

# Agilent 8890 GC と Agilent J&W DB-EUPAH カラムによる 多環芳香族炭化水素の分析

## 著者

Abbey Fausett  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 8890A GC と Agilent J&W DB-EUPAH カラムを用いた多環芳香族炭化水素 (PAH) の分析について説明します。このメソッドにより、EUPAH 標準混合液中の重要な化合物ペアを良好な再現性で分離できることが実証されました。

## はじめに

多環芳香族炭化水素 (PAH) 化合物の分析は、農業または環境由来のサンプルを対象に多くのラボで広く行われています。このクラスに属する化合物の多くは人体に有害です。欧州連合 (EU) では、規制分析対象となる 16 種類の優先 PAH を EUPAH リストとして定めています。この化合物リストには構造異性体を持つ化合物が複数含まれていることから、GC 分析でそのすべてをカバーするのは困難です。異性体の分離に関連する課題だけでなく、これらの PAH 化合物は GC 流路の表面に吸着する傾向があることがわかっており、この挙動はターゲット化合物の分子量に伴って顕著になることが広く知られています。また、揮発性の比較的低い化合物は注入口でディスクリミネーションが起こりやすく、これがメソッドの統計的再現性の低下につながります。

これらの問題を解決するために、次のような改善が行われてきました。

- 注入口でのディスクリミネーションによる影響の最小化
- 化合物が吸着する表面積の低減
- 対症的メンテナンスから予防的メンテナンスへの移行

ウルトライナートライナは、カラムへの活性化化合物の移送効率を高めるように設計されています。また、カラム技術が進化し、今回の調査で使用した J&W DB-EUPAH カラムなど、成分ごとのカラム相が開発されています<sup>1</sup>。この他、8890A GC には、オンボード診断、設定値の入力と制御、ヘルプファイルと学習用ファイルなどの機能が搭載されています。これらの GC 機能は、タッチスクリーンインタフェースからアクセスできる他、Web ユーザーインタフェースによるローカルまたはリモートでの利用も可能です。

## 実験方法

ここに示すデータの生成には、マルチモード注入口 (MMI)、Agilent 5977 シリーズ GC/MSD、および Agilent 7693A オートサンブラ (ALS) で構成される 8890A GC を使用しました。濃度範囲 0.1 ~ 10 ppm の 8 ポイント検量線を作成するために、1 バイアルの EUPAH 標準溶液をイソオクタン (Sigma-Aldrich 社、Chromosolv グレード、> 99.5 %) で希釈しました。また、5977 MSD エクストラクタイオン源を改造して 9 mm エクストラクタレンスを組み込み、マスフィルタを選択イオンモニタリング (SIM) モードで使用しました。表 1 に、今回の調査で使用した消耗品を示します。

表 1. EUPAH のデータ生成に使用した消耗品

品名	部品番号
EUPAH 認証標準 (250 µg/mL)	5190-0487
オートサンブラシリンジ (10 µL)	G4513-80203
高性能グリーン注入口セプタム (緑)	5183-4761
ウルトライナートスプリットレス注入口ライナ、ウール入り	5190-2293
DB-EUPAH カラム (30 m × 250 µm × 0.25 µm)	122-9632
エクストラクタイオン源用大口径レンズ (9 mm)	G3870-20449

表 2. 8890A GC での EUPAH の分析に使用したメソッド条件

8890 GC パラメータ	
シリンジサイズ	10 µL
キャリアガス	ヘリウム
注入量	1 µL
カラム	DB-EUPAH, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm (p/n 122-9632)
注入口タイプ	MMI
オープン平衡化時間	1 分
注入口モード	パルスドスプリットレス
オープンプログラム	80 °C で 2 分間 40 °C/min で 225 °C まで上昇、6 分間保持 2.5 °C/min で 330 °C まで上昇、4.5 分間保持
注入口温度	330 °C
パルス圧力	40 psi
パルス時間	0.5 分
パージフロー	50 mL/min
パージ時間	0.9 分
GC サイクルタイム	58.25 分
セプタムパージ	3 mL/min
MSD トランスファーライン温度	320 °C

実験テストから、多くの PAH 化合物について、より高いイオン源温度で<sup>2</sup>、大口径のエクストラクタレンズを使用することで<sup>3</sup>、最小限の感度低下で直線性と性能が大幅に高まることがわかっています。メソッドのイオン源と四重極の温度を調整するときは、MSD の熱平衡化に十分な時間を設け、新しい温度設定点でチューニングします。こうすることで、温度変化によって生じる遅延と非一貫性を防ぐことができます。表 2 および表 3 に、拡張メソッドの設定点を示します。

表 3. 5977 GC/MSD (エクストラクタ) での EUPAH の分析条件

MSD 条件	5977 SQMSD
原因	エクストラクタ: 9 mm レンズ
高真空ポンプ	ターボ
モード	SIM
チューニング	Etune
イオン源温度	325
四重極温度	200

注入口でのディスクリミネーションを最小限に抑えるために、注入口でガラスウール入りのウルトライナートスプリットレスライナを使用し、注入後に圧力パルスで短時間印加しました。パルス圧力法は、注入した化合物のカラムへの移送効果を高めるため、また GC 注入口ライナで気化した溶媒の膨張を抑えるために、微量分析において広く使用されています。注入口でのパルス圧力法を検討する際に役立つヒントをいくつか紹介します。

- パルス圧力オプションを評価するときは、最初に、無パルスの注入口圧力を 2 倍にします。例えば、カラム内流量を 1.2 mL/min にするためにシステムで 20 psi の圧力が必要な場合、適切な開

始パルス圧力は 40 psi になります。その後、最適な結果が得られるまでパルス圧力を 5 psi 刻みで増減して調整し、結果を評価します。

- カラム流量の計算値をもとに、流量の影響を受けやすい MSD などの検出器にパルス時間中に入るキャリアガスの量を求めます。システムの仕様を確認し、組み込まれている検出器の最大許容流量を特定します。
- パルス時間は実験によって求める必要があります。0.1 分から開始し、時間を長くしても変化が生じなくなるまで、またはクロマトグラフィーに悪影響がおよぶまで、少しずつ増やします。
- パルス圧力が望ましいがクロマトグラフィーが改善しない場合は、流路にリテンションギャップを追加することを検討します。
- 特にカラム流量の低いアプリケーションでは、パルス圧力が元の設定点に減衰するための時間が必要です。この時間は、パルス時間の終了直後にパージフローをオンにすることで最小化できます。
- パージフロー時間は、ライナの体積をカラム流量で割ることにより見積もります。

- キャリアガスを節約するために、高流量のパージフローが必要なアプリケーションでは、分析開始数分後にガスセーバーを有効にします。
- ガスセーバー流量は、無パルス条件下での総流量より低くする必要があります。流量が 10 mL/min 未満のアプリケーションでは、ガスセーバー機能を有効にしないことをおすすめします。

## 結果と考察

図 1 に、クロマトグラムの例を示します。また、図 2 のクロマトグラムでは、重要な化合物ペアのピークを拡大し、それぞれの分離度の計算値を示しています。

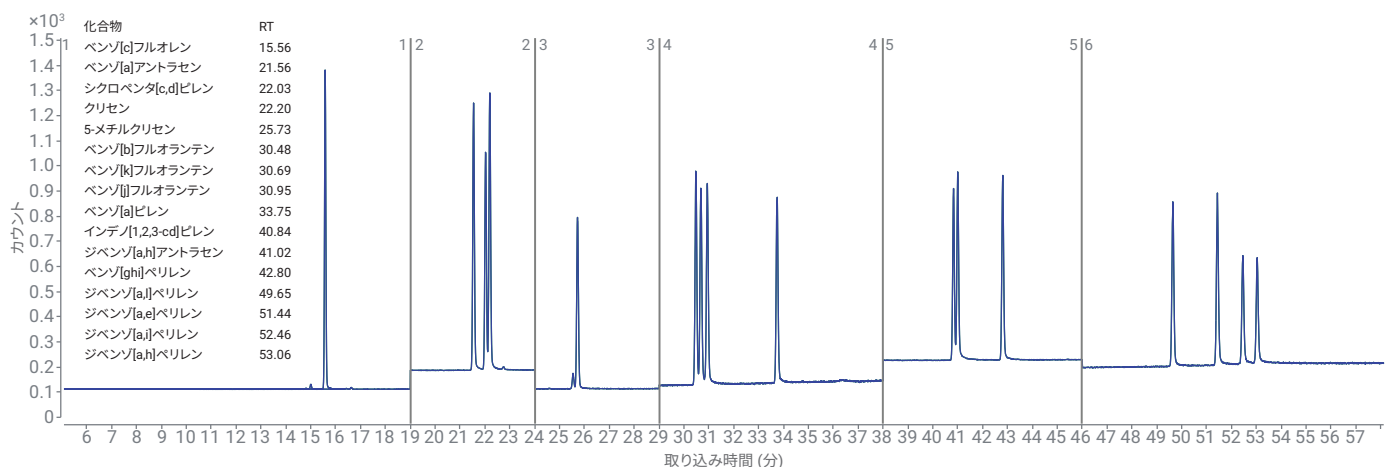


図 1. EUPAH 標準溶液 (1 ppm) の最終的なタイムセグメント SIM クロマトグラム

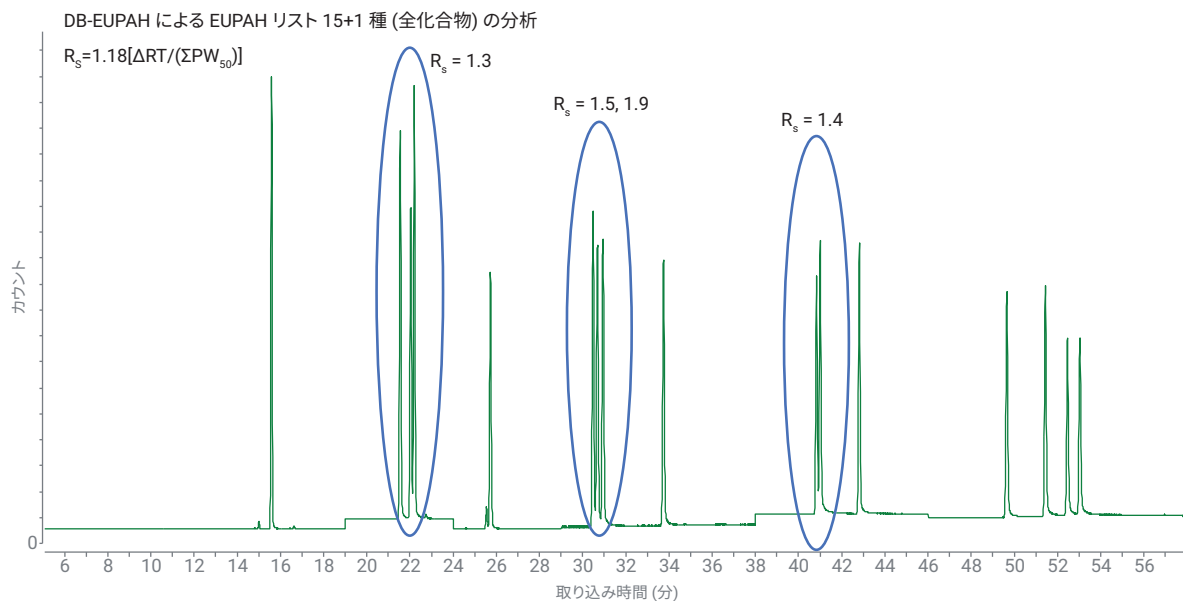


図 2. 1 ppm 注入時の重要な化合物ペアの分離度

8 ポイント検量線用の標準溶液を分析しました。その際、キャリーオーバーを評価するためにブランクでの挟み込みを行いました。この濃度範囲では、キャリーオーバーは観察されませんでした。検量線の精度を確認するために、ポストキャリブレーションブランクの直後に 2 種類の検量線確認用標準溶液を分析しました。検量線の作成には、直線回帰と逆重み付けを使用しました。その決定係数を表 4 にまとめます。検量線から計算で求めた量と、各標準溶液に含まれる実際の対象量を比較したところ、混合液中の各化合物の精度は、どの標準溶液濃度についても  $\pm 5\%$  以内でした。

検量線の精査後に、QC 標準溶液を 10 回繰り返し注入して分析し、リテンションタイムとレスポンスの安定性を評価しました。図 3 に、その結果と傾向を示します。

表 4. 逆重み付けを適用した検量線の直線相関係数

化合物	R <sup>2</sup>	化合物	R <sup>2</sup>
ベンゾ[c]フルオレン	0.9999	ベンゾ[a]ピレン	0.9997
ベンゾ[a]アントラセン	0.9998	インデノ[1,2,3-cd]ピレン	0.9990
シクロペンタ[c,d]ピレン	0.9999	ジベンゾ[a,h]アントラセン	0.9997
クリセン	0.9998	ベンゾ[ghi]ペリレン	0.9999
5-メチルクリセン	0.9999	ジベンゾ[a,i]ピレン	0.9994
ベンゾ[b]フルオランテン	0.9997	ジベンゾ[a,e]ピレン	0.9997
ベンゾ[k]フルオランテン	0.9997	ジベンゾ[a,j]ピレン	0.9992
ベンゾ[l]フルオランテン	0.9999	ジベンゾ[a,h]ピレン	0.9994

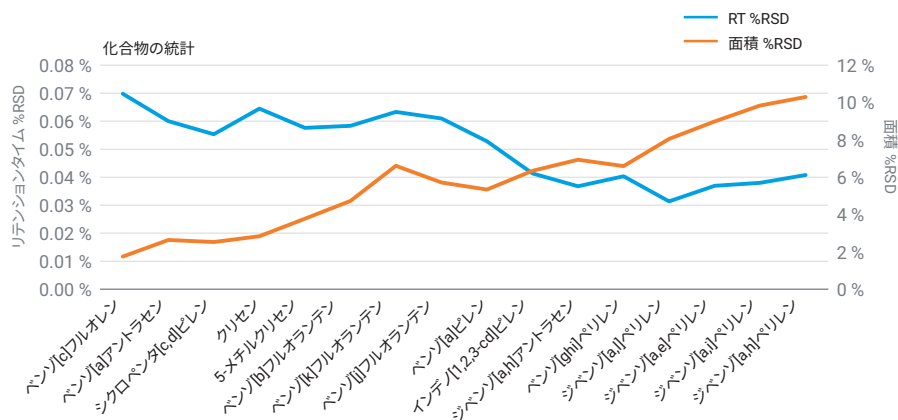


図 3. EUPAH ターゲット化合物 16 種の統計的精度と傾向 (溶出順)

このデータセットには、分子量が大きいほど面積精度が低下するという、PAH 化合物の典型的な挙動がよく現れています。これは、沸点の高い化合物ほど長時間の分析中にサンプルが拡散する傾向にあり、カラムから検出器へと溶出するバンドが結果的に広がるからです。この広がり、化合物のカラム滞留時間が短くなるようにカラム流量プログラムや温度プログラムを調整することにより抑制できます。この例では流量プログラムを適用できましたが、システムの仕様と性能との最適なバランスを見つける際には、検出器の流量限度に留意する必要があります。

再現性の調査中にリテンションタイムが大幅にずれることはありませんでした。これは、8890A GC メインフレームの第 6 世代電子圧力制御 (EPC) と一貫した温度制御による圧力制御性能の高さを示しています。これらの結果は規制項目に間違いなく沿ったものであり、改善により、サイクル時間の短縮、対称性の向上、さらに厳密な再現性が期待できます。

GC のサイクル時間は、オープン温度プロファイルを最適化するか、または Agilent Method Translator などのツールにより、内径の小さなカラム<sup>4</sup>に合わせてこれらのパラメータを換算することで、短縮することも可能です。Agilent Method Translator は、アジレントのデータシステムユーザー向けの GC ドライバに組み込まれています。ユーザーズマニュアル付きのスタンドアロンツールとしても提供されています。このツールの使用方

法は、Agilent YouTube チャンネルで公開されている解説ビデオで視聴いただけます。サイクル時間を改善するためのベストプラクティスとしては、一連の長時間分析から開始し、ターゲット化合物間の分離度を把握してから、取り込みプロセスの高速化に取り組むことをおすすめします。サンプル中の化合物の種類が増えることによるクロマトグラフィーへの影響を見極めるために、マトリックスを使用した長時間分析の評価も必要です。

このメソッドでは、リテンションタイム (RT) ロック機能は使用しませんでした。より複雑なサンプルには、この機能が有効です。RT ロックは、結果の一貫性を高めることから、環境プロトコルで一般的に使用されています<sup>5</sup>。また、ほとんどのワークフローに組み込むことができ、特に RT シフトによる偽陰性/偽陽性が問題になるスクリーニングメソッドにおいて大きな役割を果たします。RT ロックは、SIM モードの四重極など、タイムセグメントを設定して検出する場合にも適しています。

多くのラボでは、標準溶液、QC コントロール、およびマトリックスサンプルに内部標準を添加し、相対レスポンス係数を用いた定量が行われています。生の内部標準データのモニタリングは、メンテナンススケジュールを立て、キャリブレーション頻度を決定し、分析の一貫性を高めるための手段として大いに役立ちます。8890A GC には、機器の性能に影響がおよぶ前にメンテナンススケジュールを知らせる定義済み/カスタムカウンタが搭載されています。

これらのカウンタは、アジレントのデータシステムから、またはタッチスクリーンから直接、あるいは Web ユーザーインターフェースから有効にしたり設定したりできます。

食品または環境マトリックス分析における代表的なストレス要因として、イオン源のメンテナンス頻度があげられます。この頻度を減らすため、イオン源のセルフクリーニングを行う JetClean 機能を追加することをおすすめします<sup>6</sup>。

## 結論

前述の分析条件により、EUPAH 標準溶液中の重要な化合物ペアが十分に分離され、テストした定量範囲にわたって良好な直線性が得られました。再現性の調査では、RT が大幅にずれることもなく、8890 GC により優れた圧力および温度制御が期待どおりに実現されることが確認されました。多様なサンプルの複雑さ、規制当局による監視、およびユーザーのスキルに対応できる柔軟性を提供しながら、お客様の堅牢な分析メソッドの開発を支援するために、アジレントは製品群をさらに進化させるべく継続的に取り組んできました。その成果の 1 つが 8890A GC です。オンボード診断、組み込まれたヘルプファイルと学習用ファイル、メンテナンスカウンタ、および相互に補完しあう多数のコンポーネントを搭載した 8890 GC には、従来システムから継承した機能と、ラボの生産性を高めるために考え抜かれた新たな改善が融合されています。

## 参考文献

1. Smith, D.; Lynam, K. GC/MS Analysis of European Union (EU) Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using an Agilent J&W DB-EUPAH GC Column with a Column Performance Comparison, *Agilent Technologies*, publication number 5990-4883EN, **2010**.
2. Prest, H.; Thomson, C. The 5973N Inert MSD: Using Higher Ion Source Temperatures, *Agilent Technologies*, publication number 5989-0678EN, **2004**.
3. PAH Analysis in Palm Oil, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7520EN, **2016**.
4. Lynam, K. PAH Analyses with High Efficiency GC Columns: Column Selection and Best Practices, *Agilent Technologies*, publication number 5990-5872EN, **2010**.
5. Giarrocco, V.; Quimby, B.; Klee, M. Retention Time Locking: Concepts and Applications, *Agilent Technologies*, publication number 5966-2469E, **2000**.
6. Prest, H., Agilent JetClean: *In-situ* GC/MS Ion Source Cleaning and Conditioning, *Agilent Technologies*, publication number 5991-7254EN, **2016**.

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto: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 13, 2018

5994-0445JAJP