

Agilent MassHunter Optimizer を用いた US EPA 8270 準拠の GC/TQ MRM メソッドの開発

著者

Anastasia Andrianova,
He Liu, Alex Graettinger, and
Melissa Churley
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer を用いて、マルチブルリアクションモニタリング（MRM）データ取り込みメソッドをほぼ自動で全面的に開発できることを実証します。GC/TQ Optimizer は、スペクトルデータのデコンボリューションによって、クロマトグラフィーによる干渉がある場合でも、プリカーサイオンを確実に同定します。このツールにより、MRMデータ取り込みメソッドの開発時間を大幅に短縮できると同時に、手作業による確認を減らせます。MRM メソッド開発におけるプロセスを調査し共溶出の影響を評価するために、米国環境保護庁（EPA）メソッド 8270 に関係する 83 種類の化合物の混合物を使用しました。

Optimizer ツールの主な利点は、次のものがあります。

- MRM 最適化メソッド開発の時間を短縮
- 自動化による手作業の軽減
- 再現性
- GC/MSD メソッドから GC/TQ への円滑な移行をサポート
- 確認ツール内蔵

はじめに

GC/MS/MS MRM トランジションの開発は課題が多く、複数のステップを踏む時間のかかるプロセスです。このプロセスは、分析対象化合物の共溶出やマトリックス干渉のためにさらに複雑になることもあります。これまで、熟練の科学者の手作業による確認が必要でした。GC/TQ 用 MassHunter Optimizer により、MRM モードでのデータ取り込みパラメータの自動最適化を実現できます。

MRM メソッド開発全体を、ユーザーによる介入なしに、高度に自動化できます。また、各最適化ステップを個別に実行することも可能です。次に各ステップを示します。

- 分析対象物を、デコンボリュートしたスペクトルのライブラリ検索によって同定
- プリカーサイオンの同定
- さまざまなコリジョンエネルギーでプロダクトイオンを同定
- プロダクトイオンの選別
- コリジョンエネルギーの最適化

GC/TQ 用 Optimizer では、[スキャンデータから開始] および [SIM イオンから開始] などのいくつかのワークフローを活用できるため、GC/TQ を初めて使うユーザーでも、既存のシングル四重極スキャンメソッドや SIM メソッドをトリプル四重極 MRM メソッドに変換できます。既存の TQ ユーザーは、[MRM から開始] ワークフローを用いてコリジョンエネルギーを MRM 用に再最適化でき、新たなクロマトグラフィー条件でのリテンションタイムの更新も行えます。既存の MRM メソッドの場合は、リテンションタイム更新機能を使用して、新しいクロマトグラフィー固定相や GC オープン温度プログラムなどの変更されたクロマトグラフィー条件へのシームレスな移行を確実に実施できます。

このアプリケーションノートでは、ターゲット、サロゲート、内部標準を含む US EPA 8270 に関連した 83 種類の半揮発性化合物のための MRM 取り込みメソッドを開発しました。また、スキャン、SIM、MRM などの異なる取り込みメソッドで始まる、次の 4 つのワークフローを紹介しています。

- スキャンデータから開始のワークフローでは、83 種類の化合物を同定しました。プリカーサおよびプロダクトイオンが決定され、コリジョンエネルギーが最適化されました。
- [SIM イオンから開始] のワークフローでは、インポートされた SIM イオンのプロダクトイオンが同定され、83 の化合物に対して 351 の MRM トランジションのコリジョンエネルギーが最適化されました。
- [MRM から開始] のワークフローでは、83 の化合物に対してコリジョンエネルギーが再最適化されました。
- [リテンションタイム更新] 機能を使用し、MRM メソッドのリテンションタイムが更新されました。

プロセスを調査および共溶出の影響の評価には、83 種類の半揮発性化合物を含む 8270 「フルミックス」(AccuStandard) を使用しました。MRM 開発プロセス全体をきわめて適切に実施できましたが、場合によっては共溶出が複雑化を招き、確認や手作業による介入が必要となる可能性があります。

実験方法

GC/TQ 用 MassHunter Optimizer は、Agilent MassHunter GC/MS Data Acquisition バージョン 10.0 以上で自動的にインストールされ、Agilent 7000 シリーズおよび 7010 シリーズ GC/TQ との使用がサポートされています。Agilent GC/MS 設定ツールを使用して GC/TQ 機器を構成すると、デスクトップアイコンが作成されます。MRM 開発を開始するには、既存のデータ取り込みメソッドが必要です。MRM トランジションの開発および最適化の際は、取り込みメソッドのすべての GC パラメータが保持されます。

このアプリケーションノートでは、[スキャンデータから開始]、[SIM イオンから開始]、[MRM から開始]、MRM から開始する場合の [リテンションタイム更新] の 4 つのワークフローを取り上げます。今回の作業では、Agilent 7890/7000D トリプル四重

極 GC/MS システム、Agilent MassHunter GC/MS Data Acquisition バージョン 10.0、Agilent MassHunter Unknowns Analysis バージョン 10.0 を使用しました。開始する取り込みメソッドは事前に最適化して、US EPA 8270 メソッドの性能要件に適合する半揮発性化合物の GC/MSD 分析を実現しました。¹

スキャンデータから開始

[スキャンデータから開始] のワークフローは、連続して実行される、以下のステップで構成されています。

- ターゲット化合物を同定するためのフルスキャンデータの取り込みまたはインポート
- プリカーサイオンの同定
- プロダクトイオンの同定
- コリジョンエネルギーの最適化

この作業において、スキャンデータは MS1 スキャンで、450 ms のスキャンタイムで取り込まれました。結果、サンプリングスピードは 1 秒あたり 5 サンプルです。スキャンから開始する場合、MRM 開発の最初のステップは、デコンボリューションされたスペクトルのライブラリ検索による分析対象化合物の同定です。これにより、ターゲット分析対象化合物の正確な同定が可能となり、カラムブリードなどのクロマトグラフィー干渉が存在する場合や共溶出する分析対象化合物やマトリックスとの干渉が存在する場合でも、プリカーサイオンを高い信頼性で選択できます。スペクトルデータのデコンボリューションおよびライブラリ検索には、Agilent MassHunter Unknowns Analysis ソフトウェアで用いるアルゴリズムと同様のアルゴリズムが使われます。GC/TQ 用 Optimizer は、*.L および *.mslibrary.xml を含むライブラリフォーマットをサポートします。このため、NIST などの大きなスペクトルライブラリの利用にも Agilent MassHunter ライブラリエディタソフトウェアでユーザーが作成した小規模なライブラリの利用にも対応可能です。このアプリケーションノートでは、化合物の同定に NIST17 スペクトルライブラリを使用しました。

MRM 開発の残りの 3 ステップは自動化でき、ユーザーの介入が不要です。また、次のステップに進む前に、各ステップの結果を確認できます。次に進む前に、ユーザーは自動での選択を変更し、必要に応じてイオン選択を追加することができます。このアプリケーションノートでは次の最適化ステップに進む前に、プリカーサおよびプロダクトイオンの選択を確認しました。

また、[スキャンデータからの開始] のワークフローは、12 回の注入で 6 時間内に最適化を完了できました。

SIM イオンから開始

[SIM イオンから開始] のワークフローには順次実行される次のステップが含まれました。

- 化合物名とリテンションタイムを含む .CSV ファイルでのターゲット化合物の SIM イオンのインポート。あるいは、事前に作成された SIM 取り込みメソッドから SIM イオンをインポートすることができます
- プロダクトイオンのスキャンおよび同定
- コリジョンエネルギーの最適化

また、[SIM イオンから開始] のワークフローは、11 回の注入で 5.5 時間内に最適化を完了できました。

MRM から開始

[MRM から開始] のワークフローには次のステップが含まれました。

- 事前に作成された MRM 取り込みメソッドまたは .CSV ファイルからの MRM トランジションのインポート
- コリジョンエネルギーの最適化

これら 3 つのワークフローステップはすべて、コリジョンエネルギーの最適化ステップを含んでいます。スキャンまたは SIM から開始する場合、プロダクトイオンの同定が実行されます。[スキャンデータからの開始] のワークフローでは、化合物およびプリカーサイオンの同定ステップを最初に行う必要があります。

MRM 開発およびコリジョンエネルギーの最適化が完了した後、開発した取り込みメソッドをタイムセグメント MRM メソッドまたはダイナミック MRM (dMRM) メソッドとして保存できます。後者のオプションでは、ユーザーは最小ドウェルタイムおよび 1 秒あたりのサイクル数を定義できます。

リテンションタイムを更新するには、既存の MRM または SIM メソッドをインポートしてクロマトグラフィー分析を実行する必要があります。

[MRM から開始] のワークフローは、4 回の注入で 2 時間内に最適化を完了できました。

結果と考察

[スキャンデータから開始]：ライブラリ検索およびプリカーサイオンの同定

サロゲートおよび内部標準を含む 83 の半揮発性化合物を、EPA 8270 標準フルミックスで収集されたフルスキャンクロマトグラムを使用し、デコンボリュートした質量スペクトルを NIST17 スペクトルライブラリに対して検索することによって、同定しました。83 の半揮発性化合物は、プロセスを調査し共溶出の影響を評価するために使用しました。共溶出により MRM 開発プロセスが複雑化した場合は、手作業での確認が必要です。図 1A は化合物の同定を完了した後の Optimizer ウィンドウを示しています。このウィンドウは次のものを表示しています。

- 化合物表 (Compound Table)
- 標識ピークを示した GC/MS クロマトグラム
- 強調表示した化合物のデコンボリュートした質量スペクトル
- 強調表示した化合物で利用可能なプリカーサイオン
- すべての同定済み化合物で選択された全プリカーサイオンのサマリ

図 1A の表内の Hit Score の列に、ライブラリ一致スコアが表示されています。化合物名、CAS 番号、分子式、分子量などのライブラリから得られる情報は、Optimizer の化合物表にインポートされます。化合物表内で化合物を選択すると、同定された化合物のデコンボリュートしたスペクトルが表示されます。図 1A の右下に、強調表示された化合物、2-メチル-4,6-ジニトロフェノール (DNOC) のデコンボリュートしたスペクトルが表示されています。スペクトルデータのデコンボリューションにより、カラムブリードや共溶出ピークなどのクロマトグラフィー干渉がある場合でも、正しい化合物の同定および信頼性のあるプリカーサイオンの選択が可能になります。示唆されたプリカーサイオンが緑色で強調表示されます。

ソフトウェアによって示唆されるプリカーサの選択は、アバンダンスと m/z 値に基づくことにご留意ください。また、1 つのクラスタから 2 個より多いイオンが選択されることはありません。例えば、イオン m/z 51 および 53 よりもアバンダンスが低いにもかかわらず、 m/z 値が高くて特異性があるために、 m/z 168 はプリカーサイオンとして自動的に選択されました。

ソフトウェアによって示唆されたプリカーサは、選択されているイオンのチェックを外して他の利用可能なイオンにチェックを付けることでユーザーが上書きできます。

化合物表内で該当する化合物が選択されていると、利用可能なプリカーサイオンのリストが表示されます。DNOC で利用可能なプリカーサイオンは、図 1A の Optimizer ウィンドウの 2 つ目の表、DNOC の表に表示されます。この表のイオンはソフトウェアによってプリカーサイオンとして自動的に選択されたものです。図 1B のプリカーサイオンの同定パラメータで示されるように、この Optimizer メソッドでは各化合物についてプリカーサとして最大 4 個のイオンが選ばれるように設定されています。

A

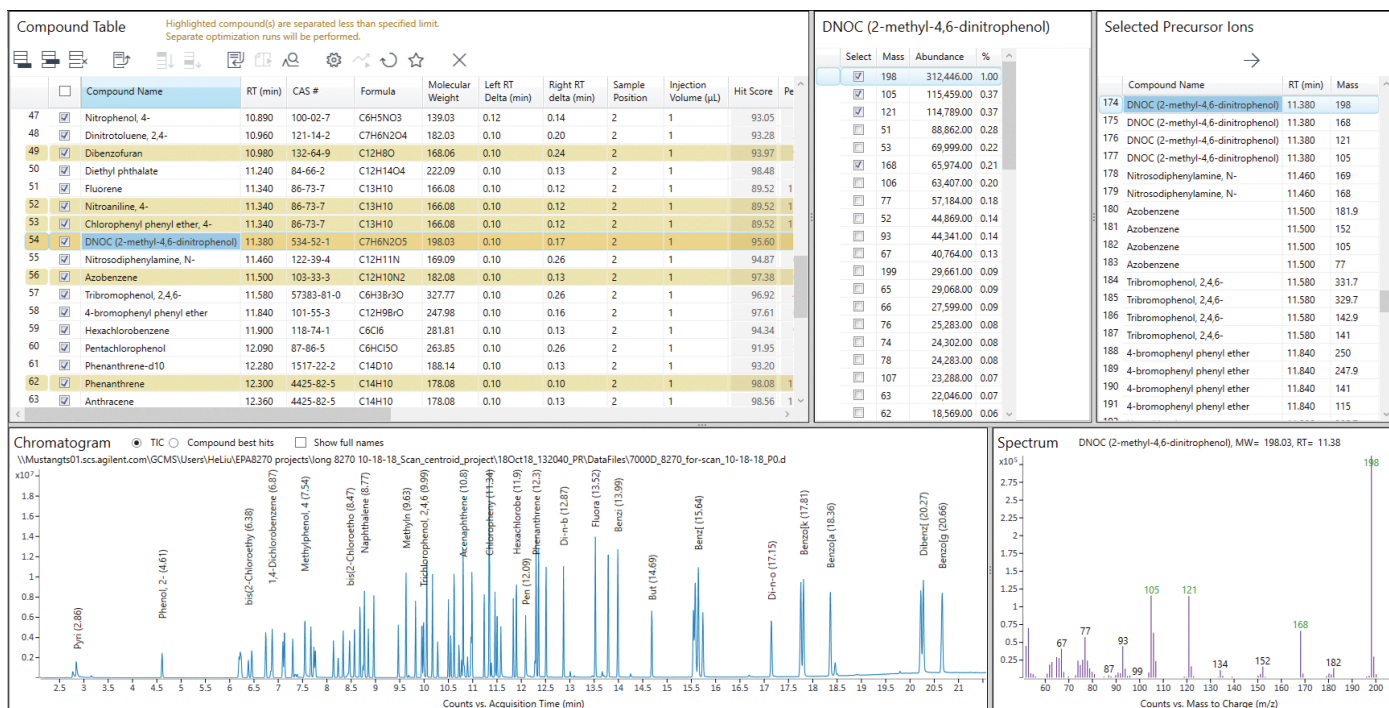


図 1A. 化合物の同定結果を示した GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer のウィンドウ

残りの MRM 開発ステップ（プロダクトイオンの同定およびコリジョンエネルギーの最適化など）は自動化できます。ユーザーにとって必要なことは最終的に最適化されたトランジションのみを確認することです。確認は手作業で行うことができるため、ユーザーはコリジョンエネルギーの最適化ステップを実行する前に選択されたプロダクトイオンを確認できます。

[スキャンデータから開始]：プロダクトイオンの同定

プロダクトイオンの最適化では、1 つの分析対象化合物あたりのプリカーサイオンの数およびターゲットのクロマトグラフィー分離の程度に依存して複数回の注入が必要となることがあります。最も効果的な MRM 開発を確実にものにするには、分析対象化合物がクロマトグラフ上でベースライン分離されることが推奨されます。しかし、化合物の質量スペクトルが異なりレスポンスアバundanceが同等の場合は、共溶出する化合物の MRM 開発を行うことができます。共溶出するターゲットの MRM 開発を行う際には、追加の注入が必要となる可能性があります。

B

Identify Precursor Ions Identify Product Ions Optimize CEs RT Delta Miscellaneous

Maximum number of precursor ions to select

☒ Select highest m/z values with normalized % intensity greater than

☐ Select highest m/z values with abundance count greater than

Full scan mass range

☒ Do not exclude masses

☐ Exclude masses

m/z values (separate by commas)

☒ Identify compounds

Library

Min score (%)

Min peak area

RT tolerance (sec) (0.017 Minutes)

Maximum hits for each peak

図 1B. プリカーサの同定パラメータを示した GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer のウィンドウ

今回の作業では、83 の成分の分析困難な混合物は 22 分以内に分析されました。図 1A の化合物表で黄色の強調表示で示されているように、83 ターゲット化合物のいくつかは共溶出しました。83 のターゲット化合物すべてに対してプロダクトイオンスキャンを実行するには、7 回の注入が必要でした。共溶出する化合物を考慮しない場合、残っている化合物のプロダクトイオンは 3 回注入で同定できます。

各プリカーサイオンのプロダクトイオンの同定は、プロダクトイオン同定パラメータでユーザーが定義した複数のコリジョンエネルギーでのプロダクトイオンスキャンによって行われます (図 2B)。プロダクトイオンスキャンでは最大 4 個のコリジョンエネルギーが可能です。今回の調査では、プロダクトイオンスキャン実験をデフォルト値の 5、15、25、35 eV で行いました。プロダクトイオンの同定の結果を図 2A に示します。Product Ion Scan Table で DNOC が強調表示されています。このウィンドウは次のものを表示しています。

B

Identify Precursor Ions Identify Product Ions Optimize CEs RT Delta Miscellaneous

Maximum number of product ions to be found

☒ Select ions with % abundance greater than

☐ Select ions with abundance greater than

Collision energy values (separate by commas)

☐ Profile data

Product ion scan low mass cutoff

☒ m/z values

☐ % mass (mz)

☒ Do not exclude masses

☐ Exclude masses

m/z values (separate by commas)

図 2B. プロダクトイオンの同定パラメータ

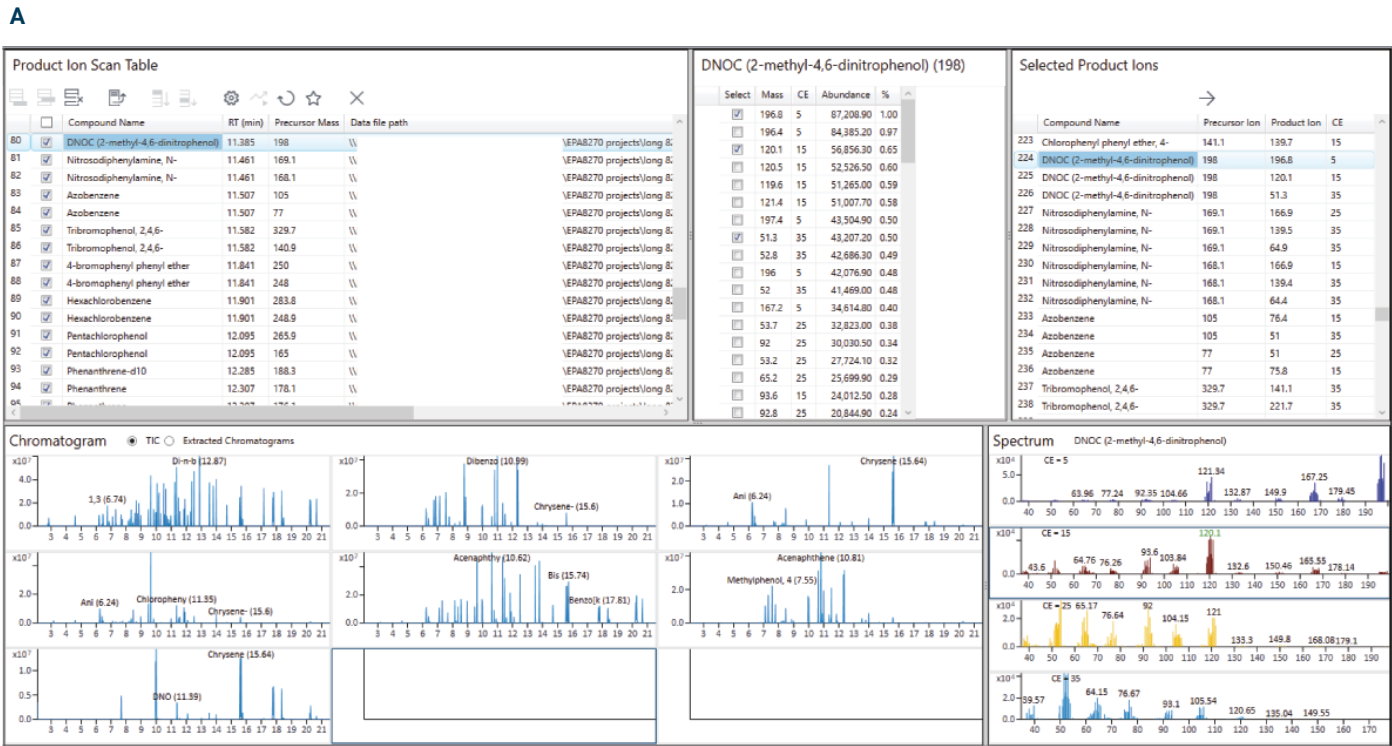


図 2A. プロダクトイオンスキャン表で強調表示されている DNOC の プリカーサ (m/z 198) のプロダクトイオンの同定の結果

- 行ごとに1個のプリカーサイオンが示されるプロダクトイオンスキャン表
- プロダクトイオンスキャンのトータルイオンクロマトグラム (TIC)
- 強調表示されているプリカーサの4つの異なるコリジョンエネルギーで収集されたプロダクトイオンスキャンの質量スペクトル
- 各プリカーサで利用可能なプロダクトイオンの表
- 選択された全プロダクトイオンのサマリ

図 2B に、プロダクトイオンの同定パラメータを示します。図 2A の DNOC の m/z 198 のプリカーサで示されているように、プロダクトイオンの選択はアバンダンスおよびクラスタ条件に基づきます。プロダクトイオン同定ステップ

で手作業による確認を行う場合、ソフトウェアが推奨するプロダクトイオンは、選択したイオンのチェックを外すか、別の利用可能なイオンにチェックを入れることで上書きできます。

[スキャンデータから開始] : コリジョンエネルギーの最適化

コリジョンエネルギーは、前ステップで選択した値に近い最適化または定義した範囲での最適化が可能です。この実験では、コリジョンエネルギーを、プロダクトイオン同定ステップの4つの値から最良であると判断したコリジョンエネルギーの周辺で最適化しました (図 3B)。図 3A に、MRM トランジションテーブルで強調表示された DNOC の 198 & 120.1 トランジションを用いて、コリジョンエネルギーを最適化した結果を示します。このウィンドウは次のものを表示しています。

- 各行が1つの MRM トランジションに相当する MRM トランジション表
- 異なるコリジョンエネルギー値で得られた TIC
- MRM トランジションアバンダンス対コリジョンエネルギーをプロットした、イオンのブレイクダウンプロファイル
- 強調表示された MRM トランジションのコリジョンエネルギーと該当するアバンダンス

83 すべてのターゲット化合物用に開発された MRM 用にコリジョンエネルギーを最適化するには、4 回の注入が必要です。共溶出する化合物を考慮しなければ、残っている MRM トランジションのためのコリジョンエネルギーの最適化はわずか 1 回の注入で実施できます。

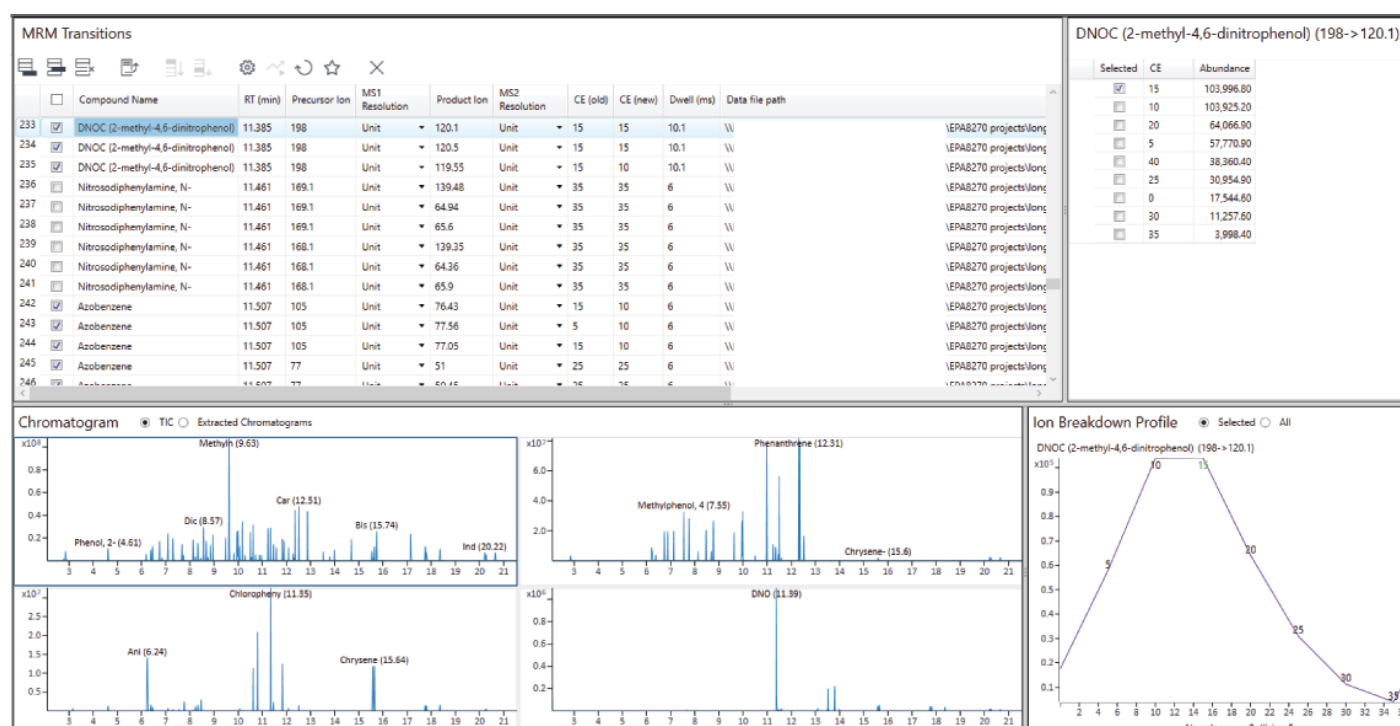


図 3A. MRM トランジション表で強調表示された DNOC の 198 → 120.1 トランジションのコリジョンエネルギーの最適化の結果

[スキャンデータから開始]: 代替ワークフロー

[スキャンデータから開始] のワークフローは、83 の半揮発性化合物の複雑な混合物を使用してプロセスを調査し、MRM 開発プロセスを複雑化して手作業での確認を必要とする可能性がある共溶出の影響を評価することを意図して実施しました。最適化を実現する代替の手法として、83 種類のターゲット化合物を複数の異なる混合物に分割して、共溶出および手作業での確認やユーザーの介入の必要性を最小に抑える方法があります。サンプルの分割が困難だと判断する場合は、代替のワークフローとして化合物リストを複数のプロジェクトに分割する方法があります。その後、各リスト内の化合物を別々に最適化して、結果を複数の .CSV ファイルとして保存します。すべての .CSV ファイルを新しいプロジェクトにインポートして、完全な MRM 取り込みメソッドを作成します。この手法により、共溶出を最小限にとどめ、MRM 開発の 1 つのプロジェクトで必要な注入回数を減らすことができます。

SIM イオンから開始

既存の GC/MSD メソッドなどから SIM 収集メソッドが使用可能な場合に MRM トランジションを開発するには、SIM 収集メソッドまたは適切にフォーマットされた .CSV ファイルをロードして [SIM イオンから開始] のワークフローを開始することができます。この作業で、83 種類の化合物に対応する 130 個の SIM イオンを化合物名、イオン、リテンションタイムの情報とともに .CSV ファイルとしてインポートしました (図 4A)。SIM イオンから開始する場合、インポートされたイオンをブリーカーサとして使用し、MRM 開発はプロダクトイオンスキャンから始まり、その後コリジョンエネルギーの最適化が行われます。現行のクロマトグラフィー条件下で各リテンションタイムが異なる場合、Optimizer を使用すればユーザーは SIM データを取り込んで分析し、各リテンションタイムを決定することができます。図 4B に示すように、SIM Ions テーブルに更新されたリテンションタイムが表示されています。

B

Identify Precursor Ions
Identify Product Ions
Optimize CEs
RT Delta
Miscellaneous

☒ Use MRM
☐ Use dMRM

Cycles per second
Min dwell (ms)

Collision energy values
☐ Range Step size (eV)
☒ +/- steps around current CE Step size (eV)

図 3B. コリジョンエネルギーの最適化のパラメータ

A

Compound Table

Highlighted compound(s) are separated less than specified limit. Separate optimization runs will be performed.

	☐	Compound Name	RT (min)	CAS #	Formula	Molecular Weight	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	Sample Position	Injection Volume (μL)	Peak Area
28	☒	Naphthalene-d8	8.747				0.10	0.10	2	1	
29	☒	Naphthalene	8.773				0.10	0.11	2	1	
30	☒	Chloroaniline, 4-	8.850				0.10	0.15	2	1	
31	☒	Hexachlorobutadiene	8.965				0.10	0.10	2	1	
32	☒	Phenol, 4-chloro-3-methyl-	9.470				0.10	0.17	2	1	
33	☒	Methylnaphthalene, 2-	9.630				0.10	0.10	2	1	
34	☒	Hexachlorocyclopentadiene	9.830				0.10	0.10	2	1	
35	☒	Trichlorophenol, 2,4,5-	9.950				0.10	0.10	2	1	
36	☒	Trichlorophenol, 2,4,6-	9.990				0.10	0.10	2	1	
37	☒	1,1'-Biphenyl, 2-fluoro-	10.057				0.10	0.10	2	1	
38	☒	Chloronaphthalene, 2-	10.172				0.10	0.11	2	1	
39	☒	Nitroaniline, 2-	10.282				0.10	0.15	2	1	
40	☒	Dimethyl phthalate	10.500				0.10	0.10	2	1	
41	☒	Dinitrotoluene, 2,6-	10.550				0.10	0.10	2	1	
42	☒	Acenaphthylene	10.622				0.10	0.12	2	1	
43	☒	Nitroaniline, 3-	10.718				0.10	0.10	2	1	
44	☒	Acenaphthene-d10	10.772				0.10	0.10	2	1	
45	☒	Acenaphthene	10.807				0.10	0.10	2	1	
46	☒	Phenol, 2,4-dinitro-	10.830				0.10	0.10	2	1	
47	☒	Nitrophenol, 4-	10.896				0.10	0.10	2	1	
48	☒	Dinitrotoluene, 2,4-	10.966				0.10	0.13	2	1	
49	☒	Dibenzofuran	10.986				0.10	0.10	2	1	
50	☒	Diethyl phthalate	11.233				0.10	0.12	2	1	
51	☒	Fluorene	11.342				0.10	0.10	2	1	
52	☒	Nitroaniline, 4-	11.344				0.10	0.10	2	1	
53	☒	Chlorophenyl phenyl ether, 4-	11.349				0.10	0.10	2	1	
54	☒	DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385				0.10	0.14	2	1	
55	☒	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461				0.10	0.10	2	1	
56	☒	Azobenzene	11.507				0.10	0.10	2	1	
57	☒	Tribromophenol, 2,4,6-	11.582				0.10	0.14	2	1	
58	☒	4-bromophenyl phenyl ether	11.841				0.10	0.10	2	1	
59	☒	Hexachlorobenzene	11.901				0.10	0.16	2	1	
60	☒	Pentachlorophenol	12.095				0.10	0.14	2	1	
61	☒	Phenanthrene-d10	12.285				0.10	0.10	2	1	

図 4A. [SIM イオンから開始] のワークフローでの .CSV からインポートされたターゲット化合物のリストを表示した 化合物表

今回の作業で、130 のインポートされた SIM イオンから開始して、83 種類のターゲット化合物用に 351 の MRM トランジションを開発しました。プロダクトイオンのスキャンステップで 7 回の注入が必要となり、コリジョンエネルギーの最適化に必要な 4 回の注入が続きました。このようにして、83 の化合物のすべての最適化は 5.5 時間で完了しました。この作業で、プロダクトイオンの同定とコリジョンエネルギーの最適化に使用したパラメータは、図 2B および 3B に示すように、[スキャンデータから開始] のワークフローのものと同じでした。SIM イオンから開始した場合の MRM 開発の結果は、図 3A に示した [スキャンデータから開始] のワークフローと同じ方法で表示されます。EPA 8270 MRM メソッドの自動作成により、Optimizer を用いて GC/MSD SIM から適切に移管できます。

B

	☐	Compound Name	RT (old)	RT (new)	Mass	MS1 Resolution	Dwell (ms)	Data file path
70	☒	Dinitrotoluene, 2,4-	10.966	10.966	165	Unit ▼	27.36	
71	☒	Dibenzofuran	10.986	10.986	168.1	Unit ▼	28.26	
72	☒	Dibenzofuran	10.986	10.986	139.1	Unit ▼	28.26	
73	☒	Diethyl phthalate	11.233	11.233	149	Unit ▼	27.43	
74	☒	Fluorene	11.342	11.342	166.1	Unit ▼	22.47	
75	☒	Fluorene	11.342	11.342	165.1	Unit ▼	22.47	
76	☒	Nitroaniline, 4-	11.344	11.344	138	Unit ▼	22.47	
77	☒	Nitroaniline, 4-	11.344	11.344	108	Unit ▼	22.47	
78	☒	Chlorophenyl phenyl ether, 4-	11.349	11.349	204	Unit ▼	23.12	
79	☒	Chlorophenyl phenyl ether, 4-	11.349	11.349	141.1	Unit ▼	23.12	
80	☒	DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	11.385	198	Unit ▼	22.39	
81	☒	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	11.461	169.1	Unit ▼	26.86	
82	☒	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	11.461	168.1	Unit ▼	26.86	
83	☒	Azobenzene	11.507	11.507	105	Unit ▼	30.81	
84	☒	Azobenzene	11.507	11.507	77	Unit ▼	30.81	
85	☒	Tribromophenol, 2,4,6-	11.582	11.582	329.7	Unit ▼	32.42	
86	☒	Tribromophenol, 2,4,6-	11.582	11.582	140.9	Unit ▼	32.42	
87	☒	4-bromophenyl phenyl ether	11.841	11.841	250	Unit ▼	46.68	
88	☒	4-bromophenyl phenyl ether	11.841	11.841	248	Unit ▼	46.68	
89	☒	Hexachlorobenzene	11.901	11.901	283.8	Unit ▼	53.84	
90	☒	Hexachlorobenzene	11.901	11.901	248.9	Unit ▼	53.84	
91	☒	Pentachlorophenol	12.095	12.095	265.9	Unit ▼	49.1	
92	☒	Pentachlorophenol	12.095	12.095	165	Unit ▼	49.1	
93	☒	Phenanthrene-d10	12.285	12.285	188.3	Unit ▼	42.02	
94	☒	Phenanthrene	12.307	12.307	178.1	Unit ▼	42.03	
95	☒	Phenanthrene	12.307	12.307	176.1	Unit ▼	42.03	
96	☒	Anthracene	12.355	12.355	178.1	Unit ▼	46.81	
97	☒	Carbazole	12.512	12.512	167	Unit ▼	73	
98	☒	Di-n-butyl phthalate	12.869	12.869	149	Unit ▼	106.33	
99	☒	Fluoranthene	13.528	13.528	202.1	Unit ▼	106.31	
100	☒	Fluoranthene	13.528	13.528	201.1	Unit ▼	106.31	

図 4B. [SIM イオンから開始] のワークフローでのインポートされた SIM イオンおよびターゲット化合物の元と更新済みのリテンションタイム

MRM から開始

既存の MRM トランジションのコリジョンエネルギーを再最適化するために、MRM 取り込みメソッドをロードして [MRM から開始] ワークフローを開始できます。この作業で、83 の化合物に対する 166 の MRM トランジションがインポートされました (図 5)。現行のクロマトグラフィー条件下と各リテンションタイムが異なる場合、Optimizer を使用してユーザーが MRM または dMRM データを取り込んで分析し、各リテンションタイムを更新することができます。図 5 に示すように、MRM トランジション表に更新されたリテンションタイムが表示されています。

この作業で、83 種類の化合物に対する 166 の MRM トランジションのコリジョンエネルギーが 4 回の注入で再最適化されました。このワークフローでは、コリジョンエネルギーの最適化で使用したパラメータは、図 3B に示す [スキャンデータから開始] のワークフローおよび [SIM イオンから開始] のワークフローで記載されていたパラメータと同じでした。MRM から開始した場合のコリジョンエネルギーの最適化の結果は、図 3A に示す [スキャンデータから開始] のワークフローまたは [SIM イオンから開始] のワークフローと類似した方法で示します。ここで更新前のコリジョンエネルギーの値を示す列が追加されます。

		Compound Name	RT (old)	RT (new)	Precursor Ion	Product Ion	CE	Data file path	^
100	☒	Diethyl phthalate	11.233	11.233	149	65	25		
101	☒	Fluorene	11.342	11.342	166.1	165.1	25		
102	☒	Fluorene	11.342	11.342	165.1	163.1	40		
103	☒	Nitroaniline, 4-	11.344	11.344	138	108.1	10		
104	☒	Nitroaniline, 4-	11.344	11.344	108	80	15		
105	☒	Chlorophenyl phenyl ether, 4-	11.349	11.349	204	77	30		
106	☒	Chlorophenyl phenyl ether, 4-	11.349	11.349	141.1	115.1	20		
107	☒	DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	11.385	198	167.9	5		
108	☒	DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	11.385	198	121	10		
109	☒	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	11.461	169.1	168.1	20		
110	☒	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	11.461	168.1	167.1	20		
111	☒	Azobenzene	11.507	11.507	105	77.1	10		
112	☒	Azobenzene	11.507	11.507	77	51	20		
113	☒	Tribromophenol, 2,4,6-	11.582	11.582	329.7	140.8	50		
114	☒	Tribromophenol, 2,4,6-	11.582	11.582	140.9	62	30		
115	☒	4-bromophenyl phenyl ether	11.841	11.841	250	141	20		
116	☒	4-bromophenyl phenyl ether	11.841	11.841	248	141	20		
117	☒	Hexachlorobenzene	11.901	11.901	283.8	213.9	40		
118	☒	Hexachlorobenzene	11.901	11.901	248.9	214	20		
119	☒	Pentachlorophenol	12.095	12.095	265.9	167	35		
120	☒	Pentachlorophenol	12.095	12.095	165	130	30		
121	☒	Phenanthrene-d10	12.285	12.285	188.3	160.2	30		
122	☒	Phenanthrene-d10	12.285	12.285	188.3	158.2	45		
123	☒	Phenanthrene	12.307	12.307	178.1	152.1	30		
124	☒	Phenanthrene	12.307	12.307	176.1	150.1	35		
125	☒	Anthracene	12.355	12.355	178.1	152.1	30		
126	☒	Anthracene	12.355	12.355	178.1	151.1	40		
127	☒	Carbazole	12.512	12.512	167	139	40		
128	☒	Carbazole	12.512	12.512	167	89	60		
129	☒	Di-n-butyl phthalate	12.869	12.869	149	121	15		
130	☒	Di-n-butyl phthalate	12.869	12.869	149	65	30		

図 5. [MRM から開始] のワークフローでの MRM 取り込みメソッドからインポートされたターゲット化合物の MRM トランジションと、元および更新後のリテンションタイムのリストを表示した MRM トランジション表

[MRM から開始] ワークフローは、マトリックス中での分析のメソッドの選択性を強化する場合に、特に有用となることがあります。マトリックス中で決定された最適なコリジョンエネルギーの値は、溶媒中で最適化された値とは異なる可能性があります。

リテンションタイムの更新

SIM および MRM 取り込みメソッドの Optimizer で利用できる [リテンションタイムの更新] 機能は、クロマトグラフィー条件を変更する場合や、リテンションタイムシフトが予測される場合に有用です。ユーザーの介入なしに、リテンションタイムを更新できます。複数の化合物で同じ SIM イオンまたは MRM トランジションを共用する場合は、更新結果の確認を推奨します。図 6A は、5 種類の化合物のリテンションタイムの更新前後の MRM クロマトグラムを示しています。図 6B に、この 5 種類の化合物の元および更新後のリテンションタイムを示します。

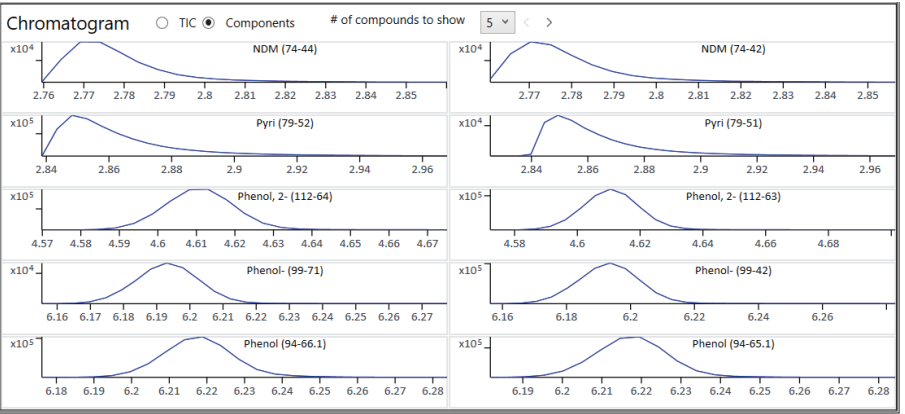
GC/TQ 用 Optimizer ツールの使用により、MRM データ取り込みメソッドの開発での時間を大幅に短縮でき、手作業での確認を減らせます。表 1 に、これまで紹介してきたワークフローに必要な時間およびサンプル注入回数をまとめて示します。

結果の確認とメソッドの保存

コリジョンエネルギーの最適化が完了すると、結果を確認して取り込みメソッドを保存します。図 7A の拡大図に、すべての開発されたトランジションを示します。保存するトップランクの MRM トランジションの数は、Select number of top ranked transitions で数を指定して設定します。チェックを付けた MRM トランジションだけが取り込みメソッドに含まれます。この作業では、すべての開発した MRM トランジションを選択して保存しました。メソッド確認を容易にするために、ネストしたビューで結果を表示できます (図 7B)。

開発された MRM 取り込みメソッドは、タイムセグメント MRM メソッドまたはダイナミック MRM メソッドのいずれかで保存できます (図 8)。メソッドの保存時に、ユーザーは最小ドウェルタイムと 1 秒間あたりのサイクル数を定義します。また、開発したトランジションを .CSV ファイルとしてエクスポートできます。

A



B

Compound Name	RT (old)	RT (new)
NDMA	2.770	2.769
NDMA	2.770	2.769
Pyridine	2.861	2.848
Pyridine	2.861	2.848
Phenol, 2-fluoro-	4.607	4.611
Phenol, 2-fluoro-	4.607	4.611
Phenol-d6	6.189	6.194
Phenol-d6	6.189	6.194
Phenol	6.215	6.219
Phenol	6.215	6.219
Aniline	6.235	6.240

図 6. リテンションタイム更新前後の 5 種類の化合物の MRM クロマトグラム (A) および各化合物の元および更新後のリテンションタイム (B)

表 1. 8270 フルミックス最適化に必要な時間とサンプル注入の回数

ワークフロー	今回の作業で必要となった注入数*	時間**
スキャンデータから開始	12	6 時間
SIM イオンから開始	11	5.5 時間
MRM から開始	4	2 時間
タイムセグメントウィンドウ内の小さなシフトのためのリテンションタイムの更新	1	0.5 時間
大きなシフトのためのリテンションタイムの更新	6	3 時間

* 表内の数値は今回の 8270 調査に限定されます。共溶出化合物間の干渉が少ない場合は注入回数も少なくなります。1 化合物あたりのプリカーサが増えると、プロダクトイオンスキャンに対してより多くの注入が必要です。
** 機器のサイクル時間は 30 分でした。

A

Optimized MRM Transitions

Select number of top ranked transitions: All Left RT Delta (min): 0.20 Right RT delta (min): 0.20 Overwrite RT Delta

☐ Nested View

	Compound Name	RT (min)	Precursor Ion	MS1 Resolution	Product Ion	MS2 Resolution	CE	Abundance	%	CAS #	Formula	Molecular Weight	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	Sample Position	Injection Volume (μL)
233	☒ DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	198	Unit	120.1	Unit	15	56,856.34	1.00				0.10	0.14	2	1
234	☒ DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	198	Unit	120.5	Unit	15	52,526.46	0.92				0.10	0.14	2	1
235	☒ DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	198	Unit	119.55	Unit	10	51,265.01	0.90				0.10	0.14	2	1
236	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	168.1	Unit	139.35	Unit	35	434,381.53	1.00				0.10	0.10	2	1
237	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	169.1	Unit	139.48	Unit	35	260,821.55	0.60				0.10	0.10	2	1
238	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	169.1	Unit	64.94	Unit	35	238,973.06	0.55				0.10	0.10	2	1
239	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	168.1	Unit	64.36	Unit	35	230,751.62	0.53				0.10	0.10	2	1
240	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	168.1	Unit	65.9	Unit	35	175,412.81	0.40				0.10	0.10	2	1
241	☒ Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	169.1	Unit	65.6	Unit	35	149,990.39	0.35				0.10	0.10	2	1

B

Optimized MRM Transitions

Select number of top ranked transitions: All Left RT Delta (min): 0.20 Right RT delta (min): 0.20

☒ Nested View

	Compound Name	RT (min)	Left RT Delta (min)	Right RT delta (min)	CAS #	Formula	Molecular Weight	Sample Position	Injection Volume (μL)
54	DNOC (2-methyl-4,6-dinitrophenol)	11.385	0.10	0.14				2	1
	Precursor Ion	Abundance							
	198.00								
	Product Ion	Abundance	%	CE					
	120.10	56,856.34	1.00	15.00					
	120.50	52,526.46	0.92	15.00					
	119.55	51,265.01	0.90	10.00					
55	Nitrosodiphenylamine, N-	11.461	0.10	0.10				2	1
56	Azobenzene	11.507	0.10	0.10				2	1

図 7. MRM トランジション最適化の結果の拡大図 (A) とDNOC 結果をネストしたビュー (B)

Create Method

Cycles per second: 5

Min dwell (ms): 10

Method folder: C:\Users\andriano\Documents\MassHunter\GCMS\1\met Browse...

Method name: 8270_MRM-Optimized

Create MRM method Create dMRM method Close

図 8. GC/TQ 用 Agilent MassHunter Optimizer によるメソッドの作成

開発して最適化した MRM 取り込みメソッドは半揮発性化合物の分析に効果的に使用できました。US EPA 8270E の性能要件を満たしており、他の文献でも成果が紹介されています。²

結論

MRM 取り込みの高度に自動化された最適化ツールを用いて、4 つのワークフローを実現できました。GC/TQ 用 MassHunter Optimizer を紹介し、83 の半揮発性ターゲット化合物を含む複合物のフルミックス US EPA 8270 用の MRM メソッド開発について解説しました。8270 フルミックス (AccuStandard) を使用して、プロセスを調査し、共溶出の影響を評価しました。4 つのワークフローは、スキャン、SIM、MRM などの異なる取り込みメソッドで開始しました。スキャンデータおよび SIM イオンから開始する場合は、MRM トランジションを開発しコリジョンエネルギーを最適化しました。EPA 8270 MRM メソッドの自動作成により、Optimizer を用いて GC/MSD SIM から適切に移管できました。MRM 取り込みメソッドから開始する場合は、ターゲット化合物のリテンションタイムを更新し、コリジョンエネルギーを再最適化しました。最適化した結果は、dMRM 取り込みメソッドとして保存しました。

参考文献

1. Churley, M.; Szelewski, M.; Quimby, B. 5977 イナートプラス GC/MSD による EPA 8270 の再最適化およびキャリブレーション範囲の拡大. Agilent Technologies application note, publication number 5994-0350JAJP, **2018**.
2. Churley, M.; Quimby, B.; Andrianova, A. 7000 シリーズトリプル四重極 GC/MS による MRM モードでの EPA 8270D/E 用高速メソッド. Agilent Technologies application note, publication number 5994-0691JAJP, **2019**.

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. 2020
Printed in Japan, June 22, 2020
5994-2086EJAJP
DE.784722222