

高分離能 GC/Q-TOF を用いた表流水中の 環境汚染物質の包括的プロファイリング

著者

Sofia Nieto and Kai Chen
Agilent Technologies, Inc

Chris Alaimo and
Thomas Young
Department of Civil and
Environmental Engineering,
University of California Davis,
CA, USA

概要

表流水中の環境汚染物質のモニタリングは、非常に困難な作業です。汚染物質は多数存在すると同時に、それらの物質による環境影響は絶えず変動しており、検出下限の低い高感度なメソッドを必要とする低濃度の毒性物質（例えば、ピレスロイドおよび一部の有機リン農薬）が存在するためです¹。サンプル中の既知および未知汚染物質を特性解析する際には、精密質量高分離能 MS (HRMS) 手法を使用することが一般的になってきています。環境汚染物質のうち、分子質量が小さい、揮発性がある、または非極性であるという性質を有するものは、LC よりも GC による分析の方が適しています。

高い感度と幅広い対象物質の分析を達成するため、表流水中の環境汚染物質のスクリーニングに対して、高分離能精密質量 GC/Q-TOF によるターゲット化合物の定量、サスペクトスクリーニング、およびノンターゲット分析手法を含む、包括的なワークフローを適用しました。

はじめに

有機微量汚染物質の調査は、環境品質の評価における重要な側面です。モニタリングに対する従来の手法は、限定された数のターゲット化合物の質量分析を実施することです。この場合、ターゲット化合物に対して選択したデータ取り込みモードで機器を動作させます。この手法を包括的な化合物のスクリーニングと比較すると、汚染物質からの暴露とその危険性を大きく過小評価してしまう場合があります。

最近の質量分析計では分析範囲が拡大でき、高分離能精密質量をフルスペクトル取り込むことにより、十分な感度と選択性が得られます。正確な質量情報により得られる詳細情報量が増え、ターゲットおよびノンターゲット化合物の両方を測定できます。

この情報豊富なデータが抱える課題の1つは、より詳細な調査が必要なのはどのサンプルであるのかを判別することです。このアプリケーションノートでは、対象サンプル中の環境汚染物質をプロファイリングする際に精密質量高分離能 GC/Q-TOF を使用するワークフローについて説明します。未知化合物の同定に関するガイダンスについても説明します。

実験方法

サンプル前処理

サンプリングは、サクラメント（北カリフォルニアのサンホアキン川三角洲）に位置する Cache Slough Complex の複数の箇所で行われました。微量汚染物質と拡散汚染物質は、主にウラティス支流を通して流入していると考えられています。サンプルはすべて冷却して輸送し、抽出するまで 4 °C 暗所保管しました。

抽出は、1 L の表流水を GF/F フィルタを通すことにより実施しました。ろ液を、ポリマー固相抽出 (SPE) カートリッジに通しました。カートリッジは 1 時間乾燥させた後、10 mL の酢酸エチルで溶出しました。フィルタはヘキサン/アセトンで抽出した後、酢酸エチルに転溶しました。

データの取り込みと前処理

イオン源の汚染、分析時間、およびキャリアオーバーを低く抑えるためにミッドカラムバックフラッシュ (図 1) を搭載した Agilent 7890B GC でサンプルを分離し、高分離能 Agilent 7250 GC/Q-TOF システムを用いてデータを取り込みました。20 分メソッドでは、クロロピリフォスメチル (RT 9.143 分) にリテンションタイムロッキング (RTL) を行い、農業および環境汚染物質の GC/Q-TOF 精密質量ライブラリとの RT の一貫性を確保しました。表 1 に GC/Q-TOF パラメータを示します。ダウンストリームデータプロセッシング (一連の連続したデータ処理) によって、取り込んだデータファイルを SureMass フォーマット²に変換しました。

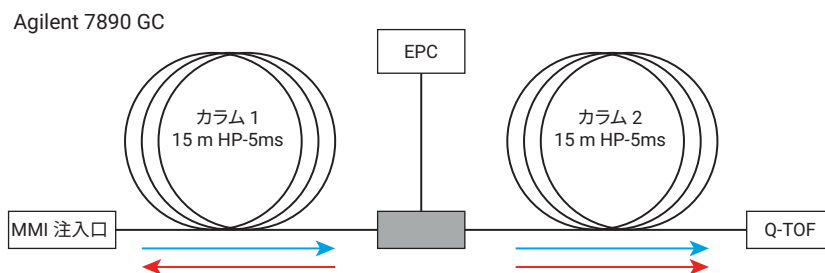


図 1. ミッドカラムバックフラッシュの構成。分析が終了した際のバックフラッシュ時のヘリウムの流路を、赤色の矢印で示しています。パーズ付きユニオンでの圧力を増大させると同時に、注入口での圧力を低下させます。これにより最初のカラム 1 の流れを逆流させ、スプリットベントを通して高沸点の化合物を取り除くことができます。

サスペクトスクリーニングと ノンターゲットスクリーニングの ワークフロー

ターゲット化合物の定量とサスペクトスクリーニングを組み合わせたワークフローを使用して、水およびフィルタ抽出物中の汚染物質を同定しました (図 2)。この統合ワークフローでは、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 の GC/Q-TOF スクリーニング機能を使用しました。サスペクトスクリーニングは、1,000 を超える化合物の RT とスペクトルが含まれている、農業および環境汚染物質の Agilent GC/Q-TOF 精密質量パーソナル化合物データベースライブラリ (PCDL) から実施しました。スクリーニングメソッドでは、各 PCDL スペクトルから自動的に選択された特有な精密質量イオンを使用しました。ライブラリー一致スコア、RT ウィンドウ、共溶出スコア、質量誤差などのスクリーニングメソッドパラメータは、SANTE および FDA のガイドラインに従って選択しました^{3,4}。

より多くの汚染物質 (PCDL に含まれない) を同定するために、Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1 の Agilent MassHunter Unknowns Analysis を使用して、デコンボリューションと NIST17.L ライブラリ検索を実行しました。続けて、Unknowns Analysis の ExactMass ツールを用いて、ユニット質量 NIST17 ライブラリで同定した化合物に基づいたフラグメント式により、デコンボリュートした精密質量 GC/Q-TOF スペクトルのアノテーションを行いました。このステップは、同定された偽陽性の化合物 (精密質量に差異がある) を除外するために実施しました。

表 1. GC/Q-TOF 取り込みパラメータ

GC	Agilent 7890B GC
イナートフローパスの構成	ミッドカラムバックフラッシュ
カラム	2 × Agilent J&W HP-5ms ウルトライナート、15 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm
注入口	MMI、4 mm UI ライナシングルテーパー、ウール付き
注入量	1 μL
注入モード	コールドスプリットレス
注入口温度プログラム	60 °C で 0.2 分
	600 °C/min で 300 °C、ホールド
	330 °C、ポストラン
注入流量 (カラム 1)	1.0 mL/min (クロロピリフォスメチル、9.143 分に RT をロック)
PUU 流量 (カラム 2)	カラム 1 流量 + 0.2 mL/min
オープン温度プログラム	60 °C (1 分間保持)
	その後 40 °C/min で 170 °C まで昇温、
	その後 10 °C/min で 310 °C まで昇温 (3 分間保持)
	分析時間 20.75 分
トランスファーライン	280 °C
ミッドカラムバックフラッシュ	
タイミング	ポストラン中の 5 分間
オープン温度	310 °C
AUX EPC 圧力	~ 50 psi
注入口圧力	~ 2 psi
MS	Agilent 7250 Q-TOF
イオン源温度	280 °C
四重極温度	150 °C
コリジョンセルガスフロー	1 mL/min N ₂
	4 mL/min He
イオン化エネルギー	70 eV (標準 EI)
	15 eV (Low Energy EI)
取り込み質量範囲	m/z 45 ~ 550
スペクトル採取レート	5 スペクトル/秒



図 2. GC/Q-TOF PCDL を用いたターゲットおよびサスペクトスクリーニングと NIST ライブラリを用いたノンターゲットスクリーニング、およびその後の未知化合物の構造解明する包括的な汚染物質のスクリーニングワークフロー

未知化合物の同定

未知化合物の同定の最初のステップは、分子イオンの m/z を検出することです。未知化合物の分子イオンを同定するために、GC/Q-TOF の Low Energy EI モードであるソフトイオン化を使用しました。分子イオンの確認後、暫定的に同定した分子イオンの m/z をプリカーサとして使用し、未知化合物の精密質量プロダクトイオンスペクトルをターゲット MS/MS モードで生成しました。次に、構造解明を支援するために MS/MS データを Molecular Structure Correlator (MSC) ソフトウェアにインポートしました。

結果と考察

サスペクトスクリーニング結果

GC/Q-TOF スクリーニングワークフローと GC/Q-TOF PCDL を用いて、各水抽出物（降雨後 3 日目にサンプル採取）中に存在する多数の農薬と環境汚染物質 (> 100) を同定して確認しました。化合物の確認では、精密質量 < 5 ppm、ライブラリー一致スコアと共溶出スコアの両方が > 70、S/N > 3 という基準を用いました。

図 3 に、GC/Q-TOF スクリーニング（上部）および定量結果（下部）の各ウィンドウの例を示します。スクリーニング結果の表は、確認済み（緑色のラベル付き）および暫定的に同

定済み（オレンジ色のラベル付き）の化合物のみが表示されるように設定しています。暫定的に同定した化合物（現在のビューでは表示なし）とは、1 つ以上の基準（例えば、RT の差異）で不合格であったが、正しく同定されている可能性のある化合物です。これらの暫定的に同定した化合物については、手作業で精査する必要があります。スクリーニングサマリーの下にある 2 つのミラープロットは、デコンボリュート済み（青色、上部）と PCDL（緑色、下部）化合物のスペクトルを示しています。上側および下側のパネルに表示されているのはそれぞれ、フルスペクトルの例とスクリーナーが選択した特有なイオンのみの例です。

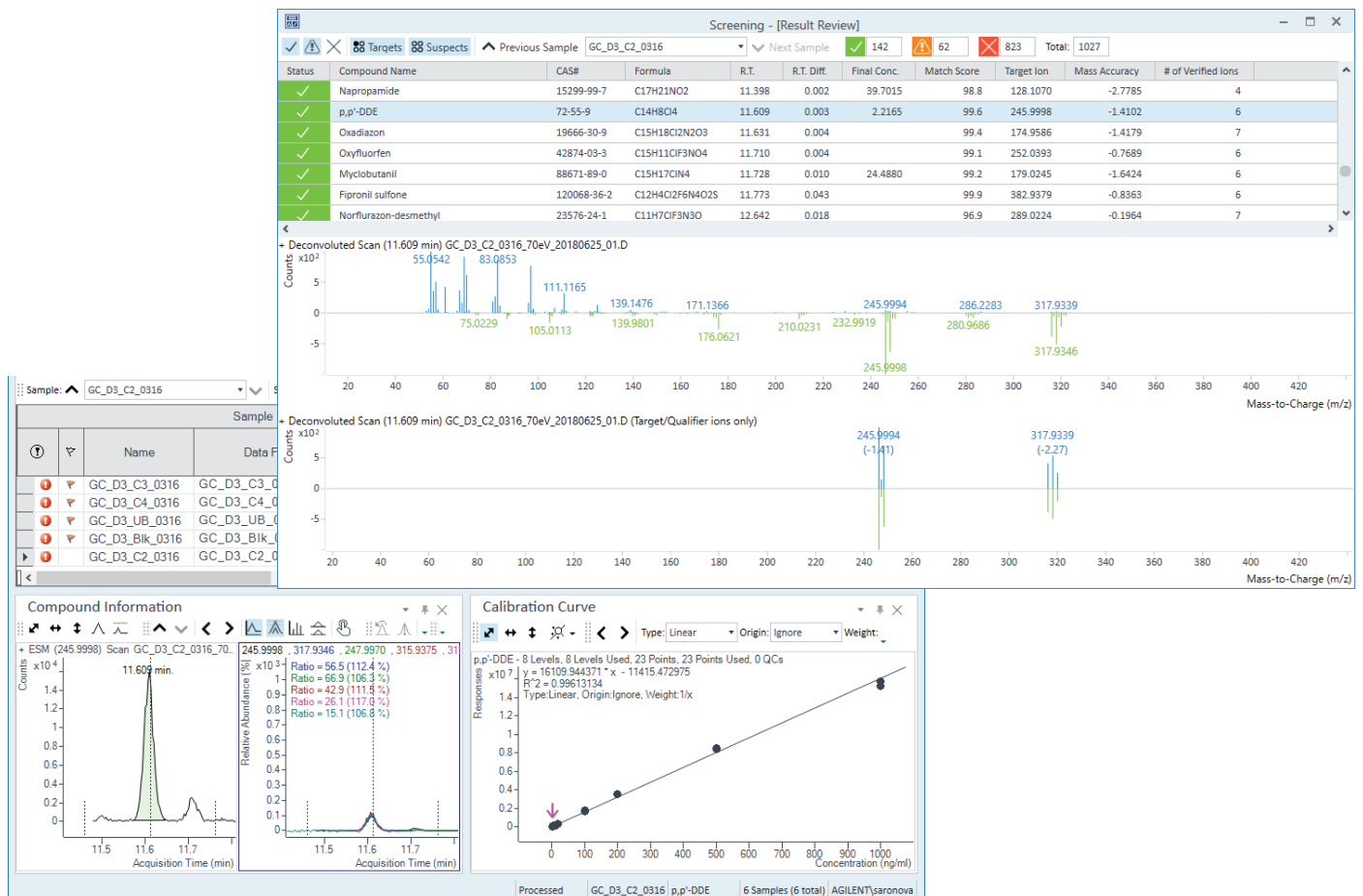


図 3. Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 によるサスペクトスクリーニング。確認プロセスを容易にするため、スクリーニングおよび定量結果ウィンドウが関連付けられます。

表 2 には、この研究で使用した最も上流 (UB) のサンプリング箇所におけるターゲット化合物の定量結果とサスペクトスクリーニング結果をまとめて示しています。このリストは、ブランク抽出物から同定された汚染物質は除外しています。同定した汚染物質の主なものは、除草剤 (36 %)、殺菌剤 (25 %)、殺虫剤 (21 %) でしたが、サンプリング箇所の近くで農業開発が行われていることを考えると、驚く結果ではありません (図 4)。

表 2. UB サンプリング箇所におけるターゲットおよびサスペクトスクリーニング結果のまとめ。報告されている検出量は注入溶媒中の濃度です。

化合物名	フラグメント比スコア	質量差異 (ppm)	検出量またはサスペクト化合物の ID のみ (ng/mL)
2,4,6-トリプロモアニソール	99.6	1.68	ID のみ
2-フェニルフェノール	86.2	0.59	ID のみ
アントラキノン	93.7	2.35	ID のみ
アトラジン	98.5	0.77	6.5
アトラジンデスエチル	90.1	3.41	ID のみ
アトラジンデスイソプロピル	94.4	2.42	ID のみ
アゾキシストロピン	99.9	0.89	95.1
BAM/ジクロロベンズアミド	84.3	0.57	ID のみ
ボスカリド (ニコピフェン)	99.8	0.03	ID のみ
プロマシル	99.4	0.53	116.5
カルボン	86.6	3.5	ID のみ
クロラントラニルプロール	96.1	0.59	304.6
クロロネブ	96.1	0.57	ID のみ
クロロタロニル	99.9	0.83	7.3
クマホス	88.4	0.47	ID のみ
シプロジニル	99.7	1.53	ID のみ
DCPA/クロルタルジメチル	99.4	2.06	ID のみ
ジエチルトルアミド (DEET)	99.7	1.47	ID のみ
ダイアジノン (ジムピレート)	86.5	0.86	265
ジアゾキソン	99.5	0.21	ID のみ
ジクロベニル	98.1	1.24	ID のみ
ジフェノコナゾール (I)	95.7	1.32	26.1
ジメテナミド-P	99	1.11	ID のみ
ジメトエート	98.6	2.03	1048.1
ジスグラン	67.9	2.44	ID のみ
ジチオピル	99.8	1.38	ID のみ
ジウロン代謝物 [3,4-ジクロロフェニルイソシアナート]	100	0.64	ID のみ
フェンブコナゾール	92.8	0.64	ID のみ
フィプロニル	91.9	1.26	ID のみ
フィプロニルスルフィド	99.6	0.27	ID のみ
フィプロニルスルホン	99.9	0.06	ID のみ
フロニカミド	89.1	0.73	ID のみ
フルミオキサジン	96.6	0.26	ID のみ
フルオピラム	99.1	1.11	ID のみ
フルリドン	96.1	1.43	ID のみ
フルルプリミドール	92.6	2.3	ID のみ
フルトラニル	78.5	0.34	ID のみ
フルキサピロキサド	99.3	0.9	ID のみ
フサライド	84.9	1.22	ID のみ
ヘキサジノン	84.4	1.89	ID のみ
インドキサカルブ	71.6	1.5	37.9
イプロジオン (グリコフェン)	99.4	0.78	ID のみ

化合物名	フラグメント比スコア	質量差異 (ppm)	検出量またはサスペクト化合物の ID のみ (ng/mL)
イソキサベン	88.1	1.46	ID のみ
馬拉チオン	94.5	0.98	7.9
メタラキシル	90.4	0.59	11.6
メトラクロール	99.1	0.21	178
メトリブジン	97.4	2.98	ID のみ
ミクロブタニル	99.5	1.22	10
N-(2,4-ジメチルフェニル)ホルムアミド	80.9	3.27	ID のみ
ナプロバミド	90.7	0.47	11.5
ニトラピリン	72.2	2.84	ID のみ
ノルフルラゾン	96.3	0.98	ID のみ
ノルフルラゾンデスメチル	94.7	0.75	ID のみ
オクチリノン	94.3	1.06	ID のみ
オメトエート	98.5	0.19	31.8
オリザリン	99.8	0.35	ID のみ
オキサジアゾン	99.9	0.78	ID のみ
オキシフルオルフェン	99.2	0.27	ID のみ
p,p'-DDE	99.8	1.41	1.9
PCP/ベンタクロロフェノール	72.8	1.35	3.1
ベンジメタリン(ペノキサリン)	99.8	0.54	ID のみ
ベンタクロロアニソール	89.8	0.09	ID のみ
フェナントレン	99.5	1.76	ID のみ
フェノチアジン	87.5	1.43	ID のみ
ホスメット(イミダン)	80.6	1.79	ID のみ
フタリド	94.5	2.81	ID のみ
プロジアミン	99.9	0.31	ID のみ
プロメトン	90.1	1.04	ID のみ
プロピコナゾール(I)	99.3	1.13	ID のみ
プロピコナゾール(II)	99.4	0.42	ID のみ
プロピザミド(プロナミド)	80.1	1.07	2.2
ピラクロストロピン	93.8	0.71	ID のみ
ピリメタニル	88.6	2.26	ID のみ
シマジン	99.8	0.27	ID のみ
スルフェントラゾン	99.9	0.32	ID のみ
テブコナゾール(I)	91.4	1.03	ID のみ
テブチウロン	90.4	0.89	ID のみ
テトラコナゾール	84.3	1.74	ID のみ
タナイト	86.5	3.98	ID のみ
チアメトキサム	97.1	1.24	34.1
トリクロサン	95.7	1.15	ID のみ
トリフロキシストロピン	87	1.27	ID のみ
トリフルラリン	95.8	2.22	ID のみ
Tris(2-ブトキシエチル)リン酸塩	96	2.02	ID のみ
Tris(3-クロロプロピル)リン酸塩	98.6	2.63	ID のみ
Tris(b-クロロプロピル)リン酸塩	99.1	0.9	ID のみ

水サンプルの他に、フィルタ粒子からの抽出物も分析しました。大部分の汚染物質は水抽出物中に存在していましたが、いくつかの汚染物質はフィルタ抽出物からも同定されました(図 5)。興味深いことに、一部のピレスロイドと PAH はフィルタ抽出物でのみ同定されました。これらの成分がフィルタ粒子に対して強い親和性を示す要因は、その高い疎水性にあると考えられます。

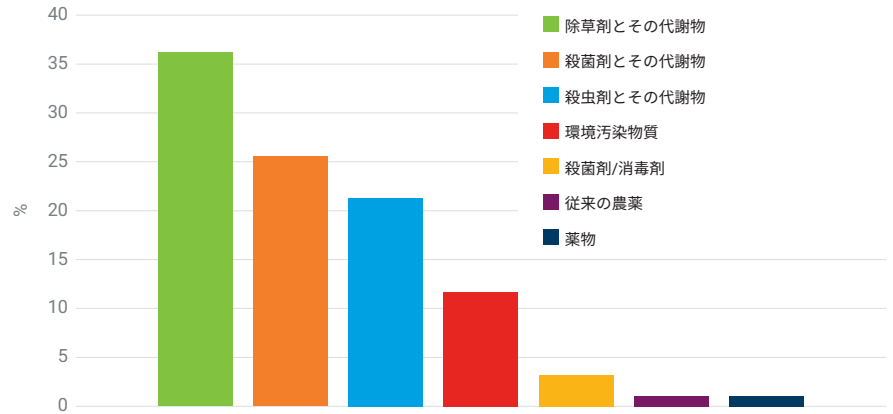
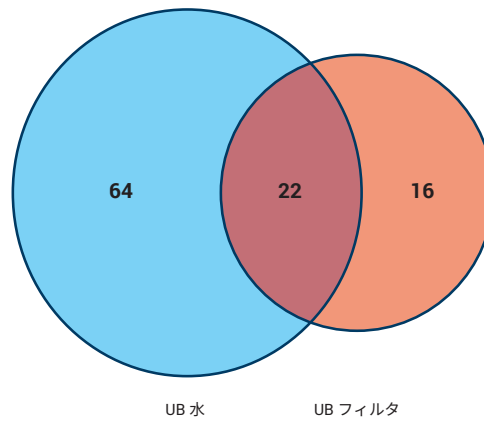


図 4. UB サンプルング箇所での GC/Q-TOF スクリーニングワークフローおよび PCDL により同定された汚染物質の分類

A



B

UB フィルタ抽出物中で一意に同定した化合物:

- | | |
|----------------|-------------------|
| ジフェニルアミン (DFA) | ピフェントリン |
| ヘキサクロロベンゼン | クリセチン |
| ペンタクロロアニリン | cis-ペルメトリン |
| フルオランテン | trans-ペルメトリン |
| ピレン | ベンゾ[b]フルオランテン |
| ノナクロル-trans | ベンゾ[a]ピレン |
| p,p'-DDD | フタル酸ジノニル |
| フタル酸ジヘキシル | インデノ[1,2,3-cd]ピレン |

図 5. UB 箇所の水とフィルタ抽出物における汚染物質の分布

ターゲットおよびサスペクトスクリーニングにより水抽出物から同定した汚染物質について、複数のサンプリング箇所を比較しました。C2 サンプリング箇所の水抽出物から、PCDL スクリーニングによって最も多い数の汚染物質が同定されました。同定したすべての汚染物質の約半分が、UB、C2、および C4 サンプリング箇所でも共通していました (図 6A および 6B)。地形的な傾向を適切に視覚化するために、3D 領域グラフ上にすべてのサンプリング箇所でも同定した汚染物質の相対量もプロットしました (図 7)。

ノンターゲットスクリーニング結果と暫定的に同定した化合物の確認

ターゲットおよびサスペクトスクリーニングの補完的な手法であるノンターゲット分析を用いて、水抽出物から他の化合物をいくつか同定しました。図 8 に、UB 箇所の抽出物から NIST17.L ライブラリを用いて Unknowns Analysis により暫定的に同定した化合物の例を示します。NIST17.L はユニット質量ライブラリであるため、ライブラリ照合に際して、精密質量データであることについて、自動的には考慮されません。しかし、Unknowns

Analysis では、NIST により同定した化合物の分子式と相関関係がある場合、正確な質量情報に基づいて暫定的に同定した化合物の確認や偽陽性の除外に対して有用になります。このデータ処理は、Unknowns Analysis の ExactMass 機能を用いて実行します。図 8 に示すとおり、これらの暫定的に同定した各化合物の大部分のイオンは、5 ppm の質量誤差以内で同定した化合物の分子式のサブセットにより説明できます。

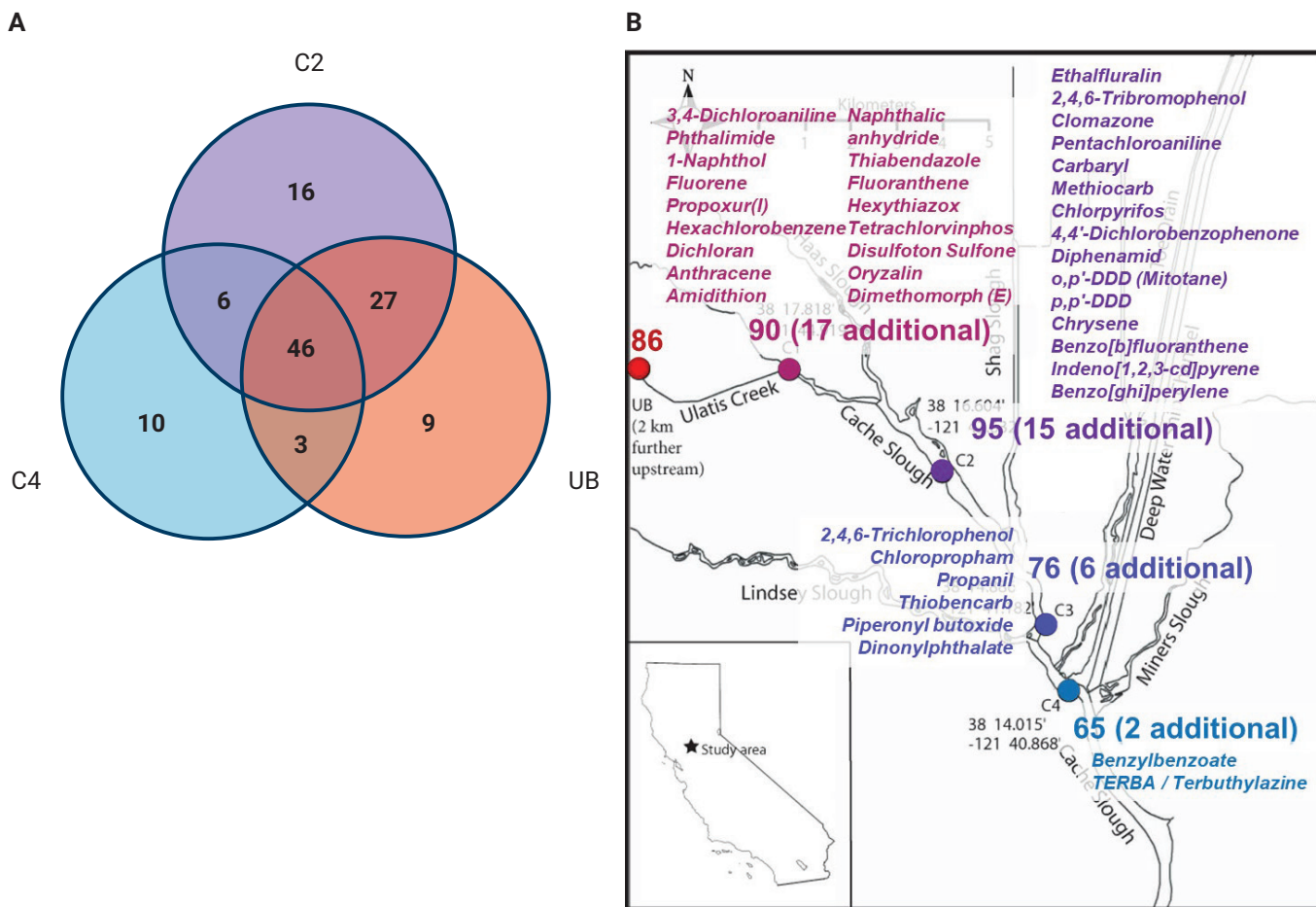


図 6. 汚染物質の地理的分布。UB、C2、および C4 の各箇所でも同定した汚染物質数の比較 (A)。各箇所の河川でも同定した汚染物質と新しい汚染物質が追加された箇所を示すサンプリング箇所マップ (B)。

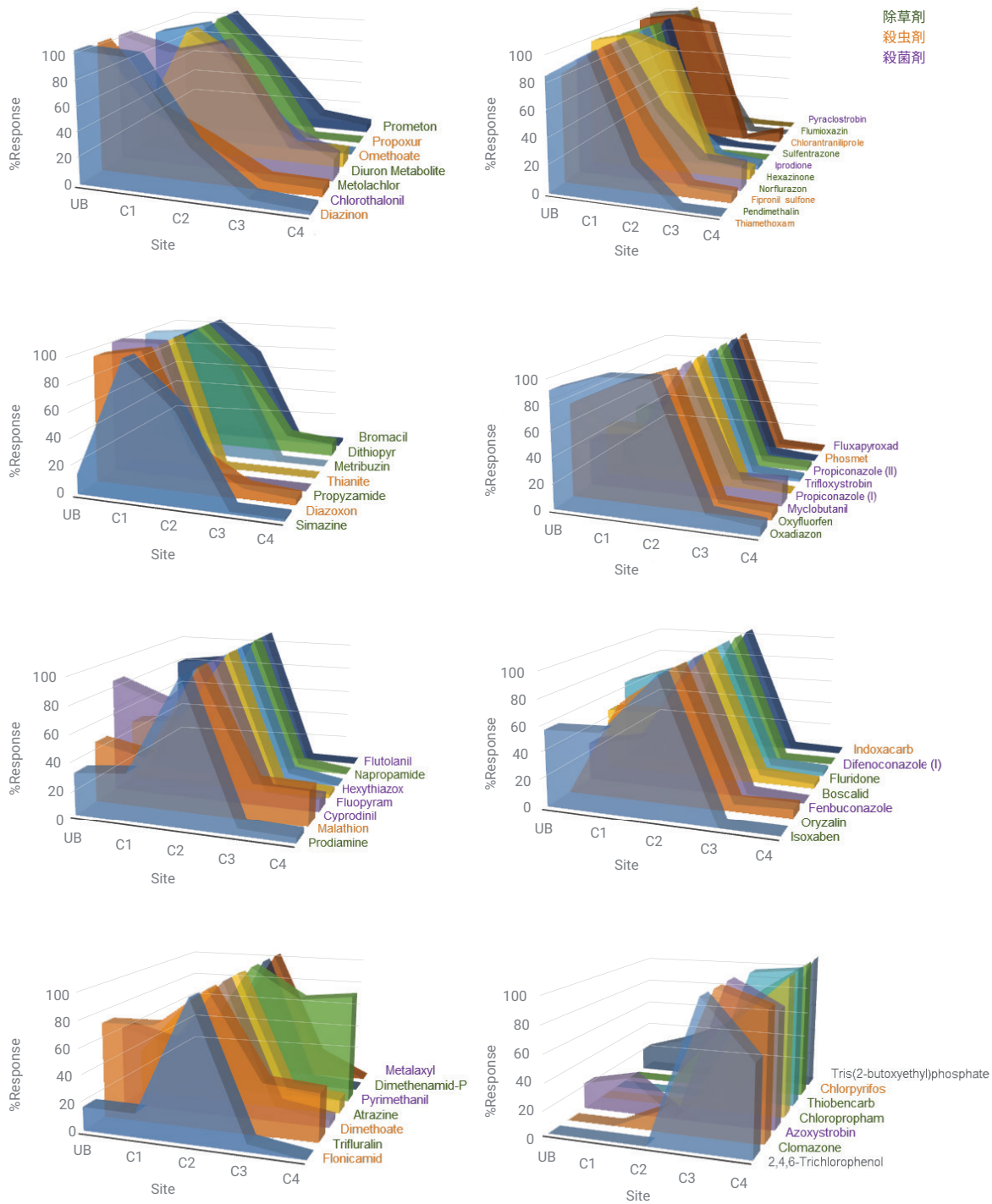
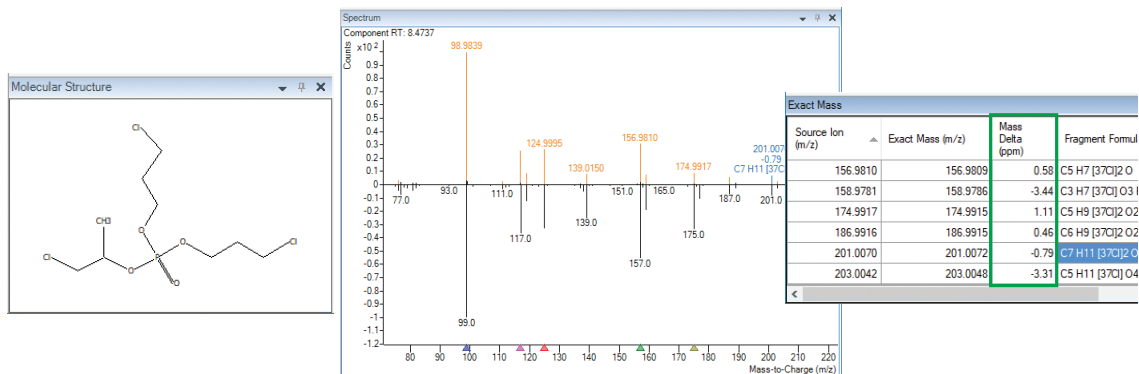
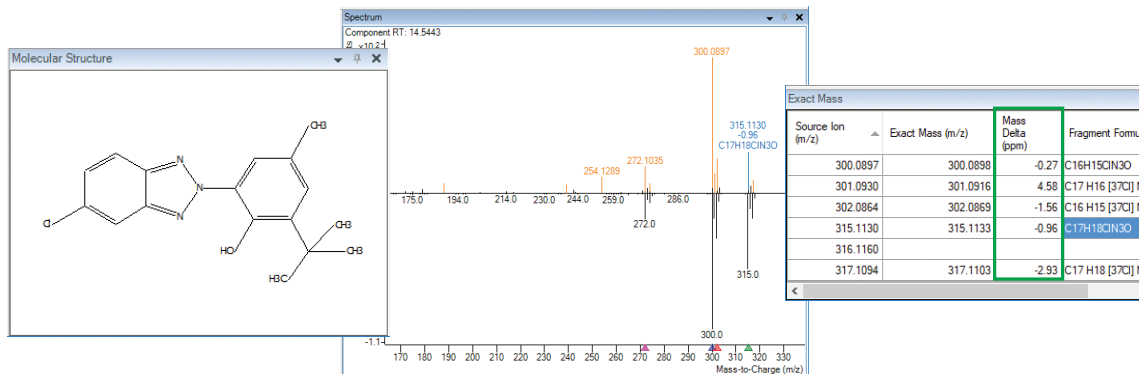


図 7. すべてのサンプリング箇所 で同定した汚染物質の相対量の比較。化合物は、その地理的分布プロファイルに基づいてグループ化しています。

暫定的に同定した化合物：Bis (3-クロロ-2-プロピル) (1-クロロ-2-プロピル) リン酸塩 (C₉H₁₈Cl₃O₄P)



暫定的に同定した化合物：ブメトリゾール (C₂₇H₁₈ClN₃O)



暫定的に同定した化合物：メトキサレン (C₁₂H₈O₄)

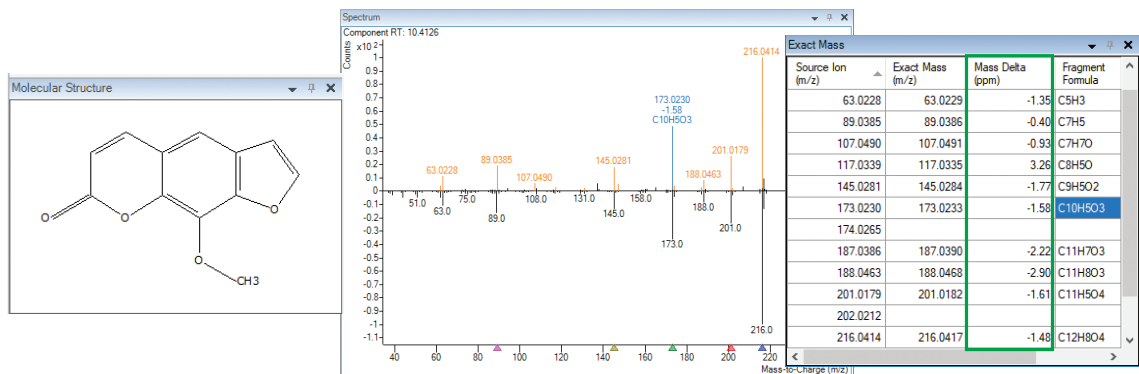


図 8. UB 箇所から Agilent MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアと NIST17.L ライブラリを用いて暫定的に同定した汚染物質の例。デコンボリュートしたスペクトルのフラグメントは質量誤差が小さく、同定した化合物の分子式を確認するための追加情報になります。

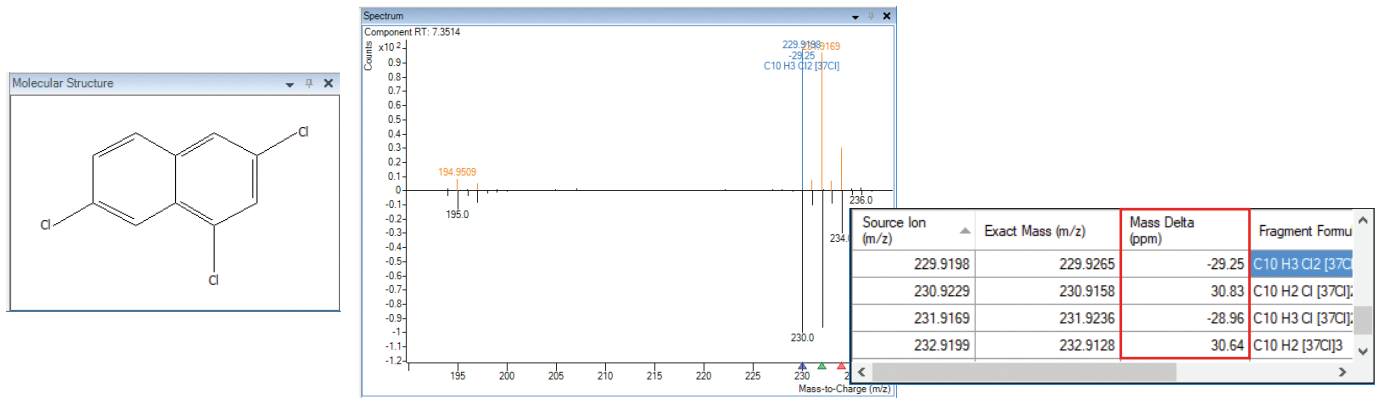
未知化合物の同定

暫定的に同定した化合物の一部は質量誤差が大きいため確認できず、精査の対象となりました。図 9 は、このようなケースの例を示しています。NIST ライブラリによりライブラリー一致スコア 73.9 で 1,3,7-トリクロロナフタレンとして暫定的に同定した化合物は、

ExactMass 機能を用いた評価により除外されました。これは、化合物のスペクトルイオンと、同定した化合物の分子イオン同位体クラスタに対応する理論上のイオンの間に大きな質量差異 (約 30 ppm) が存在するためです。

化合物を同定するために、Low Energy EI 設定 (15 eV) により分子イオンを確認しました。Agilent MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアの Molecular Formula Generation (MFG) 機能を用いて、暫定的に同定した分子イオンの同位体クラスタのアノテーションを行いました (図 9B、ステップ 1)。次に、暫定的に同

A 暫定的に同定した NIST17 化合物：1,3,7-トリクロロナフタレン ($C_{10}H_5Cl_3$)



B ステップ1:M+の確認 → ステップ2:フラグメントイオンの確認 → ステップ3:候補物質に関する構造解明

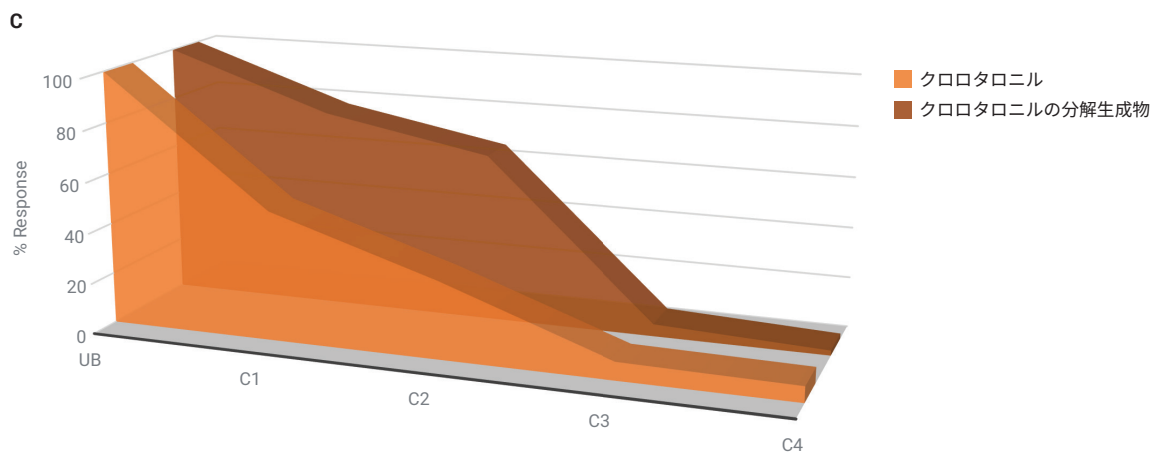
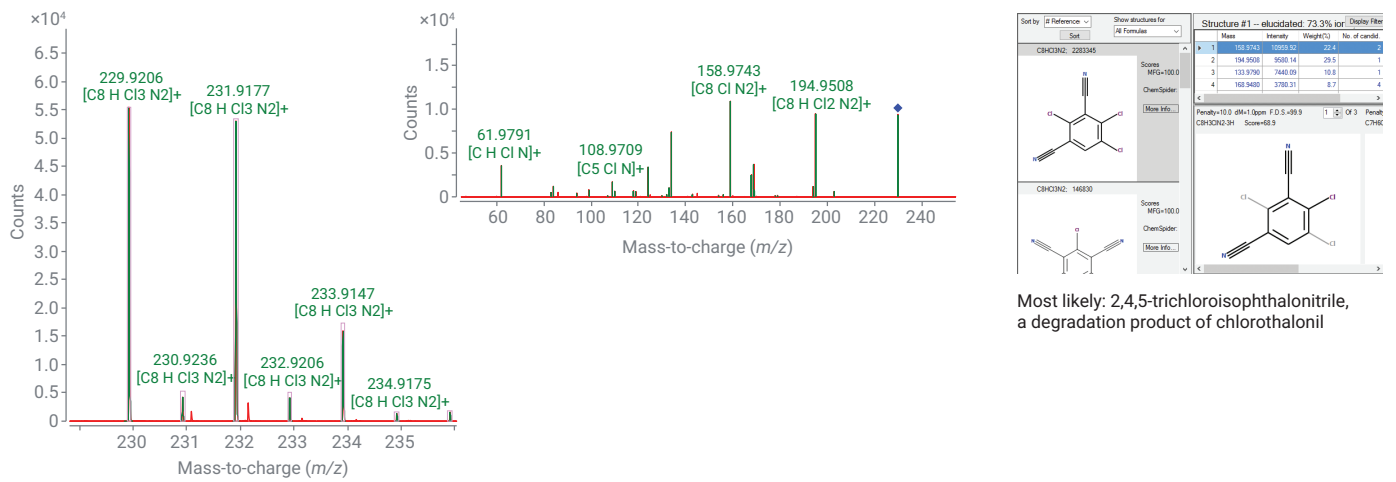


図 9. 暫定的に同定した 1 つの化合物の同定確認と構造解明。質量誤差が大きく、化合物を誤って同定していました (A)。精密質量プロダクトイオンスペクトルに対して、Molecular Structure Correlator ツールを使用することにより、化合物を同定しました (B)。サンプリング箇所でのクロロタロニルおよびその分解生成物である 2,4,5-トリクロロイソフタロニトリルの分布 (C)。

定した分子イオンをプリカーサとして使用して MS/MS を実施しました (図 9B、ステップ 2)。続いて、この未知化合物の構造推定・解明のために、Molecular Structure Correlator を用いて MS/MS データを処理しました (図 9B、ステップ 3)。最も可能性の高い構造は、クロロタロニルの分解生成物である 2,4,5-トリクロロイソフタロニトリルです。特に、クロロタロニルのプロファイルは、その分解生成物ともよく一致しています (図 9C)。

結論

ターゲット化合物の定量、GC/Q-TOF 精密質量 PCDL に基づいたサスペクトスクリーニング、ノンターゲット分析手法を含む包括的なワークフローを用いて、表流水サンプルから多数の農薬およびその他の環境汚染物質を同定しました。

Low Energy EI および精密質量 MS/MS を用いることにより、ノンターゲットスクリーニングでの化合物の同定と未知化合物の構造推定および解明が達成できました。未知化合物のうちの 1 つを、クロロタロニルの分解生成物である 2,4,5-トリクロロイソフタロニトリルとして暫定的に同定しました。

参考文献

1. Geissen, V; *et al.* Emerging Pollutants in the Environment: A Challenge for Water Resource Management. International Soil and Water Conservation Research **2015**, 3(1), 57–65.
2. Agilent SureMass. Agilent Technologies technical overview, publication number 5991-8048EN, **2017**.
3. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (**2015**).
4. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Memorandum: Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data within the Office of Foods and Veterinary Medicine (**2015**).

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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. 2019

Printed in Japan, September 16, 2019

5994-1371JAJP