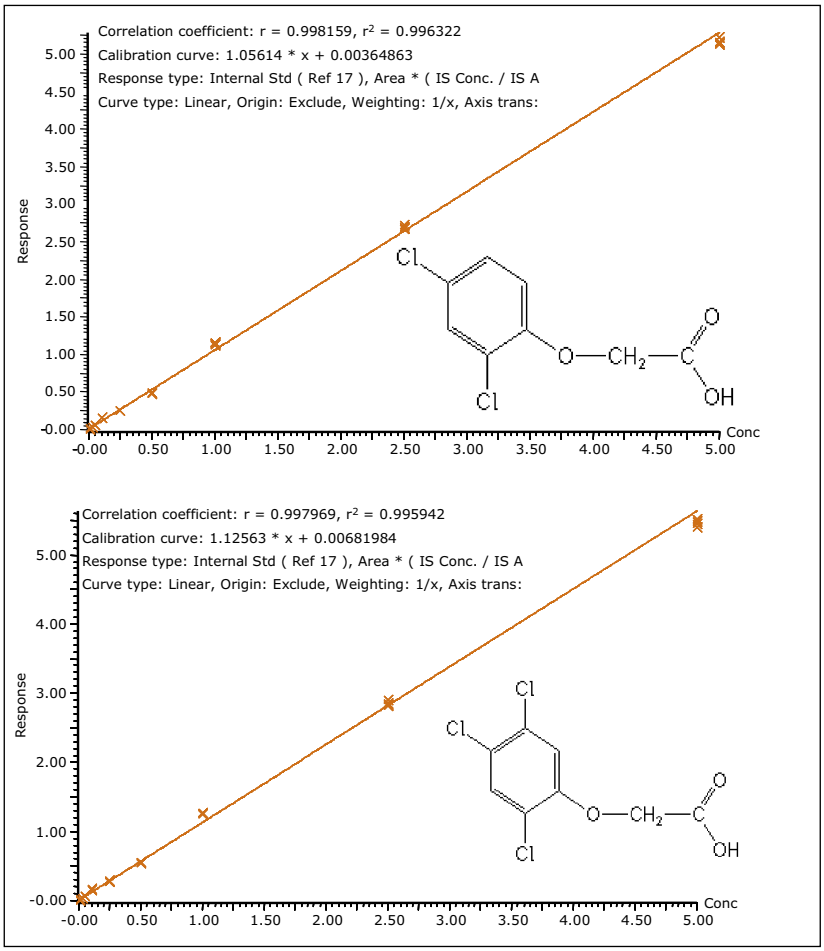

Fig.2　2,4-D および 2,4,5-T の検量線結果（5 ～ 1000 ppt）

検出下限（LOD）はトリクロピルを除くフェノキシ酢酸類で 2.5 ng/L、トリクロピルで 5 ng/L でした。LOD での MRM クロマトグラムを Fig.3 に示します。100 ng/L の濃度となるように添加したサンプルの回収率を Table 2 に示します。MilliQ 水で調製した標準溶液を用いて検量線を作成し、標準溶液を添加した天然水を測定した結果、回収率は 107 ～ 117% でありました。添加サンプルでの主な除草剤の再現性は CV%=5% 以下と良好な再現性を示しました。

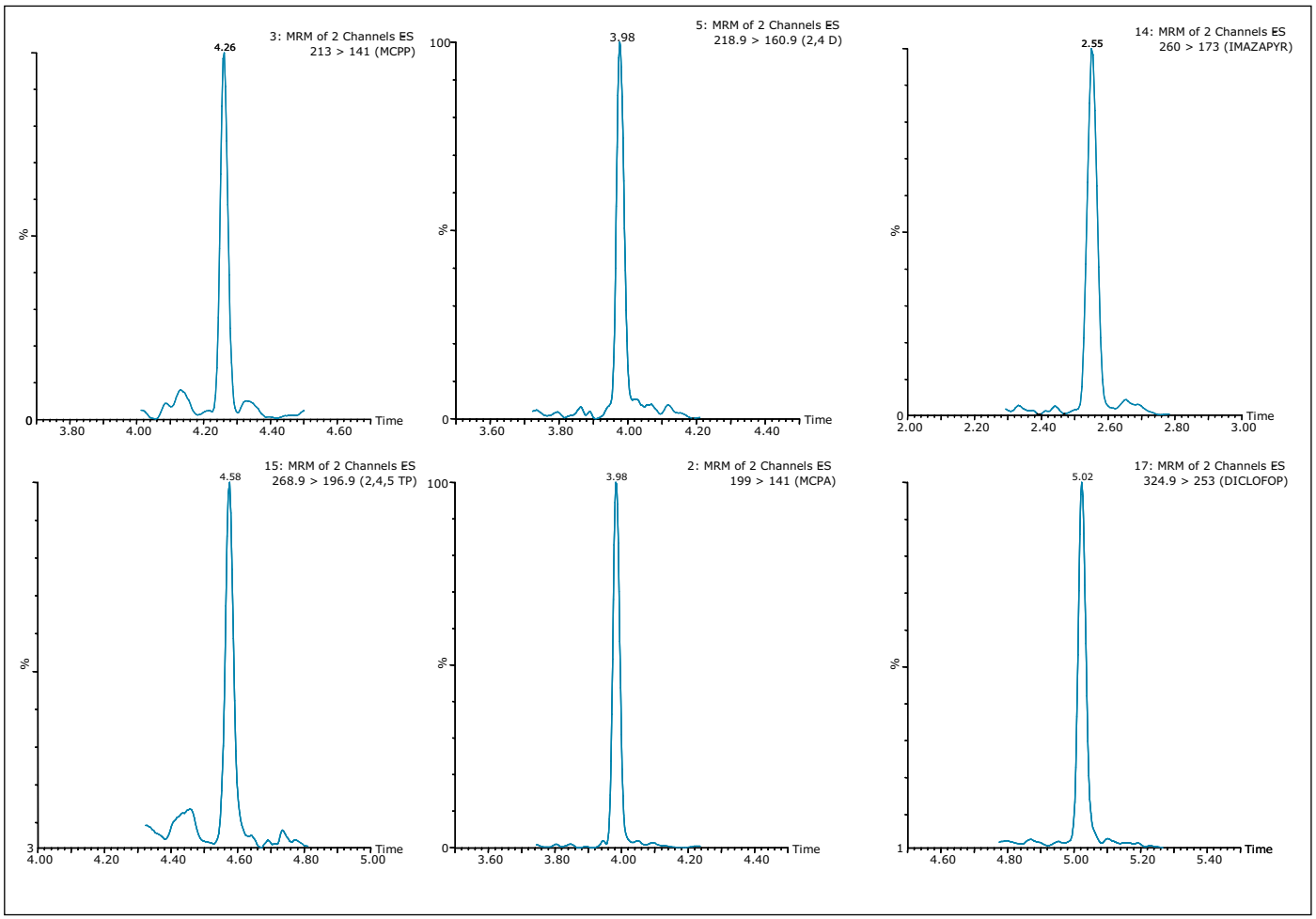

Fig.3　2.5 ppt におけるフェノキシ酢酸類の MRM クロマトグラム

Herbicides	MilliQ	Natural spring
4 CPA	0.14 (3.3)	0.15 (1.5)
MCPA	0.14 (0.9)	0.16 (1.3)
MCPP	0.15 (1.3)	0.16 (1.2)
2,4 D	0.14 (1.4)	0.16 (1.5)
MCPB	0.12 (3.6)	0.14 (2.1)
2,4 DP	0.14 (2.2)	0.16 (1.3)
2,4,5 T	0.14 (2.1)	0.15 (2.1)
Triclopyr	0.12 (1.5)	0.14 (5.2)
IMAZAPYR	0.12 (1.0)	0.14 (0.7)
2,4,5 TP	0.14 (0.9)	0.16 (0.6)
Diclofop	0.14 (0.9)	0.17 (2.4)
ACIFLUORFEN	0.12 (1.9)	0.14 (1.6)
QUINCLORAC	0.13 (4.7)	0.14 (2.3)
PICLORAM	0.13 (1.1)	0.14 (3.8)
2,4 DB	0.13 (1.8)	0.14 (4.6)
IMAZAQUIN	0.12 (0.7)	0.14 (1.0)

Table 2　天然水中のフェノキシ酢酸類の回収率 (CV%) (n=3)

RADARテクノロジー

RADAR テクノロジーはフルスキャンと MRM が同時測定できる Waters® Xevo タンデム四重極型質量分析計独自の機能です。この機能は分析法開発のプロセスにおいて多くの情報をもたらします。RADAR モードを使用することにより、水サンプル中のマトリックスをモニターできるため、分析カラム寿命の延長や頑健なメソッドの構築のための重要な情報が収集できます。Fig.4 に標準溶液 100 ng/L の MRM クロマトグラムを示します。

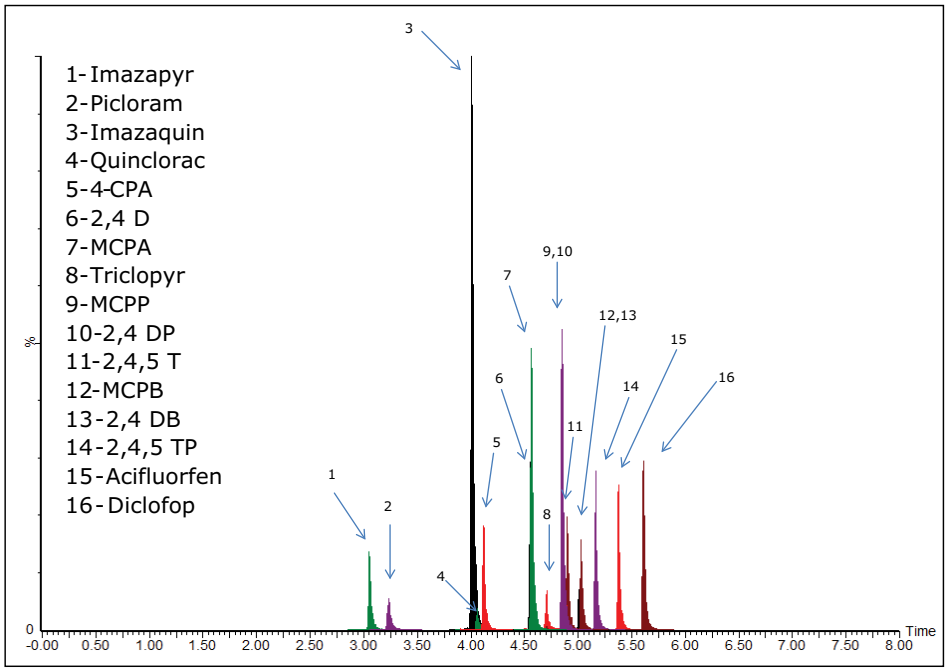

Fig.4　MilliQ 水中のフェノキシ酢酸類の MRM クロマトグラム (100 ppt)

全体として分離能の高いクロマトグラムが得られており、これは定量解析において重要な要素となります。また、クロマトグラムでは 3 成分が同時溶出している時間帯があります。MS 検出器では同時溶出成分は *m/z* により分離されます。同時取得した RADAR のデータではマトリックスの影響を受ける領域で除草剤成分が溶出しているかを判断することができます。RADAR 測定による MilliQ 水と天然水サンプルの TIC クロマトグラムを Fig.5 に示します。図 5 に示されるように、MilliQ 水と天然水サンプルはグラジエント終盤である 4.2 ～ 5.2 分にマトリックス効果の影響を受けていると思しき時間帯があります。

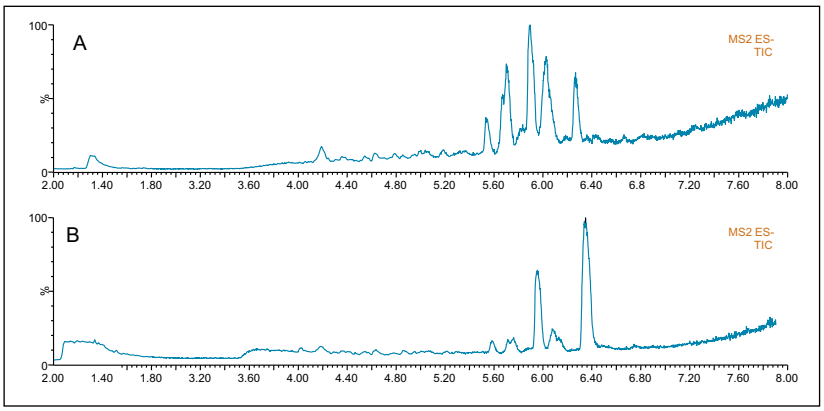

Fig.5　MilliQ 水および天然水の RADAR スキャンによるトータルイオンクロマトグラム

最初に溶出する除草剤と最後に溶出する除草剤の MRM クロマトグラムと RADAR データを重ねたクロマトグラムを Fig.6 に示します。除草剤はマトリックスが溶出する時間帯より 30 秒ほど速く溶出します。RADAR テクノロジーによる情報はメソッドの頑健性を確実なものにし、変化するマトリックスを常時モニターすることにより新たなマトリックスの影響も回避できます。

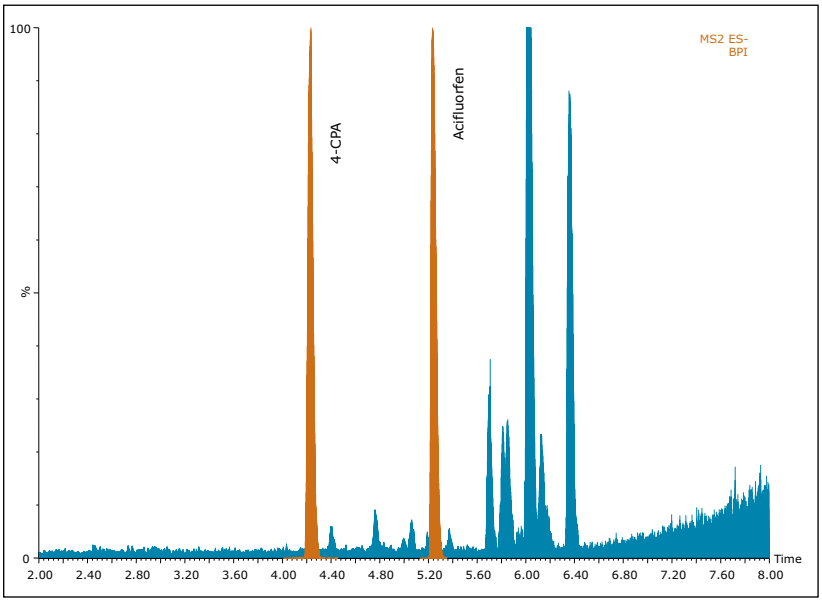

Fig.6　RADAR フルスキャンと溶出最初と最後の成分（4-CPA および Acifluorfen）の MRM クロマトグラム

寿命と頑健性

天然水サンプルを用いたカラム寿命テストの結果を Fig.7 に示します。500 回連続のサンプル分析においても変動のない分析が可能でした。Fig.7 に示すように 1 回目と 500 回目のピーク形状を比較してもテーリングやブロードもせずに同一のピーク形状でした。

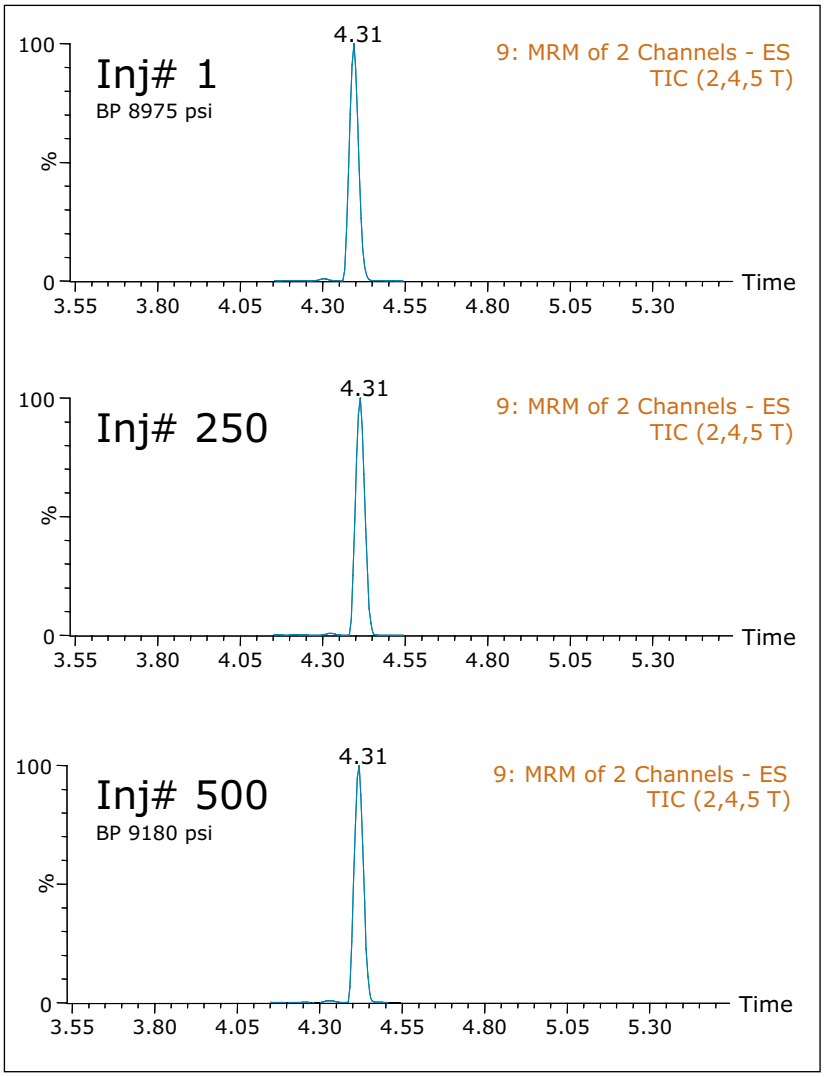

Fig.7　天然水サンプルを用いたカラム耐久性試験における 2,4,5-T の MRM クロマトグラム（注入 1、250、500 回目）

TrendPlot の例を Fig.8 に示します。天然水中の 2,4,5-T の 150 回連続分析結果では、CV%=0.06 という良好な再現性を示しました。

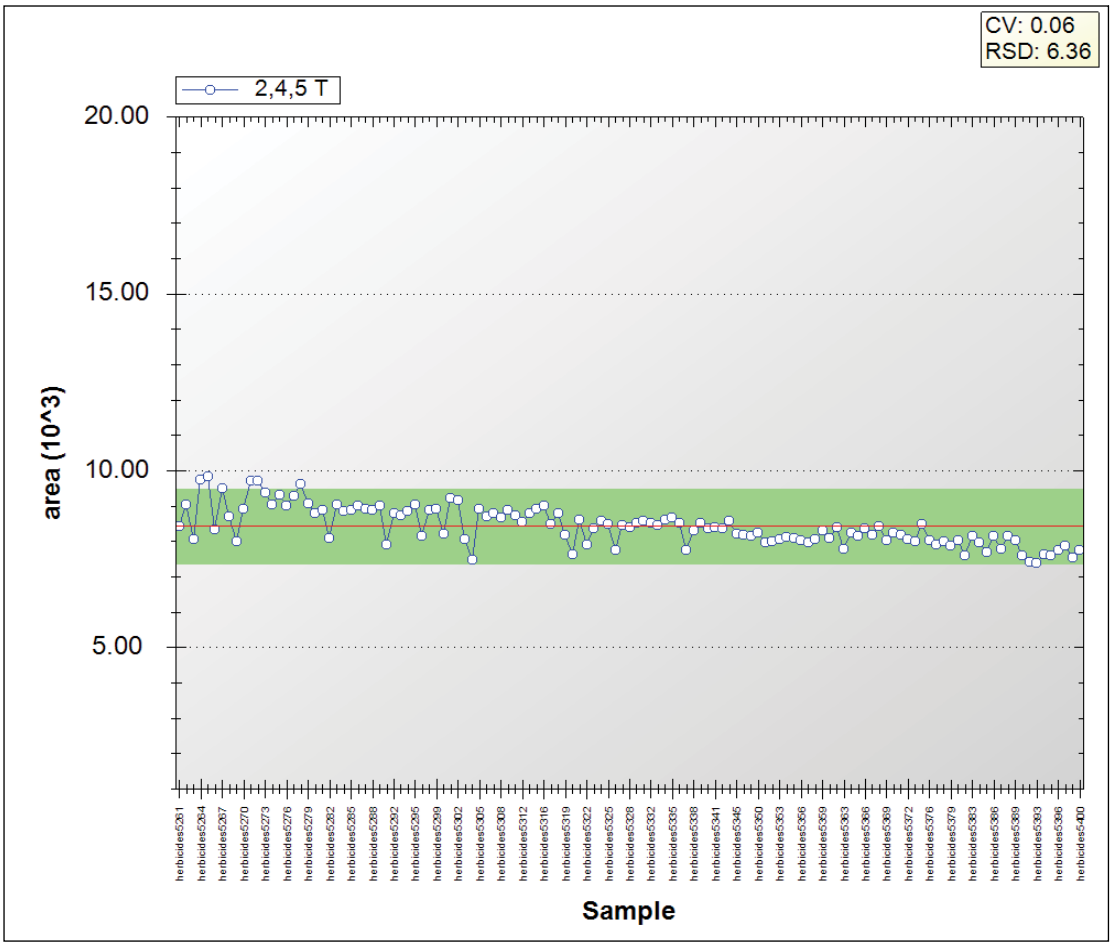

Fig.8　天然水中の 2,4,5-T の面積値トレンドプロット（150 回）

分析中のカラム圧をモニターすることはカラムの分離パフォーマンスの指標となります。粒子径 2 µm 以下のパーティクルを充填したカラムを使用する UltraPerformance 液体クロマトグラフィー（UPLC）は耐圧が 18,000 psi であり、直接注入分析の手法は飲料水の分析において信頼性の高い結果を示しました。

例えばこのアプリケーションでは 500 回の天然水分析の間に上昇したカラム背圧は 200 psi 以下でした。全体としてこのアプリケーションでは天然水中のフェノキシ酢酸類のピーク形状は、500 回連続分析をしても良好な形状を保ちました。

結論

HPLC を用いたトレースレベルでの分析は単純な SOP で行われます。本アプリケーションノートでは UPLC と Xevo TQ-S タンデム四重極型質量分析計を用いることにより、天然水中のフェノキシ酢酸類の直接注入分析の汎用性を実証しました。主なフェノキシ酢酸の LOD は 2.5 ng/L であり、米国 EPA と EU の要求を大幅に下回る LOD となります。高感度な Xevo TQ-S に前処理を施さず試料を 100 µL 注入することにより、酸性除草剤の良好な定量分析が可能となります。天然水中の除草剤の回収率は CV%=5% 以下で良好な結果を示しました。RADAR テクノロジーはクロマトグラフィーにおいてマトリックス効果が起こる溶出時間帯や潜在的なマトリックスの影響などの有用な情報を与えます。

参考文献

1. Kellogg RL, Nehring R, Grube A, Goss DW, Plotkin S. Environmental Indicators of Pesticide Leaching and Runoff from Farm Fields. United States Department of Forest Service, (1984). Pesticide Background Statements, Vol. I Herbicides. United States, February 2000.
2. http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/24d/2,4D Re-registration Eligibility Decision, Federal Register. 70: 151, August 8, 2005.
3. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/list_2-4d-d_en.pdf/ 2,4-D, 7599/VI/97-Final, October 1, 2001.
4. Chiras, Daniel D. *Environmental Science* (8th ed.). Jones & Bartlett. p. 499. ISNB 9780763759254, 2010.
5. Schecter A, Birnbaum L, Ryan JJ, Constable JD. Dioxins: An Overview. *Environ. Res.* 101 (3): 419–28, 2006.
6. EEC, Drinking Water Guidelines 98/83/EC, Official Journal of the European Communities no. L330/32, Brussels, 1998.

Additional Information

Please contact the application note authors for additional information required for this application.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com

東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第5小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118

大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734

ショールーム 東京 大阪

テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Xevo および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。
IntelliStart、QUANPEDIA、StepWave および RADAR は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan. 2013年9月 720004300JA PDF