

高分解能 Agilent 7250 GC/Q-TOF を 用いた廃水流出物サンプル中の 毒性化学物質の同定

著者

Sofia Nieto and Kai Chen
Agilent Technologies, Inc.

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

概要

この研究では、広範囲のサスペクト化合物スクリーニングのワークフローを用いて、廃水流出物中の有毒化学物質を同定しました。ターゲットメソッドとノンターゲットメソッドを組み合わせた包括的手法において、複数のイオン化モードによる分析を高分解能精密質量 Agilent 7250 GC/Q-TOF、Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 による GC/Q-TOF スクリーニングワークフロー、農業および環境汚染物質の GC/Q-TOF 精密質量ライブラリを用いました。

はじめに

廃水流出物中の有毒化学物質の同定は、下流の生態系の環境水質の改善に向けた重要なステップです。従来のターゲット分析の手法は範囲に制限があるために、毒性源を特定するには不十分であることも少なくありません。包括的なスクリーニングにより、多くの場合ノンターゲット分析を用いてこの問題に対処し、可能性のある毒性の原因について理解を深められます。環境サンプル中の化学物質を包括的に評価するには、LC と GC の両方の分離技術を高分解能質量分析（HRMS）と組み合わせる必要があります。LC/MS にのみ依存すると、これらのサンプル中の多くの非極性および揮発性の化合物が見逃されてしまう可能性があります。精密質量およびソフトイオン化と GC/HRMS の組み合わせは、未知化合物の同定や NIST ライブラリからの暫定的な同定の評価に大きな利点があります。

この研究では、農業および環境汚染物質の検出のために広範囲のサスペクト化合物スクリーニングとノンターゲット手法を組み合わせ、高分解能 GC/Q-TOF 分析を用いて廃水流出物中の毒性化学物質を同定しました。

実験方法

サンプル

廃水流出物サンプル（94940、94941、94943、94944）を、連続する 5 日間のうち 1 日目、2 日目、4 日目、5 日目に 2 回繰り返して採取しました。最初の 2 つのサンプルは、全排水毒性（WET）試験で示されているように、ニセネコゼミジンコに対する急性毒性を示しました。

GF/F フィルタ（0.45 μm）を用いてサンプルをフィルタリング後、親水性逆相固相抽出カートリッジを通しました。乾燥したカートリッジの溶出には、酢酸エチルとメタノールを用いました。乾燥したフィルタの抽出には、超音波洗浄器とヘキサン/アセトン 1:1 を使用し

ました。両方の抽出物を混合して、内部標準となるジブロモオクタフルオロビスフェノール（DBOFB）をスパイクしました。

サンプルの分析には、高分解能 7250 GC/Q-TOF と 15 × 15 m ミッドカラムによるバックフラッシュ構成（図 1）の Agilent 8890 GC を組み合わせたものを使用しました。20 分のリテンションタイムロッキング（RTL）メソッド（クロロピリフォスメチルに 9.143 分の RT でロック）を使用して、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一貫性を確保しました。メソッド内のバックフラッシュは、一貫性のある RT

の維持、キャリアオーバーの回避、カラム寿命の伸長、イオン源の汚染物質の低減に役立ちました。

電子イオン化（EI）およびネガティブ CI（NCI）モードで汚染物質についてサンプルをスクリーニングし、ピレスロイドおよび廃水流出物によく見られる他のハロゲン化合物について最高の分析感度を確保しました。その後、分子イオン付加を形成する化合物に適したポジティブ CI（PCI）を用いて同定しました。表 1 に分析条件を示します。

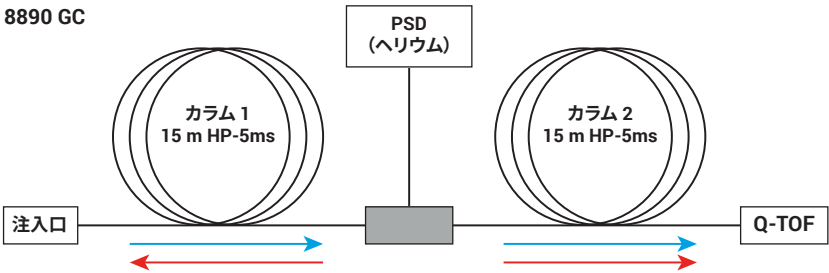


図 1. ミッドカラムによるバックフラッシュの構成。分析最後のバックフラッシュ中のヘリウム流路を赤色の矢印で示しています。パージ付きユニオンの圧力は上昇し、注入口の圧力は低下します。この結果、最初のカラムの流れが逆流し、高沸点化合物がスプリットベントから除去されました。ニューマティクス切り替えデバイス（PSD）は Agilent 8890 GC ニューマティクスコントロールモジュールです。これによりキャリアガスの消費量を大幅に低減するバックフラッシュ機能が提供されました。

表 1. GC/Q-TOFパラメータ

GC および MS 条件	EI	ネガティブ CI	ポジティブ CI
GC	Agilent 8890 GC		
カラム	2 × HP-5ms UI、15 m、0.25 mm、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	60 °C で 0.2 分、600 °C/min で 320 °C まで上昇		
オープン温度プログラム	60 °C で 1 分、40 °C/min で 170 °C まで上昇、10 °C/min で 310 °C まで上昇、3 分間保持		
キャリアガス	ヘリウム		
カラム 1 流量	～ 1.2 mL/min		
カラム 2 流量	～ 1.4 mL/min		
バックフラッシュ条件	5 分（ポストラン）、310 °C（オープン）、50 psi（AUX EPC 圧力）、2 psi（注入口圧力）		
トランスファーライン温度	280 °C		
質量範囲	m/z 50 ～ 650		
スペクトル採取レート	5 Hz		
四重極温度	150 °C		
イオン源温度	280 °C	150 °C	280 °C
イオン化エネルギー	70 eV	250 eV	100 eV
イオン化電流	5 μA	10 μA	15 μA

サスペクト化合物のスクリーニング ワークフロー

EI モードで採取した GC/Q-TOF データは、まず MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 の GC/Q-TOF スクリーニングワークフローを用いて処理しました。ターゲットのリストは、1,000 種類以上の化合物を含む十分に精選された精密質量の農業パーソナル化合物データベースおよびライブラリ (PCDL) に基づいています。データ処理速度および品質を向上させるために、解析の前に GC/Q-TOF データを SureMass フォーマットに変換しました。スクリーニングメソッドは、合計 7 つの最も特異的な精密質量イオンと各スペクトルからのイオン比によって、GC/Q-TOF 農業および環境汚染物質 PCDL から自動的に作成されました。スクリーニングメソッドのパラメータは SANTE¹ および FDA² ガイドラインに従って設定されており、RT ウィンドウ、質量精度、ライブラリ一致スコアなどを含みます。

ノンターゲット同定ワークフロー

ノンターゲット分析法においては、EI データを MassHunter Quantitative Analysis 10.1 の Unknowns Analysis で処理しました。フィーチャー抽出ステップの後に、NIST17 ライブラリの検索、Agilent Mass Profiler Professional (MPP) での差分解析によって、毒性がより高い廃水流出物サンプルと相互に関連のある化合物が同定されました。ノンターゲットスクリーニングからの未知化合物や、同定評価が必要な化合物の分子イオンをさらに同定するために、MassHunter Qualitative Analysis 10 の Fragment Formula Annotation ツールを EI およびポジティブ化学物質イオン化 (PCI) の GC/Q-TOF データと組み合わせて使用しました。

NCI GC/Q-TOF データと GC/Q-TOF スクリーニングワークフローを使用するために、NCI モードで採取されたスペクトルを基準にして、より焦点を絞った (ピレスロイド類などの約 120 種類の化合物) 精密質量 PCDL を作成しました。その後、NCI データも、同じ GC/Q-TOF スクリーニングツールを使用して処理しました。

結果と考察

EI モードによるサスペクト化合物のスクリーニング

ニセネコゼミジニコに対する急性毒性 (0 ~ 80 %) の程度が異なる廃水流出物サンプルを、高分解能 GC/Q-TOF を使用して分析しました。MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 のスクリーニングワークフロー (図 2) を用いて、GC/Q-TOF PCDL に含まれる多くの重要な農業および環境汚染物質を調べました。

このワークフローを使用し、EI GC/Q-TOF PCDL を用いて、各廃水流出物からの抽出物について質量精度 < 5 ppm およびライブラリ一致スコア > 75 で 90 種類以上の化合物を同定しました。図 3 に、EI スクリーニングウィンドウとレポートの例を示します。スクリーニングワークフローで自動的に評価された化合物には、緑色のラベルが付けられています。

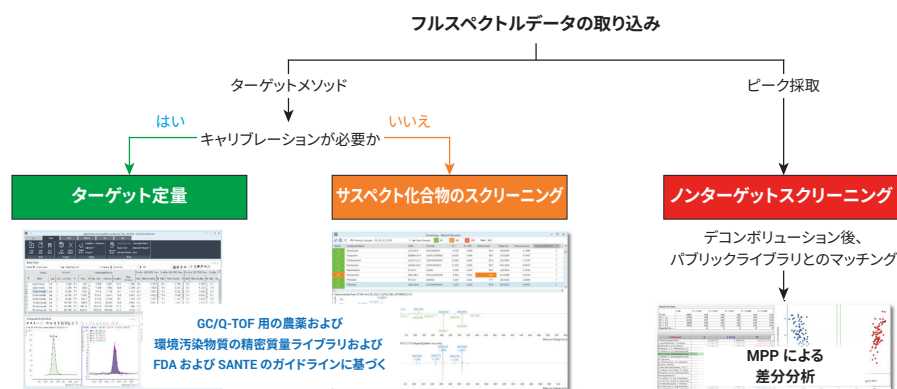


図 2. GC/Q-TOF PCDL を用いたターゲットおよびサスペクト化合物スクリーニング法、NIST ライブラリを用いたノンターゲットスクリーニングをベースとする複合型汚染物質スクリーニングワークフロー。これらすべてを Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1 ソフトウェアで実行しました。

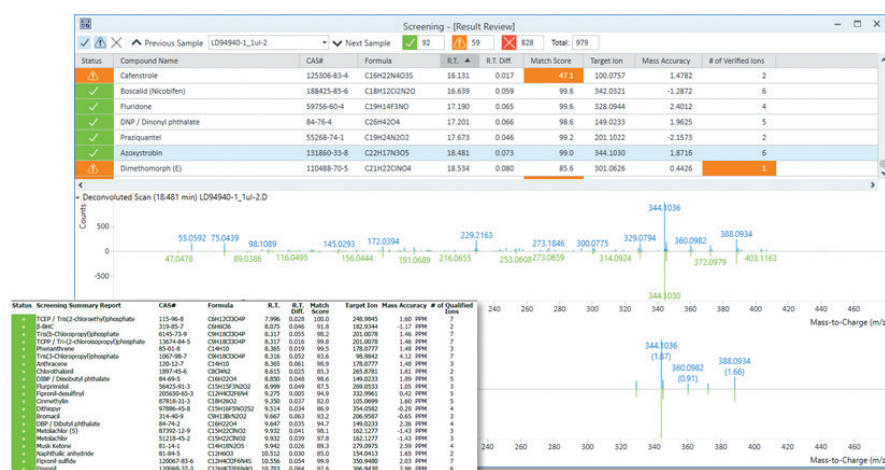


図 3. Agilent MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェア 10.1 による EI PCDL-ベースのスクリーニング。自動的に評価された化合物には緑色のラベルが、レビューの追加が必要な化合物には橙色のラベルが付けられています。下部の隅にレポートの一部が例として示されています。

マニュアルレビューを追加する必要がある化合物には、橙色のラベルが付けられています。これらの暫定的な同定（橙色の強調表示）は、ライブラリー一致スコアや評価済みイオンの数などの不合格パラメータが 1 つのみであっても、スペクトル内のイオンがごくわずかである（かつ選択的でない）場合を除き、または低応答でない限り、偽陽性となる可能性があります。GC/Q-TOF サスペクト化合物のスクリーニングワークフローは柔軟性に非常に優れているため、分析困難な化合物に合わせて、メソッドを最適化できます。

表 2 の化合物は、GC/Q-TOF スクリーニングで同定されたもので、ニセネコゼミジンコに対する死亡率によってグループ化されたサンプル

ル間で応答レベルにいくらかの違いが示されており、これらを毒性の原因物質として潜在的な調査対象とします。

廃水流出物サンプルの NCI 分析

前述の廃水流出物からの抽出物を NCI モードでも分析して、ハロゲン化汚染物質やその他の電子吸引基のある化合物の最良の分析に必要な感度を確認しました。同じ GC/Q-TOF スクリーニングワークフローで、NCI データを分析しました。GC/Q-TOF スクリーニング法を NCI で使用するために、ハロゲン化ニトロ化合物および電子吸引基のある他の汚染物質の NCI スペクトルを含むより具体的な PCDL を作成しました。NCI モードと NCI PCDL を使用し、各廃水流出物にお

いて平均で約 40 種類の化合物が同定されました。図 4 および表 3 に NCI スクリーニングの結果を示します。少数の化合物が 1 つのみ顕著なイオンまたは同位体クラスターを持っており、確認のために追加の作業が必要な場合があります（図 4A）、多くの化合物はメタンの NCI で PCDL スクリーニングワークフロー（図 4B）で使用するために十分なフラグメントを生成しました。したがって、この GC/Q-TOF スクリーニングワークフローは、該当する PCDL があれば NCI データにも適用できます。

表 2. EI サスペクト化合物スクリーニングの結果の抜粋。サンプル全体における相対的なレベルで、応答値を色分けしています。定量イオンの質量誤差とライブラリー一致スコアも表示されています。

サンプル	80 % の死亡率						20 % の死亡率						0 % の死亡率					
	LD94940-1			LD94940-2			LD94941-1			LD94941-2			LD94943-1			LD94943-2		
化合物名	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア	応答値	質量誤差	ライブラリー一致スコア
TBEP/Tris(2-ブトキシエチル) ホスファート	2013504	2.8	99.9	1502528	3.9	99.9	1289372	2.5	99.9	1559301	3.8	99.9	787113	3.1	99.9	784473	3.8	99.9
tert-ブチルフェニルジフェニルホスファート	16799	2.1	92.9	4948	3.2	74.6	2828	1.1	82.5	10468	0.8	91.9	2950	1.3	70.6	2766	0.8	91.9
クロラントラニルブロール	6298	0.2	76.8	5330	2.0	79.4	3572	1.7	63.2	3494	1.8	66.4	3458	1.1	52.4	2710	1.8	66.4
フルルプリミドール	16518	1.3	80.4	15240	0.5	76.4	10698	2.6	73.7	12065	2.1	80.2	6038	2.0	74.2	4976	2.1	80.2
バクロフトラゾール	16985	0.9	96.8	15763	1.6	98.7	10725	0.9	92.4	12090	2.1	94.9	9106	1.8	79.1	8448	2.1	94.9
TBZ/チアベンダゾール	1570235	1.4	99.7	1536170	2.4	99.7	1282402	0.6	99.7	1368732	2.2	99.8	774093	0.6	99.7	675439	2.2	99.8
アゾキシストロビン	134463	1.8	99.1	139960	3.0	98.9	109579	1.4	98.9	119004	1.7	98.8	104804	1.7	89.9	94511	1.7	98.8

表 3. NCI サスペクト化合物スクリーニングの結果

サンプル	94940-1		94940-2		94941-1		94941-2		94943-1		94943-2	
化合物名	応答値	ライブラリー一致スコア	応答値	ライブラリー一致スコア	応答値	ライブラリー一致スコア	応答値	ライブラリー一致スコア	応答値	ライブラリー一致スコア	応答値	ライブラリー一致スコア
デルタメトリン	16837	71.4	14202	42.7	6474	83.7	4138	36.3	3253	56.5	4294	36.3
硫酸エンドスルファン	3372	98.8	3013	91.9	12182	98.9	11865	99.1	18103	98.8	15859	99.1
フィロニルスルホン	1184481	99.4	989538	99.3	1058932	99.4	898204	99.3	1218463	99.4	1089462	99.3
クロルフェンビンホス	22450	94.7	13196	86.3	16668	94.4	14469	94.7	14757	95.7	12834	94.7
フィロニル	1312800	98.7	1269915	97.7	1255881	97.1	1307988	96.8	1519654	95.8	1350814	96.8
フィロニルスルフィド	201344	99.9	192041	100.0	224062	100.0	218654	100.0	241255	100.0	274001	100.0
クロラタールジメチル	1730		1409	94.1	1468	94.3	1489	96.2	2204	80.0	1807	96.2
トリアジメホン	22376	94.1	16547	94.2	19705	96.0	17006	96.4	18710	97.2	16675	96.4
マラチオン	474	86.6	249	86.6	0	–	0	–	0	–	0	–
フィロニルデスルフィニル	128886	97.8	111722	97.8	122423	97.8	119001	97.9	164450	97.8	135773	97.9
クロロタロニル	23789	99.4	12226	99.2	14367	99.0	15765	99.1	14714	99.2	12680	99.1
β-BHC	36573	88.4	19696	91.7	25594	81.4	19439	84.7	23983	69.4	13527	84.7
ジクロラン	30089	92.3	33303	93.2	34005	92.6	39632	93.8	44118	95.1	35911	93.8
ヘキサクロロベンゼン	13573	99.3	10353	99.6	11863	99.3	9934	99.1	14371	98.7	12048	99.1
トリフルラリン	10334	86.6	11119	94.1	12089	94.2	11454	92.8	13550	94.5	9293	92.8
2,4-ジニトロトルエン	81406	90.1	91627	89.0	75770	84.4	67256	83.3	43423	91.1	41979	83.3
2,4,6-トリクロロフェノール	2551498	92.2	2250861	91.6	2525758	91.5	2544336	91.4	2707308	91.2	2736603	91.4

EI および NCI スクリーニング法を使用し、廃水サンプル中の多数の環境汚染物質（多くの農業を含む）を同定しました。しかし、フィプロニルおよびフィプロニル分解生成物を含むこれらの物質の大半は、無毒性を示した廃水サンプル中でも同定されており（表 3）、測定された毒性の原因ではないと考えられます。

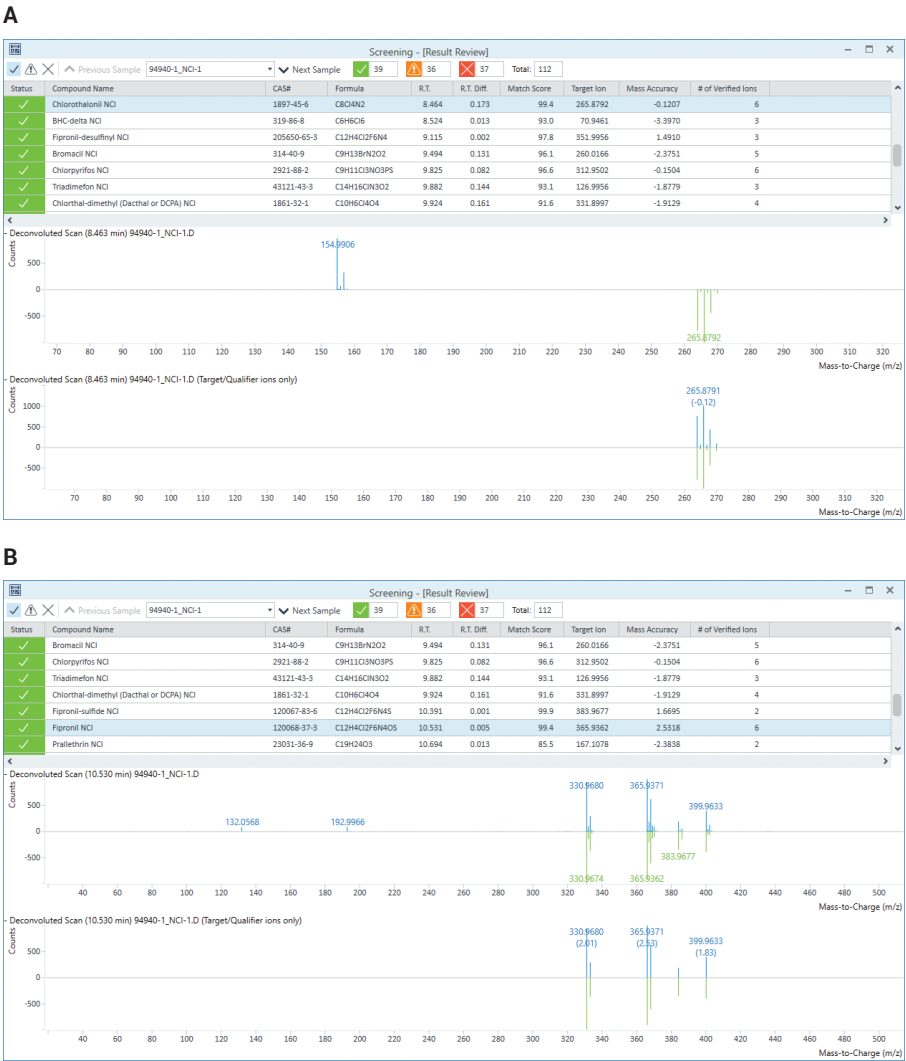


図 4. NCI のサスペクト化合物スクリーニングによって同定された化合物の例。下側のミラープロットは、スクリーニングアルゴリズムで選択された特定のイオンのスペクトル照合です。
A) 非常にシンプルな NCI スペクトルがある同定。B) NCI スペクトル中の十分な数のイオンで同定確認できる例

廃水流出物サンプルのノンターゲット分析

廃水流出物の毒性の増加と関連する可能性がある追加の汚染物質を同定するために、ノンターゲットワークフローによってデータを処理しました。この手法には、Unknowns Analysis でのフィーチャー抽出と NIST 17 ライブラリ検索が含まれ、続いて MPP で差分解析して、より高い毒性を示すサンプル中でより大きな存在を示す化合物を同定しました (図 2)。

同定された化合物と同定されなかった化合物を Unknowns Analysis から化合物変換フォーマット (.CEF) ファイルとしてエクスポートし、MPP にインポートしました。主成分分析 (PCA) プロットは、毒性が異なる 3 種類の廃水流出物に対応して化合物が 3 グループに明確に分類されていることを示しています (図 5)。

倍率変化と統計的有意性のボルケーノプロットは、大きなデータセットにおける変化を視覚化できます。この研究では 80 % と 0 % の死亡率グループ間の違いを簡単に検出するために使用しました (図 6)。ニセネコゼミジンコの死亡率が 0 % の廃水流出物の抽出物と比較して、80 % の死亡率を示す廃水流出物中に多くの化合物が大幅に高い濃度で存在しました。これらの化合物はボルケーノプロットの右上に赤色で示されています。

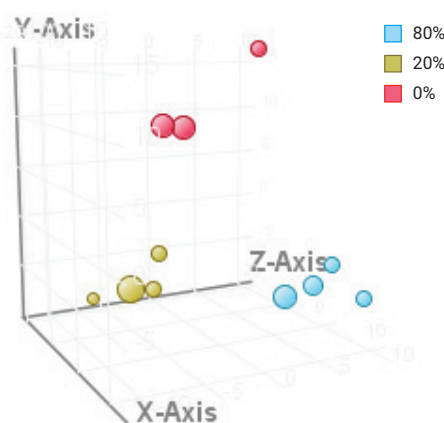


図 5. 廃水流出物の抽出物が毒性を基に 3 つのグループに明確に分類されることを示す PCA プロット。

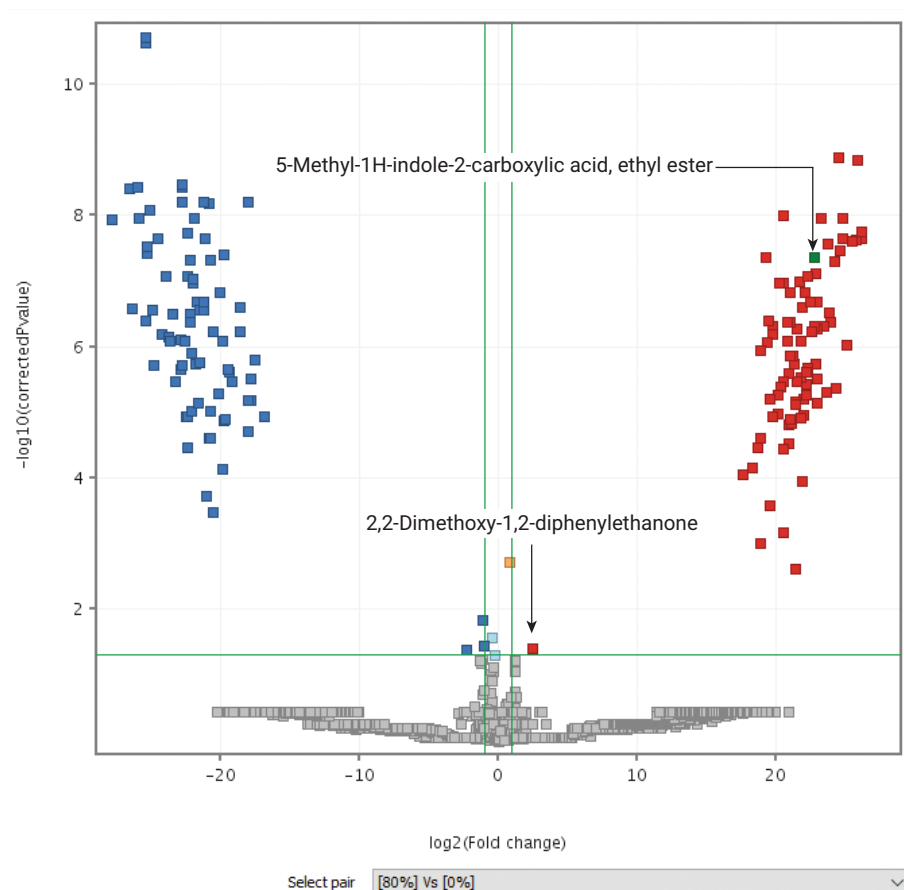


図 6. 80 % と 0 % の死亡率のグループを比較するボルケーノプロット。ボルケーノプロットの右上にある赤色の正方形のラベルの付いた化合物は、0 % 死亡率と比べて 80 % 死亡率の廃水流出物で大幅に高いレベルで存在します。

廃水流出物の毒性と、その抽出物中に存在する暫定的に同定された化合物の相互の関係を詳細に理解するために、相関分析を行いました。3つの流出物の毒性グループすべての倍率変化 (FC) の分析結果 (FC カットオフ 2、 $p < 0.05$) を、相関分析のためのエンティティリストとして使用しました (図 7A)。死亡率の % をフィルタリングパラメータとして選択しました。ピアソン類似度メトリックをカットオフ 0.6 で選択して、相関関係が強い化合物のみを表示しました (図 7B と 7C)。ボルケーノプロットと相関分析で暫定的に同定された化合物のペア (図 6 と 7C) を選択して、次のセクションで説明するように、化合物 ID 確認を行いました。

暫定的な同定の評価と未知化合物の同定

廃水流出物の毒性と関連がある化合物の同定を確認するために、Unknowns Analysis の ExactMass (Fragment Formula Annotation) 機能を使用しました (図 8A と 8B)。NIST 17.L ライブラリを使用し、ライブラリー致スコア 85.9 で 2,2-ジメトキシ 1,2-ジフェニルエタノンとして暫定的に同定された化合物は、暫定的な同定の分子式を考慮した場合にすべてのフラグメントイオンで質量誤差はわずかでした (図 8A)。2 つ目の対象化合物は、フラグメントの m/z が暫定的に同定した化合物の分子式と整合しなかったため誤認とされました (図 8B)。この化合物の EI スペクトルからは検出可能な分子イオンが得られなかったため、PCI を用いて分子イオンを同定し、さらに MassHunter Qualitative Analysis の Fragment Formula Annotation ツールと組み合わせて、この未知化合物の分子式を提案しました (図 8C)。PubChem データベースにより、この化合物の分子式に最も関連する分子式として、クエン酸アセチルトリエチルに相当するこの化合物の構造が示唆されました (図 8C)。³

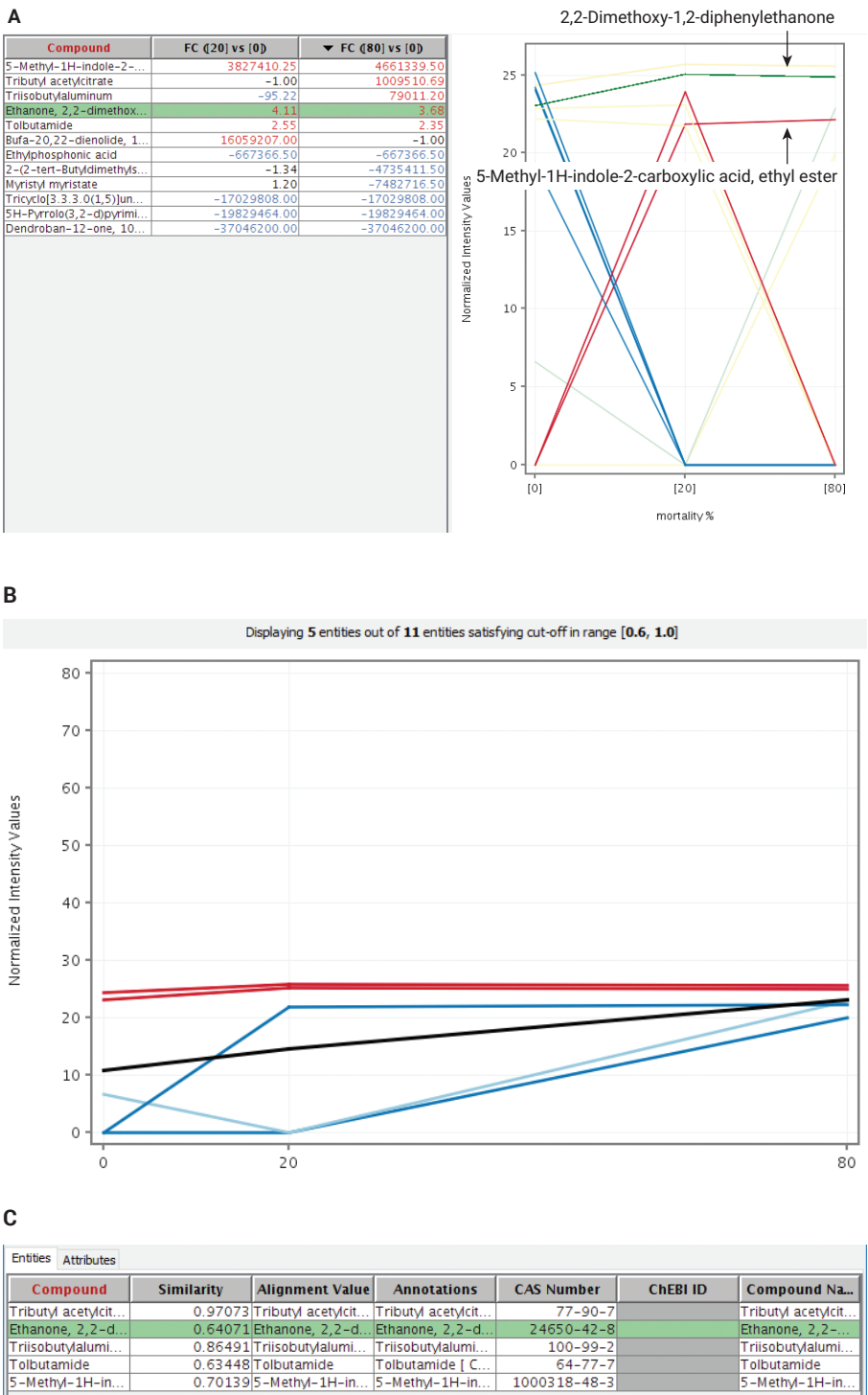


図 7. Agilent MPP による相関分析。A) 3 種類の廃水流出物サンプルの倍率変化 (FC) 分析、B) 死亡率によるフィルタリング結果、C) 類似度カットオフ 0.6 使用時の相関分析結果の化合物のリスト

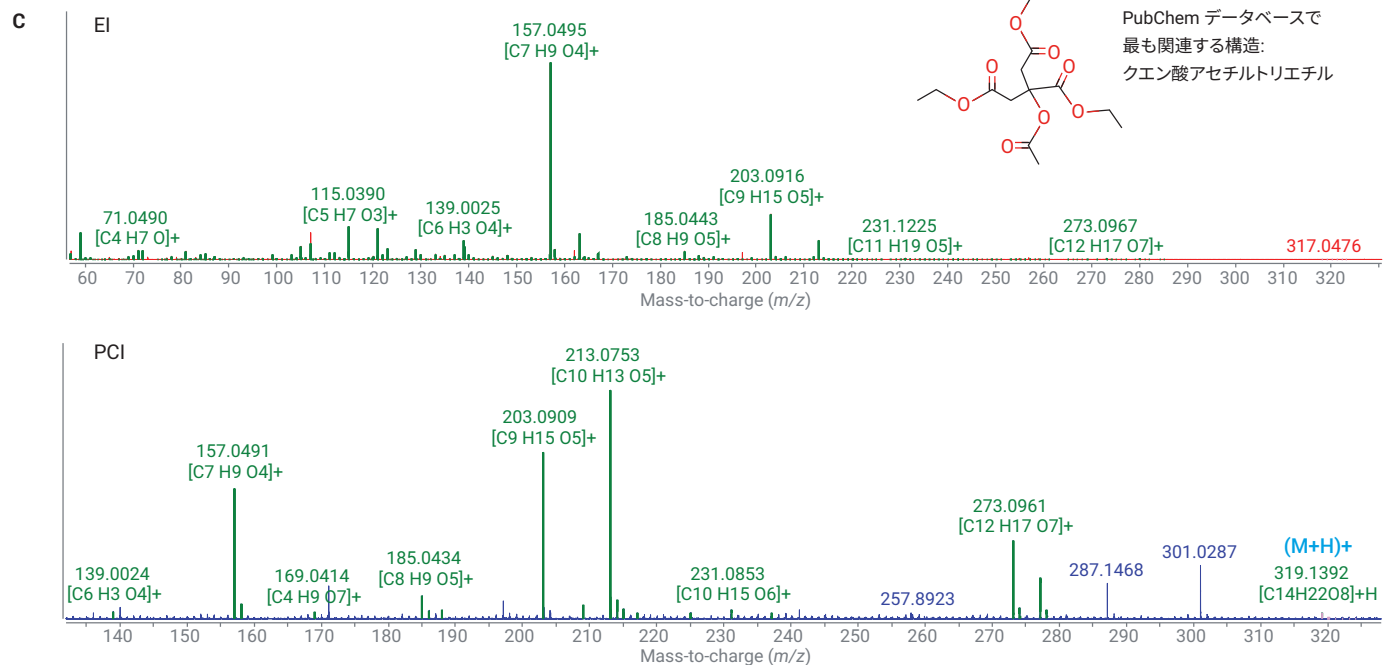
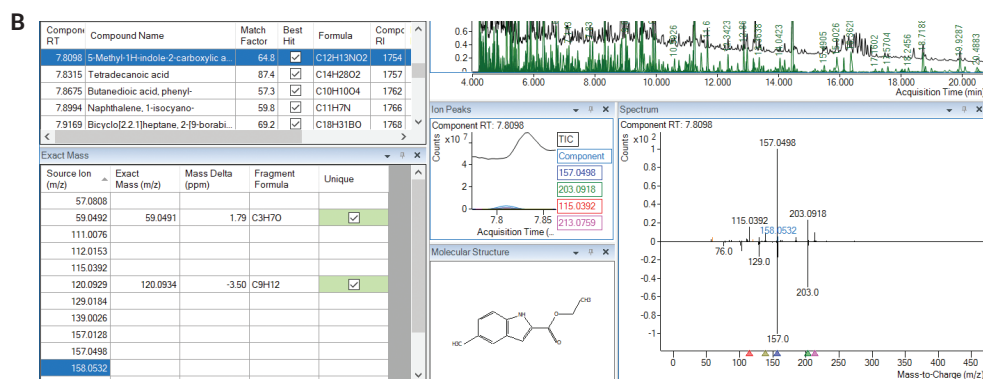
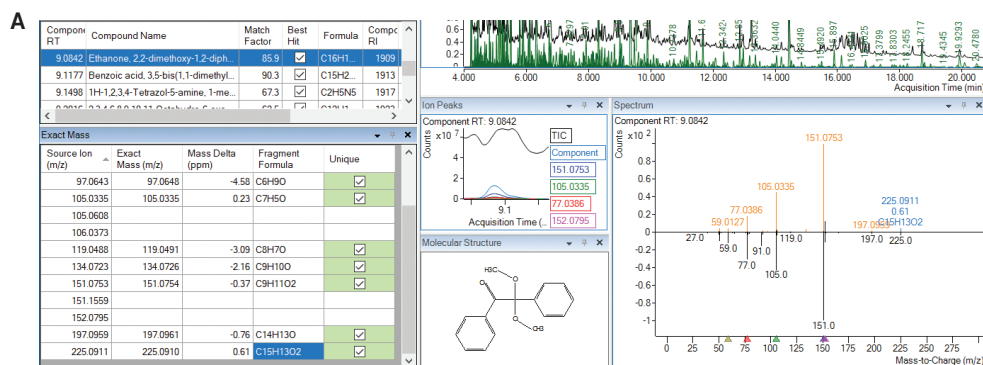


図 8. Unknowns Analysis と ExactMass 機能を使用した化合物の評価と同定。(A) 確認された ID、(B) 排除された ID および Agilent MassHunter Qualitative Analysis の Fragment Formula Annotation EI (C、上側) および排除された ID の化合物の PCI (C、下側) スペクトル

結論

EI および NCI 環境汚染物質サスペクト化合物スクリーニングとノンターゲットスクリーニングを組み合わせた手法を、Agilent 7250 GC/Q-TOF システムを用いて実証しました。ある程度の毒性と関連付けられるサンプル中で、フルルプリミドール、バクロブトラゾール、アゾキシストロビン、クロラントラニリプロールなどの農薬を含め、少数の対象化合物が主に同定されました。

ノンターゲット手法では、ニセネコゼミジンコの死亡率と関連付けられるその他の化合物を同定できました。ノンターゲット手法では、サスペクト化合物スクリーニング手法と異なり、微量化合物の濃度のわずかな差を検出できる可能性は低いものの、精密質量 PCDL の範囲外の潜在的な汚染物質の検出が可能です。

参考文献

1. SANTE/11945/2015.Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed **(2015)**.
2. 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)**.
3. Kim, S. *et al.* PubChem 2019 Update: Improved Access to Chemical Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47(D1), D1102-1109.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

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

5994-1345JAJP