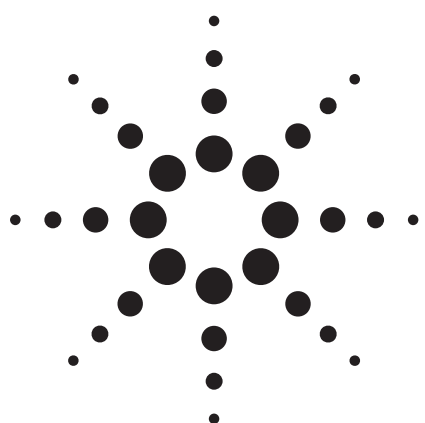


LC/Q-TOFを用いた環境関連化合物の分析

第1部：染料と色素



アプリケーション

環境

著者

Jim Lau, Chin-Kai Meng, and Jennifer Gushue
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Vimal Balakrishnan and Mehran Alaei
Environment Canada
Aquatic Ecosystem Protection Research Division
867 Lakeshore Road
Burlington, ON, L7R 4A6
Canada

概要

染料/色素は世界中で生産され、毎年推定1万トンが製造されています。そのうち約10%は、何らかの形(元の化合物または分解物など)で環境中に排出されます。カナダ環境省(Environment Canada)は、染料と色素を化学管理リストの最重要物質と位置づけています。環境中には多くの染料と色素が存在しています。多数の化合物を1回の分析でスクリーニングおよび同定するには、液体クロマトグラフ/四重極飛行時間型質量分析装置(LC/Q-TOF)が最適な手法です。

LC/Q-TOFの良好な質量精度(3 ppm 未満)とMS/MSにより、イオン検出およびイオン構造を確認するための強力な性能と高い信頼性が得られます。こうした機能は、QAや未知化合物の確認に役立ちます。

はじめに

従来、環境アプリケーションはGC、GC/MSなどの装置で実施されていました。LC/MSは、環境分野に必要な感度と堅牢性を備えていませんでした。しかし近年、LC/MS技術が大幅に向上し、現在では有害化合物のモニタリングなどの環境アプリケーションに日常的に使用されるようになってきました。たとえば、LC/トリプル四重極質量分析装置(QQQ)は分析目的化合物のスクリーニングや定量に用いられています。

新たなLC/MSテクニックが登場し、性能が改良されたことで、多くの化合物が同定されています(新たに出現した化合物)。環境分析の対象となる化合物は、以下の3つのカテゴリーに分類されます：

1. 既知の既知物質：分析対象化合物が既知の場合(QQQターゲット分析など)。
2. 未知の既知物質：サンプル中に複数の分析対象化合物が存在することは分かっているが、その化合物の種類が明確になっていない場合(代謝物、分解産物など)。
3. 未知の未知物質：存在する化合物の種類が不明で、存在するか否かも不明な場合。

QQQは、カテゴリー1のスクリーニングに使用できます。しかし、化合物を同定する必要があるカテゴリー2と3には、Q-TOFが必要となります。ルーチン精密質量測定では、精密質量を使用したデータベース検索により、Q-TOFで化合物を検出することが可能です。また、Q-TOFのMS/MSにより、検出した化合物をさらに確認することができます。



Agilent Technologies

カナダ環境省 (Environment Canada) は、各種化合物の危険性と環境への影響の評価を担っています [1、2]。染料と色素は、化学管理リストの最重要物質とされています。染料/色素は世界中で生産され、毎年推定1万トンが製造されています。そのうち約10%は、何らかの形(元の化合物または分解物など)で環境中に排出されます。環境中には多くの染料と色素が存在しています。しかし、分析に利用できる標準物質の数は限られています。標準物質の作成は可能ですが、最初に分析対象化合物を同定し、特徴づける必要があります。

本研究の目的は、精密質量から有用な組成式を推定できる精密質量分析およびQ-TOFの機能を紹介することです。また、精密質量と組み合わせたMS/MSを用いれば、イオン検出とイオン構造を確認することが可能です。

実験手法

サンプル

本アプリケーションで分析した染料/色素は、アゾ染料とアントラセンジオン種の2種類です。

分析した化合物は、アシッドブルー80、アシッドブルー129、スーダングリーン3、トルイジンレッド、スーダンIIIです。これらの化合物は、分析の主要ターゲットです。ただし、のちの評価のために、さらに多くのサンプルカテゴリーを追加します。第1の目的は、スクリーニングです。この場合、確認のために高い質量精度が必要となります。第2の目的は、分解産物の分析です。

機器パラメータ

すべてのサンプル分析は、Agilent 1200 SL Rapid Resolution LCとAgilent 6520 Q-TOFを組み合わせた装置で実施しました。

すべてのサンプル分析は、Q-TOFオートチューン後に実施しました。すべてのサンプルについて、6520 Q-TOF機器パラメータに一切の変更を加えず、質量精度、感度、分離能を測定しました。ただし、イオン源条件については、スプレーチャンバの種類、LC流量、サンプルの熱安定性に合わせて調節しました。

移動相A	5 mM NH ₄ OAc、pH 4
移動相B	MeOH
LCカラム	ZORBAX XDB 2.1 x 50 mm、C-18、粒子径3.5 μm
流量	0.5 mL/分
MS	2スキャン/秒 50–1100 <i>m/z</i>
リファレンス陽イオン	<i>m/z</i> 121、922
リファレンス陰イオン	<i>m/z</i> 113、1034
AutoMS/MS	2スキャン/秒MSおよび2スキャン/秒MS/MS
Q-TOFパラメータ	オートチューンで設定
乾燥ガス	13 L/分 N ₂ (300 °C)
ネブライザ圧力	50 psi
ESI (+)	3 kV
フラグメンタ	140 V

結果と考察

Q-TOFデータファイルのなかから化合物を見つける方法の1つが、組成式の入力による検索です。組成式は1つずつ入力することも、カンマ区切り (CSV) フォーマットでデータベース中のグループとして入力することもできます (図1参照)。データベース入力には、化合物名、組成式、精密質量を含めることもできます。化合物のリテンションタイムは任意ですが、信頼性の高い結果を得るには有用です。図2に、質量許容範囲 ± 5 ppmを用いた5つの一致化合物のスペクトルを示しています。プロトン化イオンは対応する組成式で自動的にラベルされます。表1に、本研究で用いた分析対象化合物5つすべての質量精度 (組成式により測定) を示しています。すべてのMH⁺およびMNa⁺イオンが、3 ppmの精度内に収まっています。

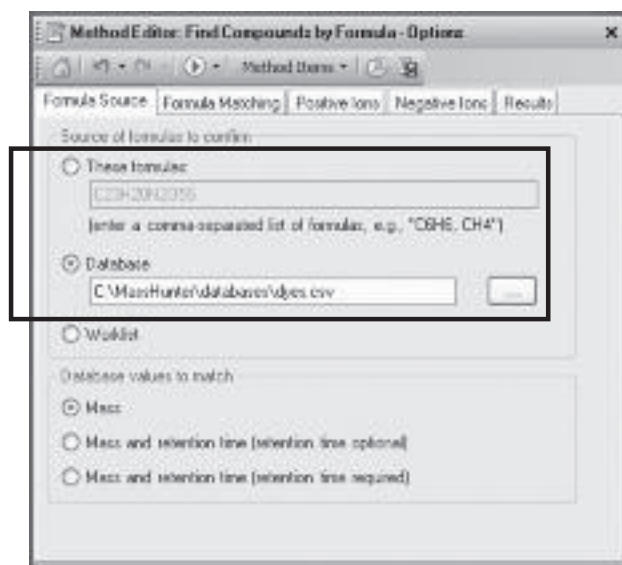


図1. 組成式または組成式データベースの手動入力によるQ-TOFデータファイル中の化合物の検索

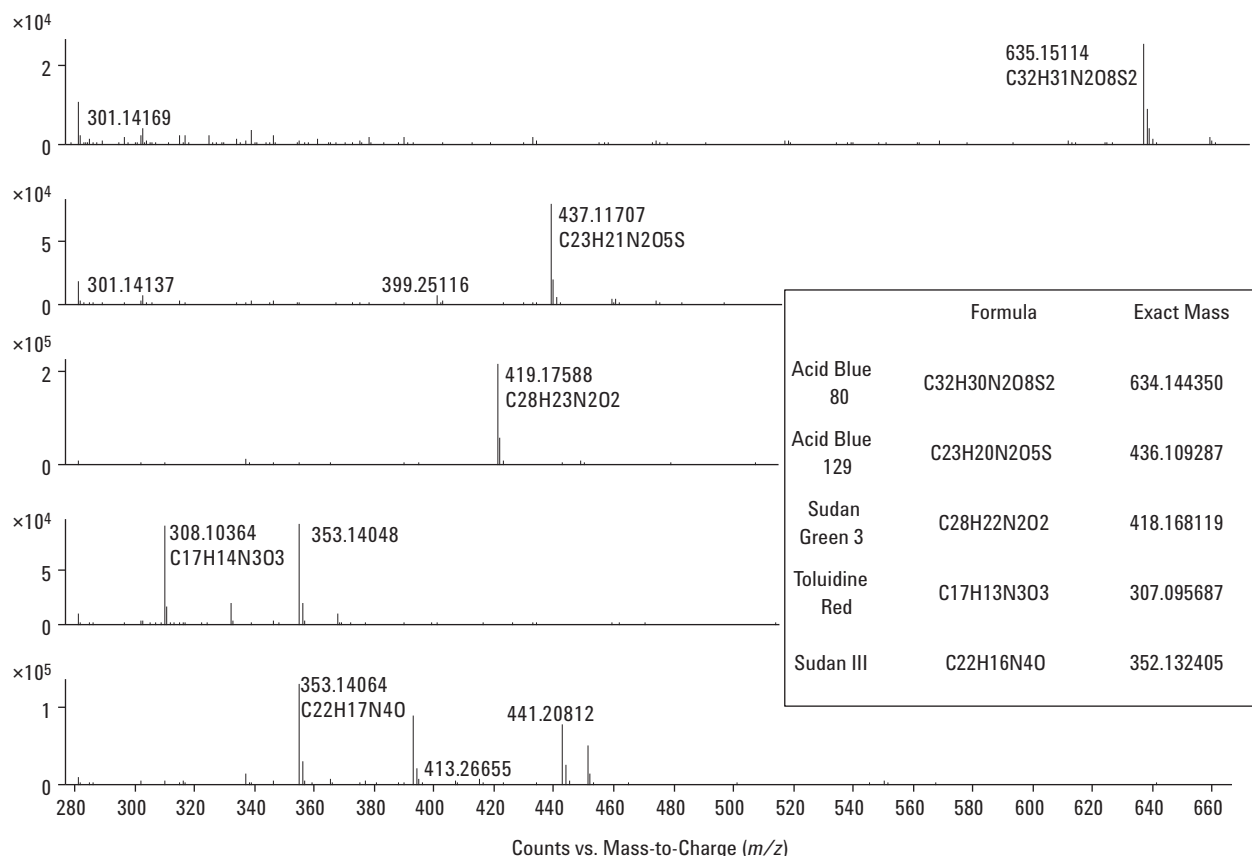


図2. 組成式データベース検索で得られた5つの染料化合物

表1. 組成式検索で得られた5つの化合物の質量精度

	組成式	精密質量	濃度 (MeOH中)	MH ⁺	MNa ⁺
アシッドブルー80	C ₃₂ H ₃₀ N ₂ O ₈ S ₂	634.144350	10 mg/L	0.33 ppm	0.40 ppm
アシッドブルー129	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₅ S	436.109287	10 mg/L	-1.13 ppm	-0.73 ppm
スーダングリーン3	C ₂₈ H ₂₂ N ₂ O ₂	418.168119	10 mg/L	-1.65 ppm	-0.97 ppm
トリイジンレッド	C ₁₇ H ₁₃ N ₃ O ₃	307.095687	10 mg/L	-2.39 ppm	-1.69 ppm
スーダンIII	C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O	352.132405	10 mg/L	-2.89 ppm	-1.28 ppm

データファイル中の化合物を見つけるもう1つの方法が、Molecular Feature Extractor (MFE)を使用する方法です。このソフトウェアプログラムは、イオン特性を調べ、トータルイオンクロマトグラム (TIC) から化合物のピークを抜き出します。図3に、TICとMFEで検出した化合物18種類 (シグナル > 100カウント) のクロマトグラムを重ねて表示しています。検出された各化合物を確認するために、すべての化合物を精密質量データベースで検索しました。図4には、化合物18種類中5種類が一致したデータベース検索結果を示しています。図5は、精密質量データベース検索により特定された5種類の化合物を表示したMassHunterソフトウェア画面です。5種類の化合物のうち、リテンションタイムの異なる2つの化合物 (いずれもスーダンIIIと同定) は、きわめてよく似たスペクトルを示

しました。MassHunterソフトウェア内のホットリンクをクリックすれば、複数のオンラインデータベースで組成式を検索し、さらなる確認を行なうことが可能です。図6には、スーダンIIIをChemIDオンラインデータベースで検索した結果を示しています。この検索では、MS/MS情報が一致する可能性のある2つの位置異性体と、MS/MS情報が一致せず位置以外も異なる4つの異性体が示されました。図7には、データ依存MS/MS (オートMS/MS) で得られたスペクトルを示しています。ここでは、MS/MSプロダクトイオン組成式と、プリカーサイオン組成式に関連する失われた組成式が自動生成されています。この結果は、2つのピークのフラグメンテーションが同一であることを示しています。これにより、2つの化合物がスーダンIIIの異性体であることが確認されました。

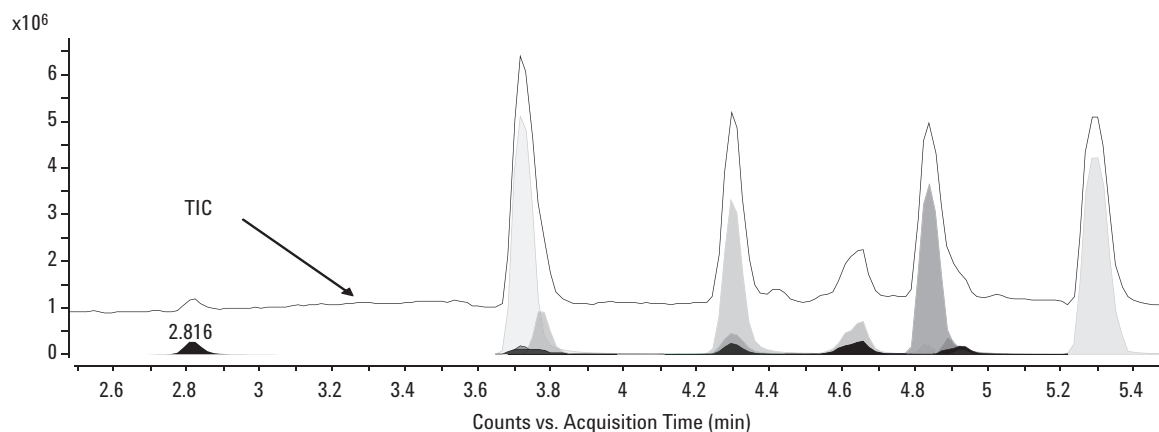


図3. 染料混合物質のトータルイオンクロマトグラム(TIC)とMolecular Feature Extractor (MFE)クロマトグラムの重ね表示。シグナル> 100カウントの条件を用いて、18種類の化合物が検出されました。

Compound List						
Name	RT	Mass	DB Formula	DB Diff (ppm)	Height	
Cpd 1: Acid Blue 129	2.816	436.10981	C23H20N2O5S	-1.19	175661	
Compound 2	3.72	307.25877			178040	
Cpd 3: Toluidine Red	3.722	307.0967	C17H13N3O3	-3.27	3385650	
Compound 4	3.733	329.07803			96154	
Cpd 5: Sudan III	3.775	352.13362	C22H16N4O	-3.44	739956	
Compound 6	4.299	232.1104			204562	
Compound 7	4.3	334.2155			2067458	
Compound 8	4.3	148.01592			191203	
Compound 9	4.301	392.26843			364637	
Compound 10	4.622	329.10603			141919	
Compound 11	4.641	420.29968			210481	
Compound 12	4.642	362.24654			471542	
Compound 13	4.83	390.27811			156716	
Cpd 14: Sudan III	4.84	352.13377	C22H16N4O	-3.86	2430832	
Compound 15	4.893	440.2012			281429	
Compound 16	4.921	390.27759			128443	
Compound 17	4.928	157.05266			100077	
Cpd 18: Sudan Green	5.296	418.16943	C28H22N2O2	-3.12	2842571	

図4. 精密質量データベース検索により、5種類の化合物がヒットしました。

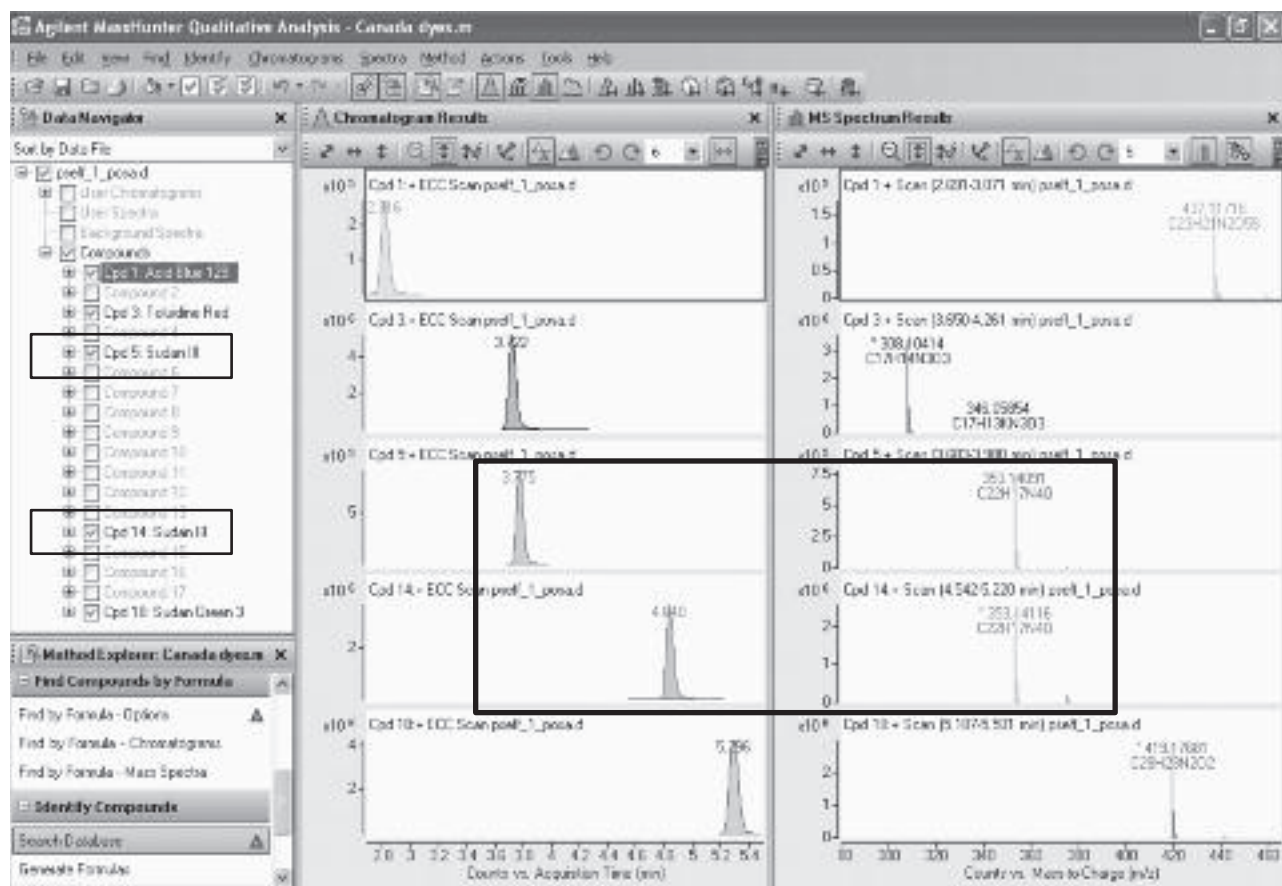


図5. 精密質量データベース検索でヒットした5つの化合物を表示するMassHunterソフトウェア画面



図 6. スーダンIII組成式のホットリンクから得られたChemIDオンラインデータベース検索の結果

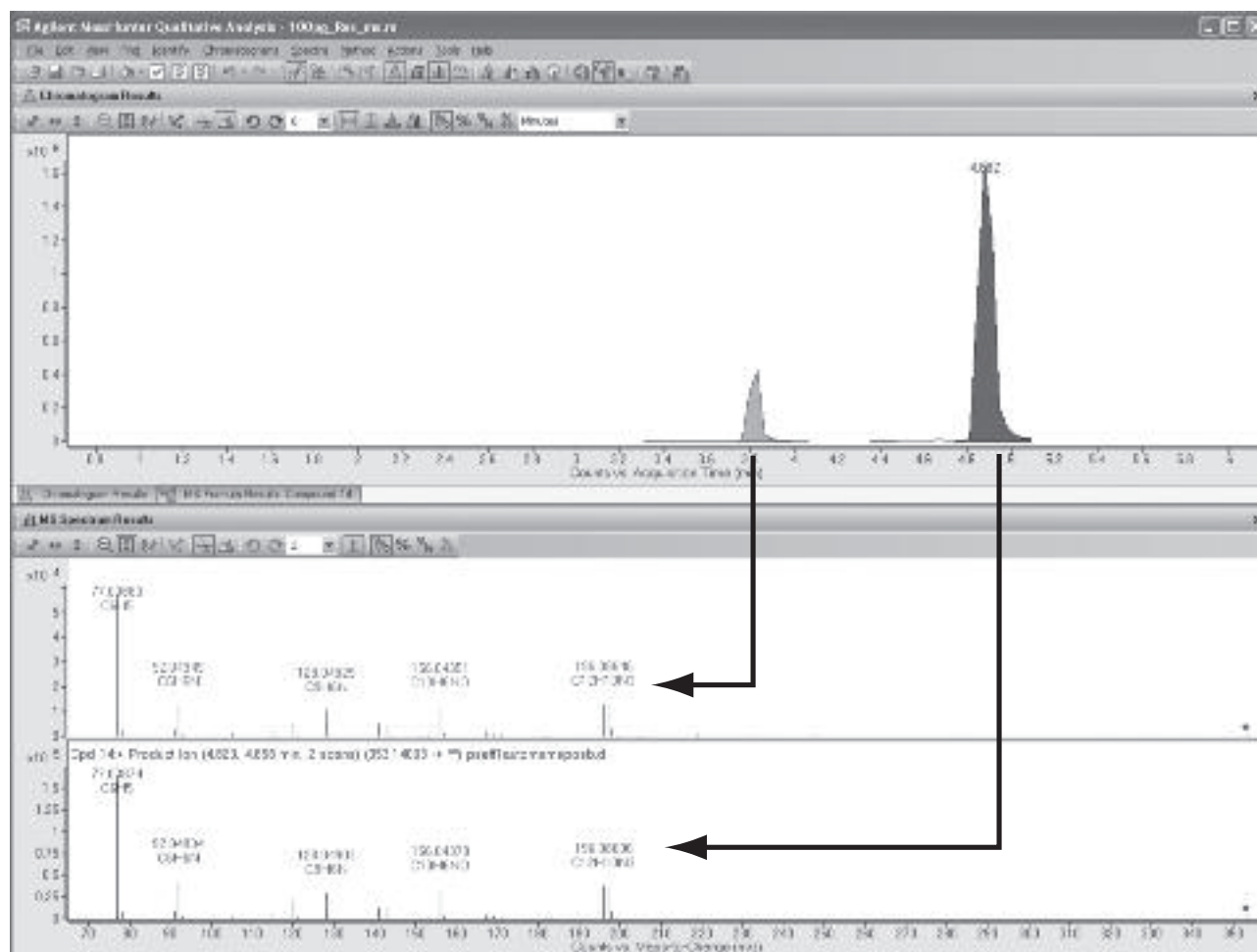


図7. データ依存MS/MS分析では、2つのピーク（スーダンIIIの異性体）のフラグメンテーションが同一であることが示されています。

結論

- 組成式検索またはMFEおよび精密質量データベース検索のいずれかの方法で、化合物を検出しました。この方法では、多数の化合物を1回の分析でスクリーニングすることが可能です。
- 5種類の染料化合物について、良好な質量精度 (3 ppm未満) が得られました。このことは、結果の信頼性が高いことを示しています。
- Q-TOFのMS/MSにより、イオン検出およびイオン構造を確認するための強力な性能が得られます。こうした機能は、QAや未知化合物の確認に役立ちます。
- MassHunterソフトウェアのホットリンクを使えば、複数のオンラインデータベースで素早く組成式を検索し、簡単に化合物を同定することができます。

参考文献

1. Jim Lau, Chin-Kai Meng, Jennifer Gushue, Robert J. Letcher, and Shaogang Chu, “LC/Q-TOFを用いた環境関連化合物の分析、第2部：フルオロテロマー不飽和酸”, 資料番号 5989-9132JA JP, August 2008.
2. Jim Lau, Chin-Kai Meng, Jennifer Gushue, Mark Hewitt, and Suzanne Batchelor, “LC/Q-TOFを用いた環境関連化合物の分析、第3部：イミダクロプリドとマヌール”, 資料番号 5989-9129JA JP, August 2008.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

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。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
August 12, 2008
5989-9336JAJP



Agilent Technologies