環境、食品、農業



測定困難なマトリックスにおける PAH の GC/MS/MS 分析の最適化

Agilent 8890/7000D トリプル四重極 GC/MS、JetClean、 ミッドカラムバックフラッシュ

著者

Anastasia A. Andrianova, and Bruce D. Quimby, Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent 8890 GC と Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS システムを組み合わせて使用し、多環芳 香族炭化水素 (PAH) の分析を行いました。適切な機器の構成と使用条件を選択することにより、測定 困難なマトリックス中の PAH の堅牢な分析が可能になります。ミッドカラムバックフラッシュ、水素によ る連続的なイオン源クリーニング (JetClean)、代替ドローアウトレンズの使用により、1 ~ 1,000 pg の キャリブレーション範囲で優れた直線性が示されました。有機物濃度の高い土壌からの抽出物の繰り返 し注入において、システムの精度と堅牢性が実証されました。また、MS よりも優れた MS/MS の選択 性によってデータ確認が容易になります。

はじめに

PAH は水生生物に対して有害であり、人間に 対する発がん性が疑われています。複数の発 生源があるため、汚染物質として世界中に広 く分布しています。

PAH の発生源は次の3つです。

- 石油由来: 化石燃料に関連する石油材料 から生じるもの
- 火成: 燃焼源から生じるもの
- **生物由来:** 自然の生物学的プロセスから 生じるもの

PAH は至る所に存在しており、海産物、食用 油、燻製肉など多くの食品で微量汚染物質と してモニタリングされます。また、空気、水、お よび土壌などの環境内でもモニタリングされ ます。PAH の分析には HPLC/UV、GC/FID、 GC/MS、GC/MS/MS など複数の手法が用い られています。

このアプリケーションノートでは、GC/MS/MS の MRM モードに焦点を当てています。一般 的なキャリブレーション範囲は 1 ~ 1,000 pg で、許容可能な直線性は R² >0.99 です。通 常、内部標準 (ISTD) の面積再現性は標準溶 液については ±20 % に指定され、サンプル については ±30 % に指定されます。

PAH の特性のため、分析では多くの問題が生 じます。これらは分子量から沸点範囲まで多 岐にわたります。PAH は活性が低いものや分 解されにくいとされているものでも、表面に吸 着しやすい傾向があります。PAH は凝結(気 体から固体への相転移)しやすく、気化させる のが困難です。高温にし、表面の接触を最小 限にすることが重要です。溶出の遅い化合物 ではピークテーリングがよく見られ、マニュア ル積分が必要になったりデータ確認に時間が かかったりします。場合によっては、ISTD レス ポンスがキャリブレーション範囲で不均一にな り、メソッドの直線性に問題が生じることがあ ります。 PAH に関連する問題に加えて、分析ではマト リックスに関連する問題も頻繁に生じます。例 えば、食品分析や土壌分析では、分析後に溶 出する高沸点のマトリックスによる汚染があ り、その後の分析のゴーストピークを回避する ために長時間の焼き出しが必要になる場合が あります。最も沸点の高い汚染物質がカラム ヘッドに堆積し、頻繁なカラムトリミングや、リ テンションタイムのシフトの発生による MRM およびデータ分析時間帯の調整が必要になる ことがあります。

実験方法

使用するシステムの構成は、高マトリックスサ ンプル中の PAH の分析時の潜在的な問題が 最小限になるように行いました。使用した重 要な手法は次のとおりです。

- MS/MS: GC/MS/MS の MRM モード の選択性が優れているため、マトリック スからの干渉レスポンスが低減または排 除され、高マトリックスサンプル中のデー タ確認を GC/MS より容易に行うことが できます。干渉レスポンスがあるときは 多くの場合、定量イオンまたは確認イオ ンのマニュアル積分が必要になります。
- JetClean: Agilent 7000D トリプル四 重極 GC/MS システムでは、このオプ ションを使用して分析中に低流量の水素 (0.33 mL/min) を連続的にイオン源に 供給することができます。イオン源を水 素で連続的にクリーニングすると、検量 線の直線性と PAH 分析中のレスポンス 精度が大幅に向上することが実証されて います^{1~3}。特に高マトリックスサンプル において、マニュアルでのイオン源クリー ニングを大幅に減らすことができます。

- 9 mm エクストラクタレンズ: Agilent エ クストラクタイオン源は柔軟性が高く、さ まざまな分析課題の特定のニーズに適 合します。 PAH の分析では、PAH が 堆積しうる表面が最小限になる 9 mm エクストラクタレンズが最適な選択肢で あり、JetClean を用いることで、優れた 直線性、精度、ピーク形状が実現します。
- **ミッドカラムバックフラッシュ:**バックフ ラッシュとは、最後のターゲット化合物 がカラムから排出された後にキャリアガ ス流を逆流させる手法です。 MS データ の収集後、オーブンをポストランモード で最終温度に保ち、第1カラムからの キャリアガス流を逆流させます。この逆 流によって、データ収集終了時にカラム 内に存在した高沸点化合物がカラムヘッ ドからスプリットベントラインへ運ばれま す。この逆流はアジレントのパージ付き Ultimate Union (PUU) が提供する機能 です。PUU は挿入されるティであり、こ の場合は2つの同一の15mカラムの 間に挿入されます。分析中、8890 ニュー マティックシステムデバイス (PSD) モ ジュールからの少量のメークアップキャ リアガスで接続部をスイープしました。 バックフラッシュ中、PSD からのメーク アップ流量が大幅に上昇し、第1カラム は逆流、第2カラムは MS 側に流れるこ とによって高沸点化合物をスイープしま した。この構成の場合、バックフラッシュ 時間は 1.5 分でした。
- 8890 PSD モジュール: PSD はバックフ ラッシュアプリケーション用に最適化さ れた 8890 ニューマティクスモジュール です。バックフラッシュ中、使用するヘリ ウム流量が従来の構成より大幅に低減 されます。PSD ではシームレスにパルス 注入を行うことができ、バックフラッシュ の設定が容易です。

図1に、使用したシステムの構成を示します。 表1と表2に、使用した機器の操作パラメー タを示します。機器の温度を十分な高さに保 ち、最も沸点の高い PAH が堆積しないように する必要があります。注入口および MSD トラ ンスファーラインは 320°C に保ちます。MS イオン源は 320°C 以上に保ちます。



図 1. システム構成

表 1. PAH 分析の GC および MS 条件

8890 GC、 高速オーブン、オートインジェクタ、およびトレイ		
注入口	EPC スプリット/スプリットレス	
モード	パルスドスプリットレス	
注入パルス圧力	50 psi、0.7 分間	
スプリットベントへのパージ流量	0.75 分で 50 mL/min	
セプタムパージ流量モード	標準	
注入量	1.0 μL	
注入口温度	320 ° C	
キャリアガス	ヘリウム	
注入ロライナ	Agilent 4 mm シングルテーパ、ガラスウール入り (p/n 5190-2293)	
オーブン	80°Cで1分 25°C/minで200°Cまで加熱 8°C/minで335°Cまで加熱、6.325分間維持 合計分析時間: 29分 ポストラン時間: 1.5分 平衡化時間: 0.5分	
カラム 1	DB-EUPAH、0.25 mm × 15 m、0.25 μm (カスタムオーダー)	
コントロールモード	定流量、0.9557 mL/min	
注入口接続	スプリット/スプリットレス	
出口側接続	PSD (PUU)	
ポストラン流量 (バックフラッシュ)	-12.027 mL/min	
カラム 2	DB-EUPAH、0.25 mm × 15 m、0.25 μm (カスタムオーダー)	
コントロールモード	定流量、1.1557 mL/min	
注入口接続	PUU	
出口側接続	MSD	
ポストラン流量 (バックフラッシュ)	12.518 mL/min	

7000D トリプル四重極 GC/MS				
イオン源	不活性エクストラクタ			
ドローアウトレンズ	9 mm			
チューニングファイル	atunes.ei.tune.xml			
モード	MRM			
溶媒ディレイ	4分			
EM 電圧ゲインモード	10			
四重極温度 (MS1 および MS2)	150 ° C			
イオン源温度	320 ° C			
トランスファーライン温度	320 ° C			
JetClean モード	測定とクリーニング			
JetClean 水素流量	0.33 mL/min			

特に重い PAH のカラムへの移送を最大化す るため、パルスドスプリットレス注入を使用し ます。ガラスウール入りで内径 4 mm のスト レートライナが必須です。ウールによって熱が PAH に伝わり、注入ロベースに直接接触しな くなります。PAH が注入ロベースで凝結する と、PAH の気化とカラムへの流入が難しくな ります。

Agilent PAH アナライザキャリブレーション キット (p/n G3440-85009) をイソオクタンで 希釈して、PAH 標準溶液を調製しました。こ のキットには 27 種の PAH の原液 10 µg/mL と 5 種の ISTD の原液 50 µg/mL が含まれま す。1、2、10、20、100、200、1,000 pg/µL の 7 つのキャリブレーションレベルを用意しま した。各レベルに ISTD 500 pg/µL も含まれ ています。化合物の同定については、表 2 お よび図 2 を参照してください。

スゲ泥炭サンプル (Garden Magic、Michigan Peat Company、テキサス州ヒューストン) を 120°C で一晩乾燥させました。乾燥泥炭 5 g をジクロロメタン/アセトン (1:1 v:v) 30 mL を 用いて一晩撹拌し、抽出しました。抽出物をろ 過し、ろ液を蒸発させて容量を 7.5 倍濃縮しま した。生成された抽出物を堅牢性の実験に使 用しました。

表 2. 定量および定性に用いる MRM トランジション

名前	RT	定量	CE	定性	CE
ナフタレン-d8	5.041	136.0 → 136.0	19		
ナフタレン	5.067	128.0 → 102.0	22	128.0 → 127.0	20
1-メチルナフタレン	5.693	142.0 → 115.0	30	142.0 → 141.0	30
2-メチルナフタレン	5.864	142.0 → 115.0	30	142.0 → 141.0	30
ビフェニル	6.249	154.0 → 152.0	25	154.0 → 153.0	25
2,6-ジメチルナフタレン	6.285	156.0 → 115.0	30	156.0 → 141.0	30
アセナフチレン	6.986	152.0 → 150.0	40	152.0 → 151.0	40
アセナフテン-d10	7.095	162.0 → 160.0	19		
アセナフテン	7.149	154.0 → 152.0	40	153.0 → 152.0	40
2,3,5-トリメチルナフタレン	7.361	170.0 → 155.0	25	170.0 → 153.0	25
フルオレン	7.858	166.0 → 165.0	30	166.0 → 163.0	34
ジベンゾチオフェン	9.618	184.0 → 139.0	40	184.0 → 152.0	40
フェナントレン-d10	9.819	188.0 → 188.0	19		
フェナントレン	9.879	178.0 → 176.0	34	178.0 → 152.0	30
アントラセン	9.940	178.0 → 176.0	34	178.0 → 152.0	30
1-メチルフェナントレン	11.217	192.0 → 191.0	25	192.0 → 165.0	30
フルオランテン	12.882	202.0 → 200.0	50	202.0 → 201.0	50
ピレン	13.692	202.0 → 200.0	50	202.0 → 201.0	30
ベンゾ(a)アントラセン	17.145	228.0 → 226.0	38	228.0 → 224.0	38
クリセン-d12	17.309	240.0 → 236.0	25	118.0 → 116.0	25
クリセン	17.400	228.0 → 226.0	38	228.0 → 224.0	38
ベンゾ(b)フルオランテン	20.379	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(k)フルオランテン	20.445	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(j)フルオランテン	20.543	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(e)ピレン	21.412	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(a)ピレン	21.549	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ペリレン-d12	21.806	264.0 → 260.0	40	264.0 → 236.0	25
ペリレン	21.884	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ジベンズ(a,c)アントラセン	24.347	278.0 → 276.0	38	276.0 → 274.0	38
ジベンズ(a,h)アントラセン	24.474	278.0 → 276.0	38	276.0 → 274.0	38
インデノ(1,2,3,-cd)ピレン	24.504	276.0 → 274.0	42	138.0 → 124.0	30
ベンゾ(ghi)ペリレン	25.644	276.0 → 274.0	42	274.0 → 272.0	42

結果と考察

初回キャリブレーション

図 2 は標準溶液 100 pg の MRM TIC です。 選択したパラメータでは、すべての PAH につ いて良好なピーク形状が得られ、特に最後の PAH が非常に良好なピーク形状になりました。

9 mm レンズと水素による連続的なクリーニン グを使用すると、多くの場合 S/N 比がある程 度低下するため、必要な最低キャリブレーショ ンレベルを確認することが重要です。例えば、 図 3 は 1 pg レベルの複数の化合物の定量イ オンにおけるレスポンスを示しています。1 pg レベルのすべてのターゲット化合物がキャリブ レーションに十分な信号を示しています。







図3. 選択化合物の最低濃度標準溶液 (1 pg) の MRM 定量イオンのレスポンス

表3に、1~1,000 pg の7つのレベルにお けるシステムの4種の ISTD キャリブレーショ ンの R² 値を示します。すべてのターゲット化 合物が範囲全体で優れた直線性を示していま す。最初の2つのキャリブレーションが初回の もので、後の2つが100 ppb 標準を60回測 定した後のものです。これらのデータがこの構 成のシステムの直線性とレスポンスの安定性 を実証しています。

レスポンスの安定性

図 4 は 100 pg 標準の 120 回連続繰り返し 分析における複数のターゲット化合物の算出 濃度を示しています。システムのレスポンスの 優れた安定性が示されています。全 27 種の ターゲット化合物の 120 回の注入における算 出濃度の平均 RSD は 1.5%です。

120 回の注入における ISTD の生の面積の RSD は次のとおりでした。

- ナフタレン-d₈ (2.9%)
- アセナフテン-d₁₀(3.2%)
- フェナントレン-d₁₀ (2.9 %)
- クリセン-d₁₂ (4.7%)
- ペリレン-d₁₂ (5.1 %)

表 3.7 つのレベルの ISTD キャリブレーションの R² 値 (1 ~ 1,000 pg の MRM)。 キャリブレーション 1 および 2 は初回のもので、 キャリブレーション 3 および 4 は 100 pg 標準を 60 回測定した後に実行

化合物	キャリブレーション1	キャリブレーション 2	キャリブレーション 3*	キャリブレーション 4*
ナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
1-メチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998
2-メチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998
ビフェニル	0.9999	0.9998	0.9999	0.9998
2,6-ジメチルナフタレン	0.9998	0.9998	0.9998	0.9997
アセナフチレン	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999
アセナフテン	0.9999	0.9999	0.9999	1.0000
2,3,5-トリメチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
フルオレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
ジベンゾチオフェン	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999
フェナントレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
アントラセン	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999
1-メチルフェナントレン	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998
フルオランテン	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999
ピレン	0.9998	0.9999	0.9998	0.9998
ベンゾ(a)アントラセン	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999
クリセン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
ベンゾ(b)フルオランテン	0.9996	0.9996	0.9996	0.9997
ベンゾ(k)フルオランテン	0.9997	0.9996	0.9998	0.9995
ベンゾ(j)フルオランテン	0.9992	0.9999	1.0000	0.9985
ベンゾ(e)ピレン	0.9996	0.9998	0.9998	0.9999
ベンゾ(a)ピレン	0.9994	0.9996	0.9995	0.9997
ペリレン	0.9995	0.9996	0.9995	0.9996
ジベンズ(a,c)アントラセン	0.9996	1.0000	0.9996	0.9993
ジベンズ(a,h)アントラセン	0.9994	0.9995	0.9997	0.9996
インデノ(1,2,3,-cd)ピレン	0.9994	0.9994	0.9996	0.9996
ベンゾ(ghi)ペリレン	0.9997	0.9998	0.9998	0.9998



図 4.100 pg 標準溶液の 120 回連続注入における算出濃度の安定性

土壌抽出物におけるレスポンスの安定性

堅牢性テストで使用する土壌抽出物には、シ ステムでの測定が難しい高マトリックスが含ま れるものを意図的に選びました。図 5 は 100 pg の PAH 標準でスパイクした抽出物および 500 pg の ISTD のスキャン TIC と、比較対象 として 100 pg の PAH 標準のスキャン TIC を 示しています。土壌抽出物には非常に高いレ ベルのマトリックスが含まれています。なお、 このようなレベルの有機物を含む土壌の場 合、ルーチン分析では追加のサンプルクリーン アップを検討する必要があります。使用したサ ンプル前処理法はテストのみを目的としてい ます。

システムの堅牢性をテストするため、土壌抽 出物を 27 種のターゲット化合物各 100 pg、 ISTD 各 500 pg でスパイクしました。次に、 スパイクした抽出物を 60 回注入しました。測 定ごとに溶媒ベースの検量線に対して PAH を定量し、算出された濃度をプロットしました。 図 6 は複数のターゲット化合物の算出濃度を 示しています。ナフタレンとベンゾ[ghi]ペリレ ンはいずれもスパイクされた 100 pg レベル よりも高い濃度測定値を示しています。これら の化合物はおおよそ図 7 のオフセットに相当 するレベルで土壌内に存在していることがわ かりました。ペリレン (ここには示されていま せん) はおおよそ 200 pg 土壌内に存在してい ることがわかりました。

27 種すべてのターゲット化合物の算出濃度の 平均 RSD は 4.1 % でした。27 種中 25 種の ターゲット化合物で、60 回の土壌分析後の算 出濃度が最初の注入算出濃度の 20 % 以内の ずれでした。予想どおり、ベンゾ[ghi]ペリレン などの最も重いターゲット分析物のレスポン スは最も早く失われました。



図 5. 土壌抽出物および PAH 標準 100 pg と ISTD 500 pg のスキャン TIC を両方同じ目盛りで示したもの。 抽出物中の多くの物質が示されている



図 6. 100 pg の PAH 標準でスパイクした土壌マトリックスと 500 pg の ISTD の 60 回注入における算出濃度の 安定性

土壌抽出物を 60 回注入した後、注入口メン テナンスを実施しました。このメンテナンスで はセプタム、注入ロライナ、ゴールドシールを 交換し、カラム1のヘッドから30cmを除去 しました。ライナとゴールドシールを取り外し ている間に、メタノールを染み込ませた綿棒で 注入口を清掃しました。メンテナンス後、標準 溶液 100 ppb を測定し、2 回の繰り返し実験 前に作成した元の検量線を用いて定量しまし た。表4に、濃度測定値を示します。すべての ターゲット化合物が予想された値の 12 % 以 内に収まっていました。表4に、注入口メンテ ナンス後のフルキャリブレーションの R² 値を 示します。表 4 のデータは、この土壌におけ るシステム性能の低下が予想どおり注入口と カラムヘッドに限られることを示しています。

イオン源のクリーニングは不要でした。使用し たようなマトリックスレベルではこのようにな ることがよくあります。JetClean と 9 mm ド ローアウトレンズを使用すると、イオン源の性 能を通常大きく低下させる堆積が大幅に減り ます。



図7. 土壌抽出物中にスパイクした100 ppb の PAH の定量クロマトグラムと 定性クロマトグラムの重ね表示。A) ベンゾ[ghi]ペリレン、シングル四重極 GC/MS の SIM モード。B) 同じ抽出物、GC/MS/MS の MRM モード

MRM の選択性

PAH はシングル四重極 GC/MS で正常に分 析できることが多いのに対し⁴、土壌などのマ トリックスはターゲット化合物とのスペクトル 干渉のためにデータ確認が困難になる場合が あります。これらの干渉がある場合、干渉の影 響を考慮するためのマニュアル積分が必要に なることがよくあります。GC/MS/MS を使用 するとこれらの干渉が大幅に減少します。図 7 を参照してください。上の部分はシングル四 重極でのベンゾ [ghi] ペリレンの SIM の定量 イオンと 3 つの確認イオンと重ね描きを示し ており、下の部分はトリプル四重極の MRMの ものを示しています。

GC/MS クロマトグラムでは、確認イオンの 1 つ (277) には比較的干渉がありません。他 の 2つの 確認イオン (138 および 137) に は大きなマトリックス干渉があり、マニュア ル積分が必要になると考えられます。一方、 GC/MS/MS MRM (B) は選択性がかなり優 れており、データ確認が非常に簡単です。

結論

このシステムは GC/MS PAH 分析で生じる多 くの問題に対応できます。GC/MS/MS を用 いることでマトリックスからのスペクトル干渉 時の選択性が大幅に向上し、GC/MS に比べ てデータ確認が容易になります。JetClean、 9 mm ドローアウトレンズ、高いゾーン温度、 適切なライナを用いることで、直線性、ピーク 形状、システムの堅牢性が大きく向上します。 JetClean とバックフラッシュによってマニュア ルでのイオン源クリーニングとカラムトリミン グの必要性が大幅に減少し、ラボの生産性の 向上が実現します。 表 4. キャリブレーションチェックおよび 7 つのレベルの ISTD キャリブレーションのR² 値 (システムメンテナンス後の 1 ~ 1,000 pg の MRM)

化合物	再キャリブレーション前のキャリブレーション用 標準液 100 pg の算出濃度	メンテナンス後の キャリブレーション
ナフタレン	99	1.0000
1-メチルナフタレン	96	1.0000
2-メチルナフタレン	98	1.0000
ビフェニル	94	1.0000
2,6-ジメチルナフタレン	93	1.0000
アセナフチレン	99	1.0000
アセナフテン	98	1.0000
2,3,5-トリメチルナフタレン	98	1.0000
フルオレン	97	1.0000
ジベンゾチオフェン	90	1.0000
フェナントレン	96	1.0000
アントラセン	105	1.0000
1-メチルフェナントレン	96	1.0000
フルオランテン	97	1.0000
ピレン	97	1.0000
ベンゾ[a]アントラセン	95	0.9999
クリセン	96	1.0000
ベンゾ[b]フルオランテン	97	1.0000
ベンゾ[k]フルオランテン	99	1.0000
ベンゾ[j]フルオランテン	112	1.0000
ベンゾ[e]ピレン	94	1.0000
ベンゾ[a]ピレン	96	1.0000
ペリレン	94	1.0000
ジベンズ[a,c]アントラセン	96	0.9999
ジベンズ[a,h]アントラセン	94	1.0000
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	95	1.0000
ベンゾ[ghi]ペリレン	94	1.0000

参考文献

- Szelewski, M.; Quimby, B. D. Optimized PAH Analysis Using the Agilent Self-Cleaning Ion Source and Enhanced PAH Analyzer, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5191-3003EN, 2013.
- 2. Modified ion source triple quadrupole mass spectrometer gas chromatograph for polycyclic aromatic hydrocarbons", Kim A. Anderson, Michael J. Szelewski, Glenn Wilson, Bruce D. Quimby, Peter D. Hoffman, *Journal of Chromatography A* **2015**, *1419*(6), 89-9US.
- Quimby, B. D.; Prest, H. F.; Szelewski, M. J.; Freed, M. K. *In-situ* conditioning in mass spectrometer systems, *US Patent 8,378,293*, 2013.
- Andrianova, A. A.; Quimby, B. D. Optimized GC/MS Analysis for PAHs in Challenging Matrices, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0499EN, 2019.

ホームページ www.agilent.com/chem/jp

カスト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. 2018 Printed in Japan, December 12, 2018 5994-0498JAJP

