

環境サンプルの精密質量データ解析における塩素フィルターの使用

アプリケーションノート

環境

著者

Imma Ferrer, E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
University of Colorado
Boulder, Colorado
USA

概要

塩素含有化合物を検出するために、塩素マスフィルターを用いて、LC/TOF-MS および LC/QTOF-MS データファイルをスクリーニングしました。塩素フィルターでは、塩素含有化合物の組成式を推定する Mass Hunter ソフトウェアを用います。このアプリケーションノートでは環境水サンプル (廃水排出後のサウスプラット川) 中の医薬品分析における例を示しています。塩素フィルターは、環境化学分野の複雑なサンプルを分析するための優れたデータ解析ツールとなります。

はじめに

LC/TOF-MS や LC/QTOF-MS で作成したデータファイルには、文字どおり何千ものイオンが含まれているため、手動によるデータ解析は困難です。そのため、迅速かつ効率的なデータ解析を行えるソフトウェアを使用することが重要です。このアプリケーションノートでは、そうしたデータ解析ツールの1つである塩素マスフィルターを紹介します。塩素は、環境分析において重要となる多くの農薬や医薬品に含まれています。塩素には Cl^{35} と Cl^{37} という2つの同位体があるため、分子中に存在する1つの塩素原子により、固有の $A+2$ 同位体ピークパターンが生成されます。また、塩素-37 により生じる Mass Defect のおかげで、分子中の塩素は比較的容易に同定できます [1]。分子中に複数の塩素原子があると、 $A+2$ および $A+4$ 同位体ピークパターンが生成されます。このピークパターンは特徴的なもので、あらゆる質量分析の参考書で塩素化合物の同定のための手掛かりとして取り上げられています [2]。

このアプリケーションノートでは、MassHunter ソフトウェアを自動化し、廃水で汚染された地表水から採取した水サンプルのデータファイルから、塩素を含むと考えられる化合物の化学式を作成しました。自動レポートには、化合物同定用の法医学または農薬データベースを用いたデータベース検索も含まれます。



Agilent Technologies

ユーザーがおこなうべき手順は、品質管理および品質確認のために、データレポートをチェックすることだけです。塩素マスフィルターは、農薬分析用の食品サンプルや、環境水中の医薬品サンプルなどから得られたあらゆる .d データファイルに対応します。

実験条件

アジレントの精密質量分析装置 (Agilent 6200 または 6500 シリーズ) のいずれを用いても、この解析手順のためのデータファイルを生成できます。ここでは、6220 TOF を用いて、地表水中医薬品のデータファイルを生成しました。地表水はサウスプラット川から採取したもので、デンバーの廃水とその都市部の環境に影響を受けています。得られたデータファイル (.d ファイル) は、MassHunter 定性解析ソフトウェアで解析しました。この定性解析ソフトウェアは、すべての精密質量分析装置 (Agilent 6200 または 6500 シリーズ) のデータに対応しています。

結果と考察

塩素マスフィルターの適用

全 8 ステップの手順により、塩素フィルターを適用します。まず、定性解析ソフトウェアを立ち上げ、目的の .d ファイルを開きます。

ステップ 1. 定性解析ソフトウェアで目的の .d ファイルを開きます。[Find Compounds (化合物の検出)] メニュー (図 1 参照) に移動し、[Find by Molecular Feature (Molecular Feature による検出)] タブを開きます。図 1 の青い矢印は、このプログラムを実行させるボタンを示しています。図で開いているタブは、[compound filters (化合物フィルター)] と呼ばれるタブで、[relative height (相対高さ)] が 1.5 %、[absolute height (絶対高さ)] が 10,000 カウントに設定されています。さらに低い濃度の化合物を検出するためには、[relative height (相対高さ)] のチェックも外したままにする必要があります。ただし、この設定については、各機器およびデータセットのノイズレベルに応じて調節する必要があります。この 3 つの設定により、複雑なサンプルのフィルタリングを可能にし、塩素を含む小さなピークを検出するソフトウェアの機能を最大限に活用できます。

また、イオン種の設定が必要です。陽イオンについては、[ion species (イオン種)] を H+ および Na+ に設定する必要があります。陰イオンでは、設定は H- になります。[Extraction (抽出)] は低分子 (クロマトグラフの) に対応し、1000 カウント以上の高さをもつピークが使用されます。ここでも、各機器のバックグラウンドやサンプルセットのノイズに応じて、設定を調節する必要があります。[Charge State (電荷状態)] では、ピークスペースを 0.0025 plus 7 ppm に設定します。

[isotope model (同位体モデル)] は、[common organic molecules (一般的な有機分子)] とします。[limit assigned charge state to a maximum of (割り当てる電荷状態の最大値)] を 1 に設定します。[Mass Filter (マスフィルター)] はブランク、[Mass Defect] はブランクとします。[Results (結果)] は、EIC を抽出し、すべての化合物をハイライト表示し、過去の結果を削除するように設定します。これらの設定により、この段階で Molecular Feature 検出プログラムが正常に作動します。

ステップ 2. 図 1 で示した矢印をクリックし、Find by Molecular Feature (Molecular Feature による検出) プログラムを実行します。このプログラムにより、.d ファイル内のイオンがすべて検出され、同位体クラスターやナトリウム付加物などの関連するイオンがグループ化されます。フラグメントイオンはグループ化されず、異なる化合物とみなされます。

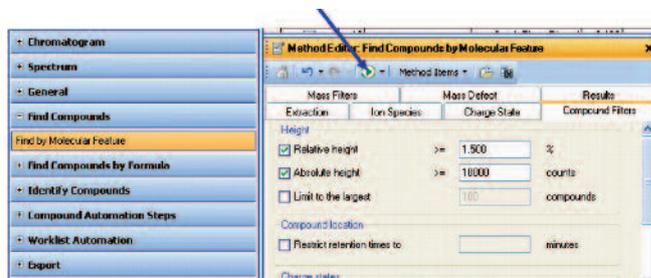


図 1. Find by Molecular Feature (Molecular Feature で検出)

ステップ 3. [Identify Compounds (化合物の同定)] タブ (図 2) を開き、[Generate Formulas (組成式推定)] タブをクリックします。すると、図 2 に示すウィンドウが開きます。このウィンドウでは、最大 2 つ、少なくとも 1 つの塩素原子が表中で特定されています (図 2 の矢印参照)。この例では、塩素原子数が 1~2 個のみの化合物をフィルタリングしていますが、必要に応じて多くの塩素を選択することができます。[Limits (限界値)] タブと [Charge State (電荷状態)] タブについては、良好な結果が得られる設定例として、図 3 に示しています。これらの値を参考にしてください。

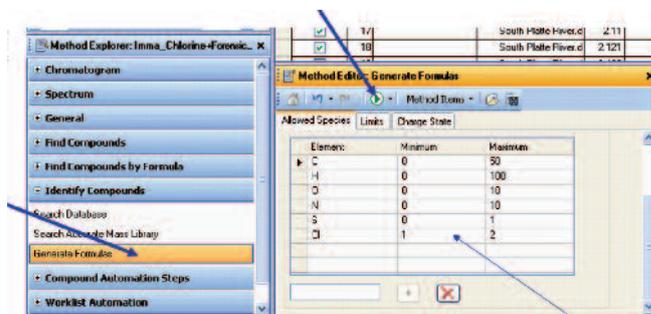


図 2. Identify Compounds (化合物の同定) と Generate Formulas (組成式推定)

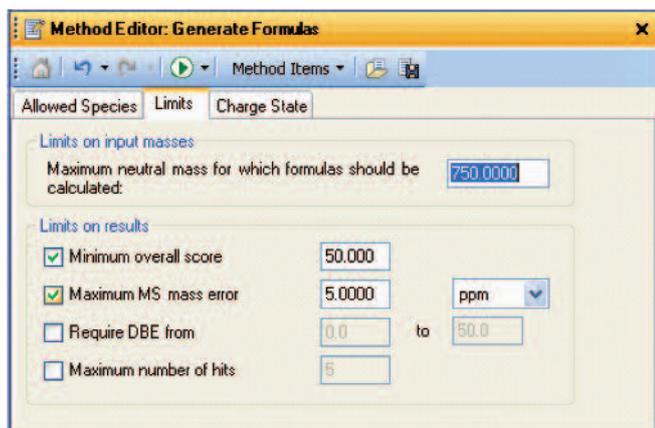
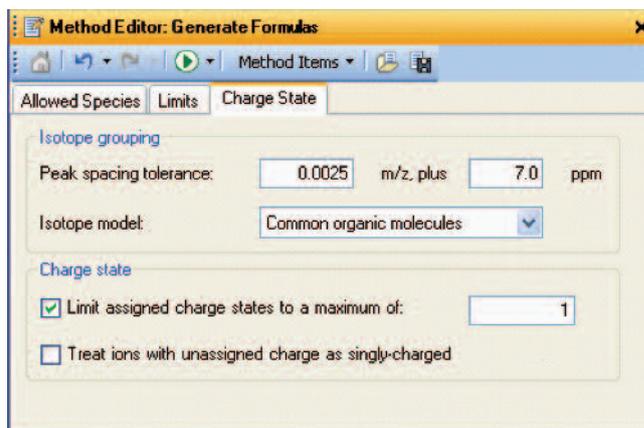


図 3. その他のタブ設定



ステップ 4. この設定の塩素原子により、Generate Formulas (組成式推定) プログラムを実行します。これにより、ステップ 2 で抽出されたすべての Feature について組成式が推定されます。その結果、1~2 個の塩素を含む分子式のみが表示されます。

ステップ 5. [Search Database (データベース検索)] 画面を開き、[Search Criteria (検索基準)] タブを開きます。図 4 に示すように、[Molecular Formula (分子式)] を選択します。これにより、検出された分子式と一致する (および 1~2 個の塩素を含む) 化合物のみがレポートされます。次に、[Database (データベース)] を選択します。ここで、**法医学データベース**または**農薬データベース**のいずれかを指定します (図 5)。タブ設定は次のとおりです。Positive イオンを +H に設定、Negative イオンを -H に設定、[Search Results (検索結果)] はブランク、[Peak Limits (ピークリミット)] は 5 に設定、[Search Criteria (検索基準)] を [Mass (質量)] および 5 ppm に設定。これらの設定により、化合物同定が実行されます。法医学データベースには、医薬品や農薬などの 7,500 種類を超える化合物が収載されています。塩素化合物は、MFG Formula (MFG 組成式) とラベルされた列にグループ化されます。MFG は、molecular formula generator (分子式生成) の略です。

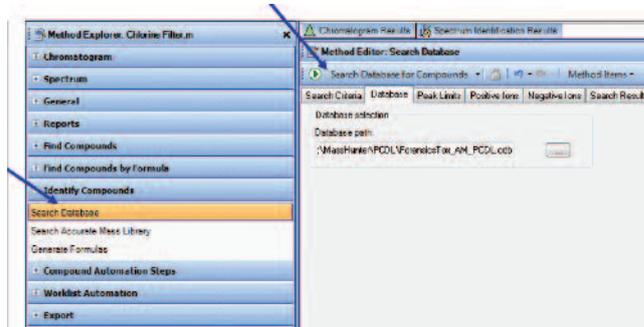


図 5. 7500 種類の化合物を収載する法医学データベースを用いた Search Database (データベース検索) プログラム

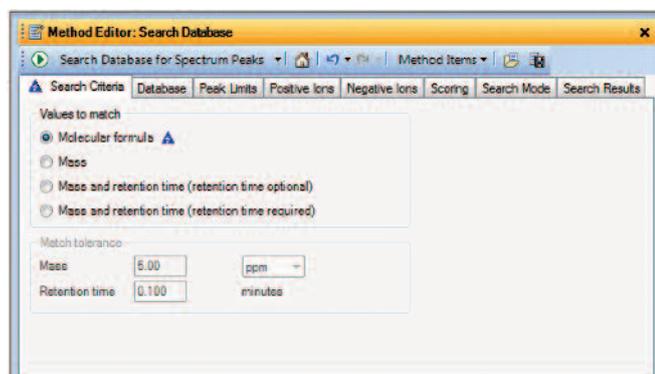


図 4. Molecular Formula (分子式) により検索基準を選択

ステップ 6. Search Database (データベース検索) プログラムを実行します。このプログラムにより、ステップ 4 で生成したすべての分子式が検索され、データベース中に存在する場合は、化合物名が割り当てられます。分子式がデータベースにない場合は、最終レポートの Name (化合物名) が空白になります。今回の例では、すべての塩素化合物について、もっとも一致性の高い組成式が Molecular Formula Generator (MFG) とラベルされた列に表示されます。

ステップ 7. レポートを印刷します。レポートには、以下の列があります。Compound label (化合物ラベル)、Retention Time (リテンションタイム)、Mass of Neutral compound (中性化合物の質量)、Name (化合物名、データベースにある場合)、Molecular Formula Generator (MFG) elemental formula (MFG 組成式)、MFG difference in mass accuracy (質量精度の MFG 差)、Database Formula (DB) (データベース分子式)、DB difference in mass accuracy (質量精度の DB 差)。サウスプラット川サンプルのレポートを図 6 に示しています。

Qualitative Compound Report								
Data File	South Platte River.d	Sample Name						
Sample Type	Sample	Position	P1-C6					
Instrument Name	Instrument 1	User Name						
Acq Method	Multiresidue_Pesticides.m	Acquired Time	8/10/2009 7:09:22 PM					
IRM Calibration Status	Success	DA Method	Chlorine Filter Automated.m					
Comment								
Compound Table								
Compound Label	RT	Mass	Name	Formula	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 464: Lamotrigine	13.641	255.0077	Lamotrigine	C9 H7 Cl2 N5	C9 H7 Cl2 N5	0.54	C9 H7 Cl2 N5	0.54
Cpd 499: Ketamine	13.858	237.0923	Ketamine	C13 H16 Cl N O	C13 H16 Cl N O	-0.89	C13 H16 Cl N O	-0.89
Cpd 637: C9 H10 Cl N	15.265	167.0502		C9 H10 Cl N	C9 H10 Cl N	-0.39	C9 H10 Cl N	
Cpd 640: C13 H20 Cl N O	15.266	241.1233		C13 H20 Cl N O	C13 H20 Cl N O	0.33	C13 H20 Cl N O	
Cpd 735: C19 H27 Cl N6 O2 S	16.37	438.1611		C19 H27 Cl N6 O2 S	C19 H27 Cl N6 O2 S	-1.36	C19 H27 Cl N6 O2 S	
Cpd 775: C14 H34 Cl2 N10 O2	16.768	444.2245		C14 H34 Cl2 N10 O2	C14 H34 Cl2 N10 O2	-0.5	C14 H34 Cl2 N10 O2	
Cpd 889: C18 H29 Cl N2 O3 S	18.264	388.1583		C18 H29 Cl N2 O3 S	C18 H29 Cl N2 O3 S	1.18	C18 H29 Cl N2 O3 S	
Cpd 1015: Losartan	19.635	422.1629	Losartan	C22 H23 Cl N6 O	C22 H23 Cl N6 O	-1.7	C22 H23 Cl N6 O	-1.7
Cpd 1137: C18 H29 Cl N2 O6 S	21.105	436.1439		C18 H29 Cl N2 O6 S	C18 H29 Cl N2 O6 S	-0.9	C18 H29 Cl N2 O6 S	
Cpd 1159: C28 H41 Cl N4 O2	21.311	500.2929		C28 H41 Cl N4 O2	C28 H41 Cl N4 O2	-2.1	C28 H41 Cl N4 O2	
Cpd 1194: C18 H33 Cl N2 O4	21.64	376.2118		C18 H33 Cl N2 O4	C18 H33 Cl N2 O4	2.91	C18 H33 Cl N2 O4	

図 6. 河川水中の抗うつ剤の法医学データベースによる初回の検索結果レポート [3]

ステップ 8. QA/QC マニュアルレポート。最後に、割り当てられた塩素化合物をオペレーターは手動で確認する必要があります。該当のリテンションタイムでイオンを手動で抽出し、そのイオンの同位体ピークパターンを確認します。図 7 では、近隣の廃水で汚染されたサウスプラット川から検出されたラモトリジンについて、この手順の例を示しています。ラモトリジンは抗うつ剤で、リテンションタイム 13.4 分でサンプルから検出されました [3]。イオンの測定精密質量は m/z 256.0150 で、 m/z 258.0121 および m/z 260.0092 において、A+2 および A+4 同位体の特徴が示されています。この化合物では、A+2 および A+4 同位体の両方について、Mass Defect を注意する必要があります。両ピークの Mass Defect は、-0.0029 および -0.0029 です。この値は、-0.0030 という理論値にきわめて近く、分子中に 2 つの塩素原子が存在することを明確に示しています [1]。このステップは、塩素フィルターの重要なステップであり、オペレーターが手動でおこなう必要があります。組成式推定は質量のみを考慮するため、同位体ピークパターンに一致しない組成式が生成される可能性もあります。このサウスプラット川の例では、約 100 の塩素化合物ピークが検出されましたが、相対質量欠損と同位体ピークパターンをもとに塩素が含まれると同定されたピークは、そのうちの 20 ピークでした。

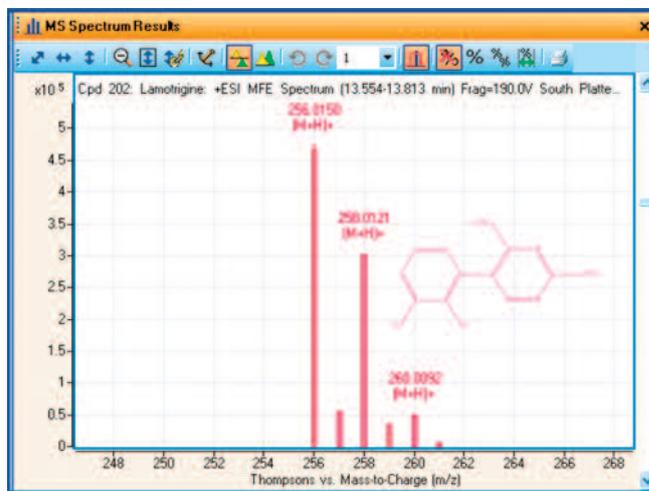


図 7. ラモトリジンの質量スペクトル

これらの 20 種類のイオンのうち、化合物は 15 種類で、残りの 5 つのイオンは、イオンと一致するリテンションタイムをもつフラグメントイオンでした。例として、図 8 にセチリジンの構造を示し付加しています。セチリジンは、法医学データベース検索により、18.3 分で m/z 389.1626 のプロトン付加体と一致し、フラグメントイオンは同じリテンションタイムで m/z 201.0466 と一致しました。精密質量、データベース検索、フラグメントイオンの同定という組み合わせを利用できる塩素マスフィルターは、廃水に汚染された水サンプル中に微量で存在する塩素化合物の検出および同定において、きわめて効果的なツールになるといえます。このアプリケーションは、農業に汚染された食品サンプルや同様の環境サンプルにも、この塩素フィルターを同じように活用できることを示しています。

結論

Agilent 6200 シリーズ TOF または Agilent 6500 シリーズ QTOF による精密質量 LC/MS と MassHunter 定性解析ソフトウェア Ver.5.0 を使えば、塩素フィルターにより、MS データを効果的にフィルタリングし、1~2 個の塩素を含むすべての化合物を検出することができます。また、パラメーターを変更すれば、任意の数のハロゲンにも対応できます。また、フッ素や鉄などの特定元素のフィルタリングにも対応できます。Worklist Automation によりプロセスを自動化し、前述したように手動 QC をおこなうことが可能です。

参考文献

1. E.M. Thurman, I. Ferrer, 2010, The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397: 2807-2816.
2. R.M. Smith, 2004, *Understanding Mass Spectra*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 290p.
3. I. Ferrer, E.M. Thurman, 2010, Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry: *Analytical Chemistry*, v. 82: 8161-8168.

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。

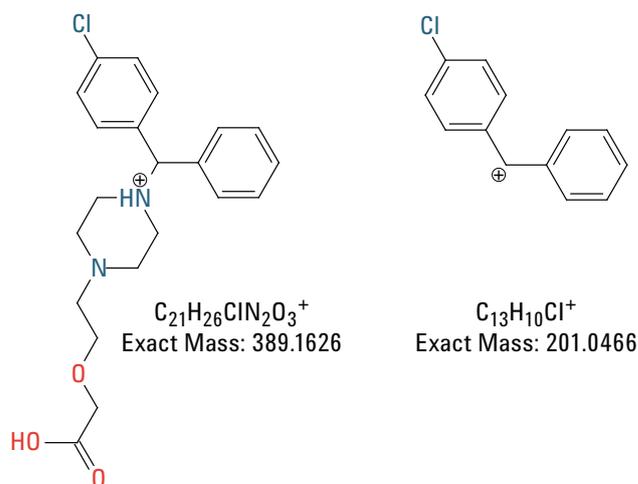


図 8. 同じリテンションタイム (18.3 分) で検出された 2 つのイオンを示すセチリジンの例

www.agilent.com/chem/jp

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., 2011

Printed in Japan

December 5, 2011

5990-9431JAJP



Agilent Technologies