

測定困難なマトリックスにおける PAH の GC/MS/MS 分析の最適化

Agilent 8890/7000D トリプル四重極 GC/MS、JetClean、
ミッドカラムバックフラッシュ

著者

Anastasia A. Andrianova,
and Bruce D. Quimby,
Agilent Technologies, Inc.

概要

Agilent 8890 GC と Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS システムを組み合わせ使用し、多環芳香族炭化水素 (PAH) の分析を行いました。適切な機器の構成と使用条件を選択することにより、測定困難なマトリックス中の PAH の堅牢な分析が可能になります。ミッドカラムバックフラッシュ、水素による連続的なイオン源クリーニング (JetClean)、代替ドローアウトレンズの使用により、1 ~ 1,000 pg のキャリブレーション範囲で優れた直線性が示されました。有機物濃度の高い土壌からの抽出物の繰り返し注入において、システムの精度と堅牢性が実証されました。また、MS よりも優れた MS/MS の選択性によってデータ確認が容易になります。

はじめに

PAH は水生生物に対して有害であり、人間に対する発がん性が疑われています。複数の発生源があるため、汚染物質として世界中に広く分布しています。

PAH の発生源は次の 3 つです。

- **石油由来:** 化石燃料に関連する石油材料から生じるもの
- **火成:** 燃焼源から生じるもの
- **生物由来:** 自然の生物学的プロセスから生じるもの

PAH は至る所に存在しており、海産物、食用油、燻製肉など多くの食品で微量汚染物質としてモニタリングされます。また、空気、水、および土壌などの環境内でもモニタリングされます。PAH の分析には HPLC/UV、GC/FID、GC/MS、GC/MS/MS など複数の手法が用いられています。

このアプリケーションノートでは、GC/MS/MS の MRM モードに焦点を当てています。一般的なキャリブレーション範囲は 1 ~ 1,000 pg で、許容可能な直線性は $R^2 > 0.99$ です。通常、内部標準 (ISTD) の面積再現性は標準溶液については $\pm 20\%$ に指定され、サンプルについては $\pm 30\%$ に指定されます。

PAH の特性のため、分析では多くの問題が生じます。これらは分子量から沸点範囲まで多岐にわたります。PAH は活性が低いものや分解されにくいとされているものでも、表面に吸着しやすい傾向があります。PAH は凝結 (気体から固体への相転移) しやすく、気化させるのが困難です。高温にし、表面の接触を最小限にすることが重要です。溶出の遅い化合物ではピークテーリングがよく見られ、マニュアル積分が必要になったりデータ確認に時間がかかったりします。場合によっては、ISTD レスポンスがキャリブレーション範囲で不均一になり、メソッドの直線性に問題が生じることがあります。

PAH に関連する問題に加えて、分析ではマトリックスに関連する問題も頻繁に生じます。例えば、食品分析や土壌分析では、分析後に溶出する高沸点のマトリックスによる汚染があり、その後の分析のゴーストピークを回避するために長時間の焼き出しが必要になる場合があります。最も沸点の高い汚染物質がカラムヘッドに堆積し、頻繁なカラムトリミングや、リテンションタイムのシフトの発生による MRM およびデータ分析時間帯の調整が必要になることがあります。

実験方法

使用するシステムの構成は、高マトリックスサンプル中の PAH の分析時の潜在的な問題が最小限になるように行いました。使用した重要な手法は次のとおりです。

- **MS/MS:** GC/MS/MS の MRM モードの選択性が優れているため、マトリックスからの干渉レスポンスが低減または排除され、高マトリックスサンプル中のデータ確認を GC/MS より容易に行うことができます。干渉レスポンスがあるときは多くの場合、定量イオンまたは確認イオンのマニュアル積分が必要になります。
- **JetClean:** Agilent 7000D トリプル四重極 GC/MS システムでは、このオプションを使用して分析中に低流量の水素 (0.33 mL/min) を連続的にイオン源に供給することができます。イオン源を水素で連続的にクリーニングすると、検量線の直線性と PAH 分析中のレスポンス精度が大幅に向上することが実証されています^{1~3}。特に高マトリックスサンプルにおいて、マニュアルでのイオン源クリーニングを大幅に減らすことができます。

- **9 mm エクストラクタレンズ:** Agilent エクストラクタイオン源は柔軟性が高く、さまざまな分析課題の特定のニーズに適合します。PAH の分析では、PAH が堆積しうる表面が最小限になる 9 mm エクストラクタレンズが最適な選択肢であり、JetClean を用いることで、優れた直線性、精度、ピーク形状が実現します。
- **ミッドカラムバックフラッシュ:** バックフラッシュとは、最後のターゲット化合物がカラムから排出された後にキャリアガスを逆流させる手法です。MS データの収集後、オープンをポストランモードで最終温度に保ち、第 1 カラムからのキャリアガスを逆流させます。この逆流によって、データ収集終了時にカラム内に存在した高沸点化合物がカラムヘッドからスプリットベントラインへ運ばれます。この逆流はアジレントのページ付き Ultimate Union (PUU) が提供する機能です。PUU は挿入されるティであり、この場合は 2 つの同一の 15 m カラムの間に挿入されます。分析中、8890 ニューマティックシステムデバイス (PSD) モジュールからの少量のメークアップキャリアガスで接続部をスイープしました。バックフラッシュ中、PSD からのメークアップ流量が大幅に上昇し、第 1 カラムは逆流、第 2 カラムは MS 側に流れることによって高沸点化合物をスイープしました。この構成の場合、バックフラッシュ時間は 1.5 分でした。
- **8890 PSD モジュール:** PSD はバックフラッシュアプリケーション用に最適化された 8890 ニューマティクスモジュールです。バックフラッシュ中、使用するヘリウム流量が従来の構成より大幅に低減されます。PSD ではシームレスにパルス注入を行うことができ、バックフラッシュの設定が容易です。

図 1 に、使用したシステムの構成を示します。

表 1 と表 2 に、使用した機器の操作パラメータを示します。機器の温度を十分な高さに保ち、最も沸点の高い PAH が堆積しないようにする必要があります。注入口および MSD トランスファーラインは 320 °C に保ちます。MS イオン源は 320 °C 以上に保ちます。

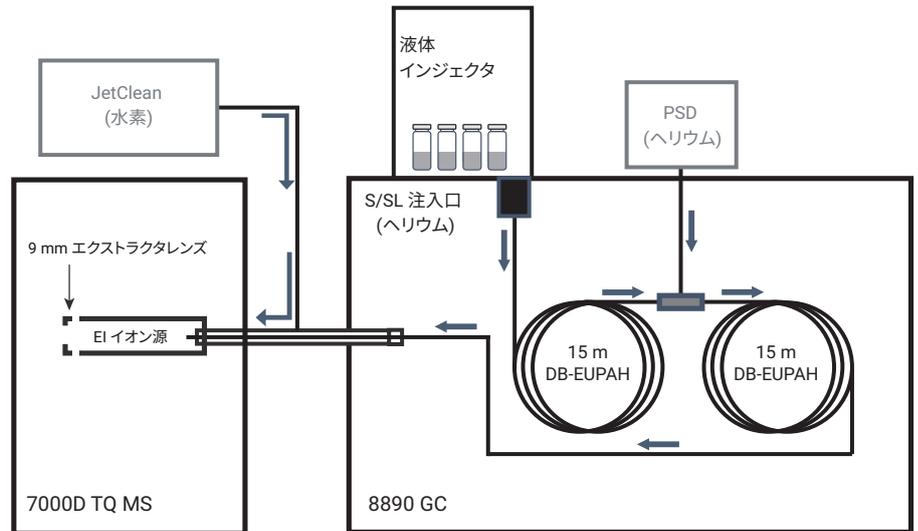


図 1. システム構成

表 1. PAH 分析の GC および MS 条件

8890 GC、高速オープン、オートインジェクタ、およびトレイ	
注入口	EPC スプリット/スプリットレス
モード	パルスドスプリットレス
注入パルス圧力	50 psi、0.7 分間
スプリットベントへのパージ流量	0.75 分で 50 mL/min
セプタムパージ流量モード	標準
注入量	1.0 µL
注入口温度	320 °C
キャリアガス	ヘリウム
注入口ライナ	Agilent 4 mm シングルテーパー、ガラスウール入り (p/n 5190-2293)
オープン	80 °C で 1 分 25 °C/min で 200 °C まで加熱 8 °C/min で 335 °C まで加熱、6.325 分間維持 合計分析時間: 29 分 ポストラン時間: 1.5 分 平衡化時間: 0.5 分
カラム 1	DB-EUPAH、0.25 mm × 15 m、0.25 µm (カスタムオーダー)
コントロールモード	定流量、0.9557 mL/min
注入口接続	スプリット/スプリットレス
出口側接続	PSD (PUU)
ポストラン流量 (バックフラッシュ)	-12.027 mL/min
カラム 2	DB-EUPAH、0.25 mm × 15 m、0.25 µm (カスタムオーダー)
コントロールモード	定流量、1.1557 mL/min
注入口接続	PUU
出口側接続	MSD
ポストラン流量 (バックフラッシュ)	12.518 mL/min

7000D トリプル四重極 GC/MS	
イオン源	不活性エクストラクタ
ドローアウトレンズ	9 mm
チューニングファイル	atunes.ei.tune.xml
モード	MRM
溶媒ディレイ	4 分
EM 電圧ゲインモード	10
四重極温度 (MS1 および MS2)	150 °C
イオン源温度	320 °C
トランスファーライン温度	320 °C
JetClean モード	測定とクリーニング
JetClean 水素流量	0.33 mL/min

特に重い PAH のカラムへの移送を最大化するため、パルスドスプリットレス注入を使用します。ガラスウール入りで内径 4 mm のストレートライナが必須です。ウールによって熱が PAH に伝わり、注入口ベースに直接接触しなくなります。PAH が注入口ベースで凝結すると、PAH の気化とカラムへの流入が難しくなります。

Agilent PAH アナライザキャリブレーションキット (p/n G3440-85009) をイソオクタンで希釈して、PAH 標準溶液を調製しました。このキットには 27 種の PAH の原液 10 µg/mL と 5 種の ISTD の原液 50 µg/mL が含まれます。1、2、10、20、100、200、1,000 pg/µL の 7 つのキャリブレーションレベルを用意しました。各レベルに ISTD 500 pg/µL も含まれています。化合物の同定については、表 2 および図 2 を参照してください。

スゲ泥炭サンプル (Garden Magic、Michigan Peat Company、テキサス州ヒューストン) を 120 °C で一晩乾燥させました。乾燥泥炭 5 g をジクロロメタン/アセトン (1:1 v:v) 30 mL を用いて一晩攪拌し、抽出しました。抽出物をろ過し、ろ液を蒸発させて容量を 7.5 倍濃縮しました。生成された抽出物を堅牢性の実験に使用しました。

表 2. 定量および定性に用いる MRM トランジション

名前	RT	定量	CE	定性	CE
ナフタレン-d8	5.041	136.0 → 136.0	19		
ナフタレン	5.067	128.0 → 102.0	22	128.0 → 127.0	20
1-メチルナフタレン	5.693	142.0 → 115.0	30	142.0 → 141.0	30
2-メチルナフタレン	5.864	142.0 → 115.0	30	142.0 → 141.0	30
ビフェニル	6.249	154.0 → 152.0	25	154.0 → 153.0	25
2,6-ジメチルナフタレン	6.285	156.0 → 115.0	30	156.0 → 141.0	30
アセナフチレン	6.986	152.0 → 150.0	40	152.0 → 151.0	40
アセナフテン-d10	7.095	162.0 → 160.0	19		
アセナフテン	7.149	154.0 → 152.0	40	153.0 → 152.0	40
2,3,5-トリメチルナフタレン	7.361	170.0 → 155.0	25	170.0 → 153.0	25
フルオレン	7.858	166.0 → 165.0	30	166.0 → 163.0	34
ジベンゾチオフェン	9.618	184.0 → 139.0	40	184.0 → 152.0	40
フェナントレン-d10	9.819	188.0 → 188.0	19		
フェナントレン	9.879	178.0 → 176.0	34	178.0 → 152.0	30
アントラセン	9.940	178.0 → 176.0	34	178.0 → 152.0	30
1-メチルフェナントレン	11.217	192.0 → 191.0	25	192.0 → 165.0	30
フルオランテン	12.882	202.0 → 200.0	50	202.0 → 201.0	50
ピレン	13.692	202.0 → 200.0	50	202.0 → 201.0	30
ベンゾ(a)アントラセン	17.145	228.0 → 226.0	38	228.0 → 224.0	38
クリセン-d12	17.309	240.0 → 236.0	25	118.0 → 116.0	25
クリセン	17.400	228.0 → 226.0	38	228.0 → 224.0	38
ベンゾ(b)フルオランテン	20.379	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(k)フルオランテン	20.445	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(j)フルオランテン	20.543	252.0 → 250.0	42	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(e)ピレン	21.412	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ベンゾ(a)ピレン	21.549	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ペリレン-d12	21.806	264.0 → 260.0	40	264.0 → 236.0	25
ペリレン	21.884	252.0 → 250.0	40	250.0 → 248.0	40
ジベンズ(a,c)アントラセン	24.347	278.0 → 276.0	38	276.0 → 274.0	38
ジベンズ(a,h)アントラセン	24.474	278.0 → 276.0	38	276.0 → 274.0	38
インデノ(1,2,3-cd)ピレン	24.504	276.0 → 274.0	42	138.0 → 124.0	30
ベンゾ(ghi)ペリレン	25.644	276.0 → 274.0	42	274.0 → 272.0	42

結果と考察

初回キャリブレーション

図 2 は標準溶液 100 pg の MRM TIC です。選択したパラメータでは、すべての PAH について良好なピーク形状が得られ、特に最後の PAH が非常に良好なピーク形状になりました。

9 mm レンズと水素による連続的なクリーニングを使用すると、多くの場合 S/N 比がある程度低下するため、必要な最低キャリブレーションレベルを確認することが重要です。例えば、図 3 は 1 pg レベルの複数の化合物の定量イオンにおけるレスポンスを示しています。1 pg レベルのすべてのターゲット化合物がキャリブレーションに十分な信号を示しています。

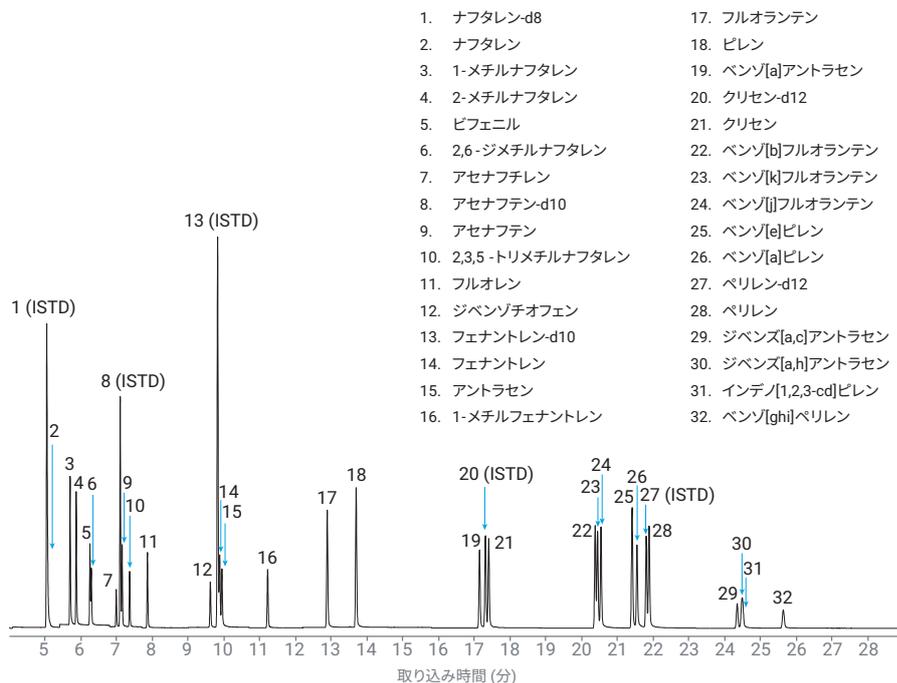


図 2. 100 pg 標準混合液の MRM TIC

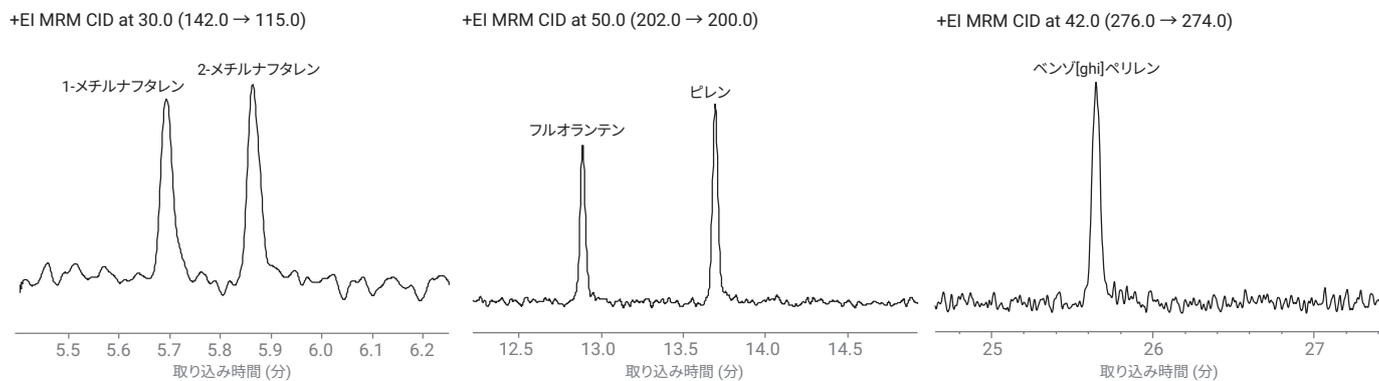


図 3. 選択化合物の最低濃度標準溶液 (1 pg) の MRM 定量イオンのレスポンス

表 3 に、1 ~ 1,000 pg の 7 つのレベルにおけるシステムの 4 種の ISTD キャリブレーションの R² 値を示します。すべてのターゲット化合物が範囲全体で優れた直線性を示しています。最初の 2 つのキャリブレーションが初回のもので、後の 2 つが 100 ppb 標準を 60 回測定した後のものです。これらのデータがこの構成のシステムの直線性とレスポンスの安定性を実証しています。

レスポンスの安定性

図 4 は 100 pg 標準の 120 回連続繰り返し分析における複数のターゲット化合物の算出濃度を示しています。システムのレスポンスの優れた安定性が示されています。全 27 種のターゲット化合物の 120 回の注入における算出濃度の平均 RSD は 1.5 % です。

120 回の注入における ISTD の生の面積の RSD は次のとおりでした。

- ナフタレン-d₈ (2.9 %)
- アセナフテン-d₁₀ (3.2 %)
- フェナントレン-d₁₀ (2.9 %)
- クリセン-d₁₂ (4.7 %)
- ペリレン-d₁₂ (5.1 %)

表 3. 7 つのレベルの ISTD キャリブレーションの R² 値 (1 ~ 1,000 pg の MRM)。キャリブレーション 1 および 2 は初回のもので、キャリブレーション 3 および 4 は 100 pg 標準を 60 回測定した後に実行

化合物	キャリブレーション 1	キャリブレーション 2	キャリブレーション 3*	キャリブレーション 4*
ナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
1-メチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998
2-メチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9998
ピフェニル	0.9999	0.9998	0.9999	0.9998
2,6-ジメチルナフタレン	0.9998	0.9998	0.9998	0.9997
アセナフチレン	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999
アセナフテン	0.9999	0.9999	0.9999	1.0000
2,3,5-トリメチルナフタレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
フルオレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
ジベンゾチオフェン	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999
フェナントレン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
アントラセン	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999
1-メチルフェナントレン	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998
フルオランテン	0.9997	0.9999	0.9999	0.9999
ピレン	0.9998	0.9999	0.9998	0.9998
ベンゾ(a)アントラセン	0.9998	0.9998	0.9999	0.9999
クリセン	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
ベンゾ(b)フルオランテン	0.9996	0.9996	0.9996	0.9997
ベンゾ(k)フルオランテン	0.9997	0.9996	0.9998	0.9995
ベンゾ(j)フルオランテン	0.9992	0.9999	1.0000	0.9985
ベンゾ(e)ピレン	0.9996	0.9998	0.9998	0.9999
ベンゾ(a)ピレン	0.9994	0.9996	0.9995	0.9997
ペリレン	0.9995	0.9996	0.9995	0.9996
ジベンズ(a,c)アントラセン	0.9996	1.0000	0.9996	0.9993
ジベンズ(a,h)アントラセン	0.9994	0.9995	0.9997	0.9996
インデノ(1,2,3-cd)ピレン	0.9994	0.9994	0.9996	0.9996
ベンゾ(ghi)ペリレン	0.9997	0.9998	0.9998	0.9998

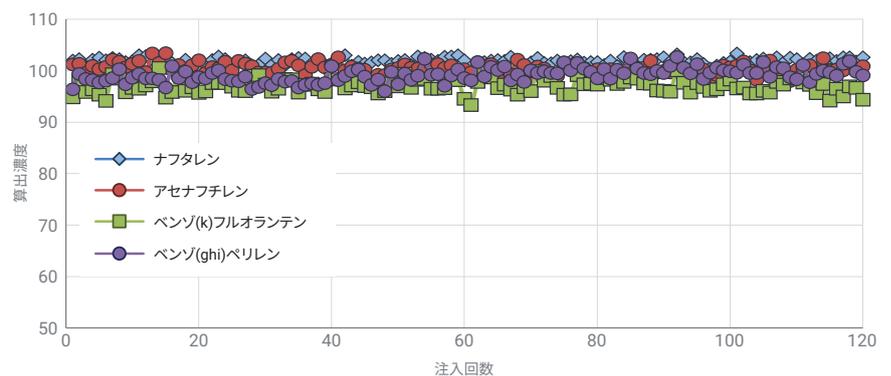


図 4. 100 pg 標準溶液の 120 回連続注入における算出濃度の安定性

土壌抽出物におけるレスポンスの安定性

堅牢性テストで使用する土壌抽出物には、システムでの測定が難しい高マトリックスが含まれるものを意図的に選びました。図 5 は 100 pg の PAH 標準でスパイクした抽出物および 500 pg の ISTD のスキャン TIC と、比較対象として 100 pg の PAH 標準のスキャン TIC を示しています。土壌抽出物には非常に高いレベルのマトリックスが含まれています。なお、このようなレベルの有機物を含む土壌の場合、ルーチン分析では追加のサンプルクリーンアップを検討する必要があります。使用したサンプル前処理法はテストのみを目的としています。

システムの堅牢性をテストするため、土壌抽出物を 27 種のターゲット化合物各 100 pg、ISTD 各 500 pg でスパイクしました。次に、スパイクした抽出物を 60 回注入しました。測定ごとに溶媒ベースの検量線に対して PAH を定量し、算出された濃度をプロットしました。図 6 は複数のターゲット化合物の算出濃度を示しています。ナフタレンとベンゾ[ghi]ペリレンはいずれもスパイクされた 100 pg レベルよりも高い濃度測定値を示しています。これらの化合物はおおよそ図 7 のオフセットに相当するレベルで土壌内に存在していることがわかりました。ペリレン (ここには示されていません) はおおよそ 200 pg 土壌内に存在していることがわかりました。

27 種すべてのターゲット化合物の算出濃度の平均 RSD は 4.1 % でした。27 種中 25 種のターゲット化合物で、60 回の土壌分析後の算出濃度が最初の注入算出濃度の 20 % 以内のずれでした。予想どおり、ベンゾ[ghi]ペリレンなどの最も重いターゲット分析物のレスポンスは最も早く失われました。

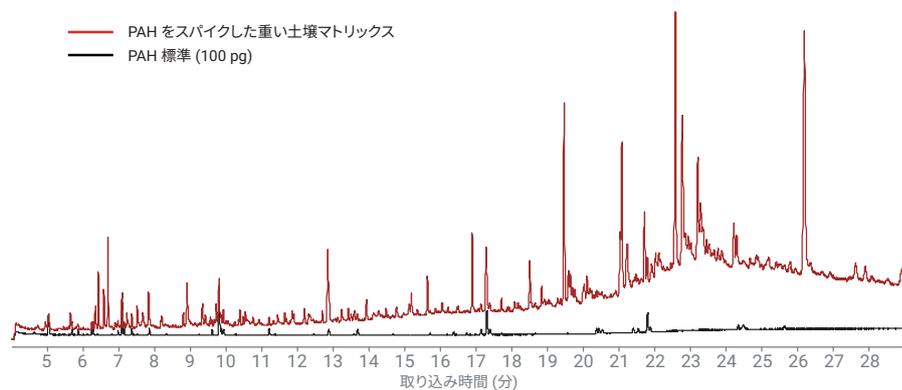


図 5. 土壌抽出物および PAH 標準 100 pg と ISTD 500 pg のスキャン TIC を両方同じ目盛りで示したものの、抽出物中の多くの物質が示されている

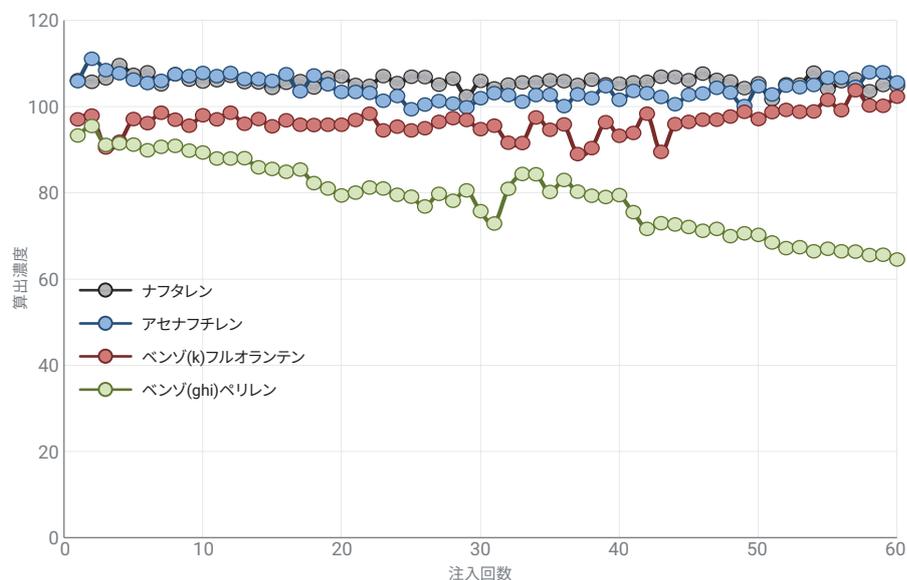


図 6. 100 pg の PAH 標準でスパイクした土壌マトリックスと 500 pg の ISTD の 60 回注入における算出濃度の安定性

土壌抽出物を 60 回注入した後、注入口メンテナンスを実施しました。このメンテナンスではセプタム、注入口ライナ、ゴールドシールを交換し、カラム 1 のヘッドから 30 cm を除去しました。ライナとゴールドシールを取り外している間に、メタノールを染み込ませた綿棒で注入口を清掃しました。メンテナンス後、標準溶液 100 ppb を測定し、2 回の繰り返し実験前に作成した元の検量線を用いて定量しました。表 4 に、濃度測定値を示します。すべてのターゲット化合物が予想された値の 12 % 以内に収まっていました。表 4 に、注入口メンテナンス後のフルキャリブレーションの R^2 値を示します。表 4 のデータは、この土壌におけるシステム性能の低下が予想どおり注入口とカラムヘッドに限られることを示しています。

イオン源のクリーニングは不要でした。使用したようなマトリックスレベルではこのようになることがよくあります。JetClean と 9 mm ドローアウトレンズを使用すると、イオン源の性能を通常大きく低下させる堆積が大幅に減ります。

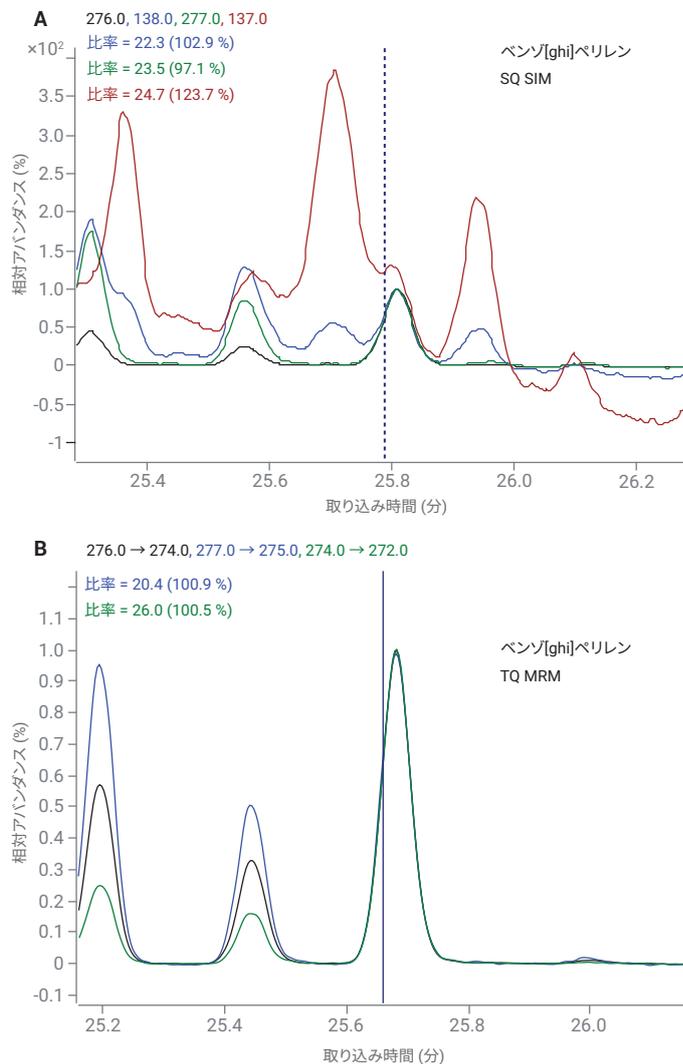


図 7. 土壌抽出物中にスパイクした100 ppb の PAH の定量クロマトグラムと定性クロマトグラムの重ね表示。A) ベンゾ[ghi]ペリレン、シングル四重極 GC/MS の SIM モード。B) 同じ抽出物、GC/MS/MS の MRM モード

MRM の選択性

PAH はシングル四重極 GC/MS で正常に分析できることが多いのに対し⁴、土壌などのマトリックスはターゲット化合物とのスペクトル干渉のためにデータ確認が困難になる場合があります。これらの干渉がある場合、干渉の影響を考慮するためのマニュアル積分が必要になることがよくあります。GC/MS/MS を使用するとこれらの干渉が大幅に減少します。図 7 を参照してください。上の部分はシングル四重極でのベンゾ [ghi] ペリレンの SIM の定量イオンと 3 つの確認イオンと重ね描きを示しており、下の部分はトリプル四重極の MRM のものを示しています。

GC/MS クロマトグラムでは、確認イオンの 1 つ (277) には比較的干渉がありません。他の 2 つの確認イオン (138 および 137) には大きなマトリックス干渉があり、マニュアル積分が必要になると考えられます。一方、GC/MS/MS MRM (B) は選択性がかなり優れており、データ確認が非常に簡単です。

結論

このシステムは GC/MS PAH 分析で生じる多くの問題に対応できます。GC/MS/MS を用いることでマトリックスからのスペクトル干渉時の選択性が大幅に向上し、GC/MS に比べてデータ確認が容易になります。JetClean、9 mm ドローアウトレンズ、高いゾーン温度、適切なライナを用いることで、直線性、ピーク形状、システムの堅牢性が大きく向上します。JetClean とバックフラッシュによってマニュアルでのイオン源クリーニングとカラムトリミングの必要性が大幅に減少し、ラボの生産性の向上が実現します。

表 4. キャリブレーションチェックおよび 7 つのレベルの ISTD キャリブレーションの R² 値 (システムメンテナンス後の 1 ~ 1,000 pg の MRM)

化合物	再キャリブレーション前のキャリブレーション用標準液 100 pg の算出濃度	メンテナンス後のキャリブレーション
ナフタレン	99	1.0000
1-メチルナフタレン	96	1.0000
2-メチルナフタレン	98	1.0000
ビフェニル	94	1.0000
2,6-ジメチルナフタレン	93	1.0000
アセナフチレン	99	1.0000
アセナフテン	98	1.0000
2,3,5-トリメチルナフタレン	98	1.0000
フルオレン	97	1.0000
ジベンゾチオフェン	90	1.0000
フェナントレン	96	1.0000
アントラセン	105	1.0000
1-メチルフェナントレン	96	1.0000
フルオランテン	97	1.0000
ピレン	97	1.0000
ベンゾ[a]アントラセン	95	0.9999
クリセン	96	1.0000
ベンゾ[b]フルオランテン	97	1.0000
ベンゾ[k]フルオランテン	99	1.0000
ベンゾ[j]フルオランテン	112	1.0000
ベンゾ[e]ピレン	94	1.0000
ベンゾ[a]ピレン	96	1.0000
ペリレン	94	1.0000
ジベンズ[a,c]アントラセン	96	0.9999
ジベンズ[a,h]アントラセン	94	1.0000
インデノ[1,2,3-cd]ピレン	95	1.0000
ベンゾ[ghi]ペリレン	94	1.0000

参考文献

1. Szelewski, M.; Quimby, B. D. Optimized PAH Analysis Using the Agilent Self-Cleaning Ion Source and Enhanced PAH Analyzer, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5191-3003EN, **2013**.
2. Modified ion source triple quadrupole mass spectrometer gas chromatograph for polycyclic aromatic hydrocarbons”, Kim A. Anderson, Michael J. Szelewski, Glenn Wilson, Bruce D. Quimby, Peter D. Hoffman, *Journal of Chromatography A* **2015**, 1419(6), 89-9US.
3. Quimby, B. D.; Prest, H. F.; Szelewski, M. J.; Freed, M. K. *In-situ* conditioning in mass spectrometer systems, *US Patent 8,378,293*, **2013**.
4. Andrianova, A. A.; Quimby, B. D. Optimized GC/MS Analysis for PAHs in Challenging Matrices, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0499EN, **2019**.

ホームページ

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

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 12, 2018

5994-0498JAJP