

デコンボリューションによる 高速かつ正確な EPA 8270 の定量

アプリケーション

環境

著者

Mike Szelewski and Chinkai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Jin Yang, Dawei Zhang, and James Xue
SGS Shanghai
Environmental Services
3rd Building, 889 Yishan Rd.
Shanghai 200233
China

概要

環境試料での GC/MSD による半揮発性物質の分析は、マトリックスの干渉により困難なものになる場合があります。AMDIS と連携した半揮発性物質ライブラリやデコンボリューションデータベースを使用すると、スペクトルやターゲットイオンをクリーンにすることが可能です。デコンボリューションされたターゲットイオンのフルスペクトルと定量結果は、使い慣れた QEdit の画面上で比較できます。サンプルの同定や定量の結果は、Agilent MSD ChemStation ソフトウェアやデコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) を使用して比較します。



Agilent Technologies

はじめに

EPA 8270 半揮発性物質分析は、世界で最も広く使用されている GC/MS メソッドの 1 つです。このメソッドは、土壌や水に含まれる酸性、アルカリ性、および中性物質を分析するために開発された分析法です。通常、対象化合物数は、内部標準溶液やサロゲート溶液を含めて 160 ~ 250 種類になります。SGS Shanghai では、毎年 5,000 試料を超える数の半揮発性物質の分析をしています。サンプルマトリックス (バックグラウンドのイオン干渉) が複雑であるため、発見された対象化合物の確認や正確な定量結果を取得するという作業は、通常、時間のかかる煩雑な仕事です。

本研究の目的は、デコンボリューションレポート作成ソフトウェア (DRS) の使用によるデータ確認作業の簡略化とピーク同定能力の強化を通じて分析作業の生産性を高めることにあります [1、2]。Agilent G1716AA DRS は、Agilent GC/MSD ChemStation の分析結果を NIST の自動質量スペクトルデコンボリューション/同定システム (AMDIS) および付属の質量スペクトル検索プログラムによって処理し、読みやすいレポートにまとめることのできるアプリケーションです。

複雑なマトリックスのトータルイオンクロマトグラム (TIC) を分析する際には、こうした「デコンボリューション」処理を施すことにより、スペクトルの判読にかかる時間を大幅に短縮できます。また、デコンボリューション処理で干渉イオンやバックグラウンドイオンを排除しておけば、「きれい」なイオンで定量が行えるようになるため、分析結果の信頼性も高まります。

実験

試料前処理

土壌および堆積物試料 (メカニカルシェーカー)

- 堆積物試料の上に水の層がある場合には、その水の層を廃棄します。木の枝、葉、石などの異物を取り除きます。ウェットなサブ試料を (採取時の状態のまま) 0.5 ~ 20 g 計量し、250 mL の Schott ボトルに入れます。
- 非多孔性サンプルやウェットな試料は、薬さじを使って 20 g の無水硫酸ナトリウムと混ぜ合わせておく必要があります。必要に応じて硫酸ナトリウムの量を増やしても構いません。硫酸ナトリウムを添加後、試料が自由に流動できる状態になっていなければなりません。
- 250 μ L のサロゲート溶液 (100 ng/ μ L) を、試料、スパイク添加試料、QC 試料、ブランク試料のすべてに加えます。

- スパイクを添加する各バッチの試料には、250 μ L のマトリックススパイク溶液 (100 ng/ μ L) を加えます。
- すぐに 100 mL のジクロロメタン (DCM)/アセトン (体積比 1:1) を加え、メカニカルシェーカーにかけて 200 rpm で 2 時間振とうします。
- 抽出液をクデルナダニッシュ (KD) 濃縮器で 5 mL に濃縮します。サンプル 200 μ L を計量し、全量 2 mL の GC オートサンブラ用バイアルへ移します。5 μ L の内部標準溶液 (200 μ g/mL) を加えて溶液の濃度を 5 μ g/mL にします。テフロン被覆キャップでバイアルを密封し、軽く攪拌して GC/MS にかけます。

水質試料 (液/液抽出)

- 1 L の水質試料を 2 L のファネルに取り、pH をチェックして、必要であれば、1:1 (体積比) の硫酸または 10N の水酸化ナトリウムで pH 6 ~ 8 に調整します。50 μ L のサロゲート原液標準溶液 (100 μ g/mL) を各試料に加えてよく攪拌します。
- マトリックススパイク試料として使用する各バッチの試料には、50 μ L のマトリックススパイク標準溶液を加えます。
- 50 g の NaCl を加えて 60 mL の DCM で抽出し、pH を 2 未満に調整して 60 mL の DCM でもう一度抽出します。
- 各抽出液を混ぜ合わせて、クデルナダニッシュ (KD) 濃縮器で 1 mL に濃縮します。試料 200 μ L を計量し、全量 2 mL の GC オートサンブラ用バイアルへ移します。5 μ L の SVOC 内部標準溶液 (200 μ g/mL) を加えて溶液の濃度を 5 μ g/mL にします。テフロン被覆キャップでバイアルを密封し、軽く攪拌して GC/MS にかけます。

機器のパラメータ

GC/MS の設定パラメータを表 1 に示します。

デコンボリューション

GC/MS におけるデコンボリューションは、重なり合った質量スペクトルを切り離して個々の成分の「きれい」なスペクトルを切り出すための数学的な手法です。図 1 は、スペクトルのデコンボリューションを簡略化したイラストです。この図の左側には、TIC と頂点スペクトルが示されています。複雑なマトリックスでは、ピークが、複数の重なり合った成分とマトリックスのバックグラウンドイオンから構成されている可能性もあります。つまり、実際には、頂点スペクトルはそうした構成要素を複合したものになります。質量スペクトルライブラリの検索では、不十分な一致物質を拾い出せばいい方で、複合スペクトルの個々の構成成分をすべて特定するというようなことは到底できません。

表1. GC と MSD の使用パラメータ

| | | | |
|-------------|---|--|-----------------------|
| GC | Agilent 6890 | 分析時間 | 40 min |
| 注入口 | EPC スプリット/スプリットレス | オープン平衡時間 | 0.5 min |
| モード | スプリットレス、1.0 µL 注入 (10 µL シリンジ、p/n 5181-1267) | サーマル AUX 2 | MSD トランスファーライン、280 °C |
| 注入口温度 | 300 °C | MSD | Agilent 5975 MSD |
| 圧力 | 48 kPa | チューニングファイル | dftpp.u |
| パージ流量 | 100.0 mL/min | モード | SIM/スキャン |
| パージ時間 | 0.75 min | 溶媒ディレイ | 3.80 min |
| トータル流量 | 56.5 mL/min | EM 電圧オフセット | 200 V |
| セプタムパージ | 3 mL/min | 低質量 | 35 amu |
| ガスセーバ | オン | 高質量 | 550 amu |
| セーバ流量 | 20 mL/min | スレッシュホールド | 150 |
| セーバ時間 | 2 min | サンプリング | 2 |
| ガスの種類 | ヘリウム | 四重極温度 | 150 °C |
| ライナ | 4 mm、p/n 5181-3316 | イオン源温度 | 230 °C |
| ライナO-リング | テフロン加工、p/n 5188-5365 | ソフトウェア | |
| セプタム | 高性能グリーン、11 mm、p/n 5183-4759 | GC/MSD ChemStation G1701EA rev E.02.00.493 | |
| カラムフェーラル | 内径 0.4 mm ベスベル/グラフアイト 85%/15%、p/n 5181-3323 | デコンボリューションレポート作成ソフトウェア G1716AA rev A.04 | |
| カラム | Agilent J&W DB-5ms、p/n 122-5532 | 半揮発性物質 DRS Database G1677AA rev A.01 (273 化合物) | |
| 長さ | 30.0 m | NIST08 Search Engine および Library (AMDIS 2.66、build 121.68 付属) | |
| 内径 | 0.25 mm | AMDIS の設定 - あらゆるマトリックスのあらゆる化合物を検索できる ような設定グループはありません。本研究で使用したデータセットに ついて最も良い結果が得られたのは、次のような設定です。 | |
| 膜厚 | 0.25 µm | 成分幅 | 24 |
| モード | 定流量 | 隣接ピーク減算 | 1 |
| 初期流量 | 1.0 mL/min | 分離能 | Medium |
| 出口 | MSD | 感度 | High |
| オープン | | ピーク形状 | Low |
| オープン昇温速度 | °C /min 最終温度 (°C) 持続時間 (min) | 最低一致率 | 30 |
| 初期温度 | 40 4 | RI ウィンドウ | 10 |
| 1 段目 | 10 160 1 | レベル | Infinite |
| 2 段目 | 10 280 4 | 最高ペナルティ | 100 |
| 3 段目 | 10 300 5 | | |

デコンボリューション処理では、最初に、四重極質量スペクトルに特有のスペクトルの歪みが矯正され、各クロマトグラフピークの正確な頂点リテンションタイム (RT) が決定されます。次に、アバダンスの上下動のタイミングと RT の違いによってイオンがグループ分けされます。図 1 に示すように、デコンボリューション処理により、重なり合った各成分の「きれい」なスペクトルが得られます。こうした「きれい」なスペクトル (AMDIS の用語では「成分 (コンポーネント)」) がライブラリデータと照合されます。この照合は、(3 つのイオン比だけでなく) フルスペクトルに基づいて行われ、RT には左右されません。しかしながら、Agilent GC/MSD システムにはリテンションタイムロッキング機能 (RTL) があるため、AMDIS は、スペクトルの同定後、ロックされた RT との近接性に基づいて各成分の合否を判定できます。同定された対象は、以後の使用に備えてテーブルに保存され、さらに NIST ライブラリでの照合用としても転送されます。

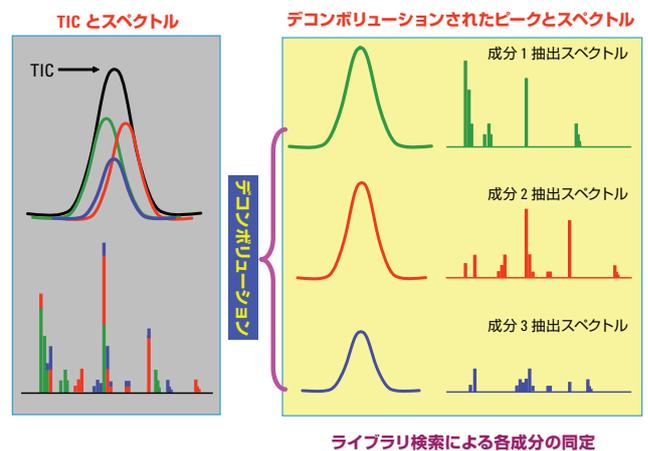


図 1. AMDIS でデコンボリューションされたスペクトルの図

DRSデータベース/ライブラリ

G1677AA 環境半揮発性物質 RTL データベース/ライブラリ (DBL) は、アジレントと NIST/AMDIS のフォーマットによる質量スペクトルライブラリセットです。ライブラリとメソッドには、3種類のセットがあります。8270 セットには、USEPA メソッド 8270 に規定された 243 種類の単一成分半揮発性物質化合物と内部標準溶液に加え、環境分野で関心の高い 30 種類の化合物を追加した合計 273 種類の化合物に関する質量スペクトルとロックされたリテンションタイムが収められています。詳しくは、参考文献 3 をご参照ください。

本研究で使用したシステムでは、DRS データベース/ライブラリに RTL を使用していません。DRS データベース/ライブラリのリテンションタイムは、DRS A.04 改訂版に装備されているメニュー機能を使用して SGS 定量データベースのリテンションタイムで更新しました。これは、すでに確立されているメソッドを使いたいというラボにとっては便利な特徴です。

結果と考察

図 2 は、ある試料から得られた TIC の典型例ですが、非常に複雑なものになっています。DRS は、複合的な試料の同定と定量を行う際の支援ツールとして使用できます。同定/定量作業の過程で、AMDIS によってデコンボリューションされたデータを MSD ChemStation の QEdit 画面にインポートします (図 3 を参照)。

- 1) 画面中央のパネルには全対象成分が一覧表示されます。ChemStation で定量された対象化合物には x が付けられ、DRS-AMDIS で定量された対象化合物には A という印が付けられています。
- 2) 左上のパネルには複数のイオンが重ね書きされます。ここには、すぐに確認できるように、MSD ターゲット (定量) イオン、最大 3 つのクオリファイアイオン、および (A という

印の付いた AMDIS 定量化合物を選択した場合には) AMDIS ターゲット (定量) イオンが表示されます。AMDIS イオンが MSD イオンと重なり合っていないければ、2 種類の化合物が定量されているということを暗示していることとなります。

- 3) 左下のパネルには、3 つのスペクトル - 生のスペクトル、AMDIS でデコンボリューションされたスペクトル、AMDIS ライブラリが表示されます。A という印の付いた AMDIS 定量化合物を選択した場合、または AMDIS ターゲットイオンを手動で積分した場合に、3 つのスペクトル (生の「汚れた」スペクトル、AMDIS のデコンボリューションされた「きれいな」スペクトル、AMDIS ライブラリのスペクトル) のすべてが表示されます。下段の 2 つのスペクトル (デコンボリューションされたスペクトルとライブラリのスペクトル) を見て比較すれば、簡単に一致の良否を判定できます。
- 4) 画面の右上には、定量に使用された MSD ターゲットイオンと、5) AMDIS でデコンボリューション処理されたターゲットイオンが、パネルを分けて表示されます。どちらのパネルでも、定量結果の精度を上げるためにベースラインの再描画 (手動積分) を行うことができます。AMDIS ターゲット (定量) イオンのパネルには、デコンボリューション処理により非常にフラットできれいなベースラインが出ています。これにより、定量値の信頼性を高めることができます。
- 5) 右下のパネルには、MSD と AMDIS のターゲットイオンに関する面積積分値と計算定量値が表示されます。評価が行えるようにクオリファイアイオン比も一覧表示されます。クオリファイアイオン比の設定範囲外のイオン比には # という印が付けられます。

これらの各パネルを見ることにより、デコンボリューションされた化合物の確認や定量結果の比較が簡単に行えるようになっています (詳細については、DRS A.04 のヘルプファイルを参照してください)。

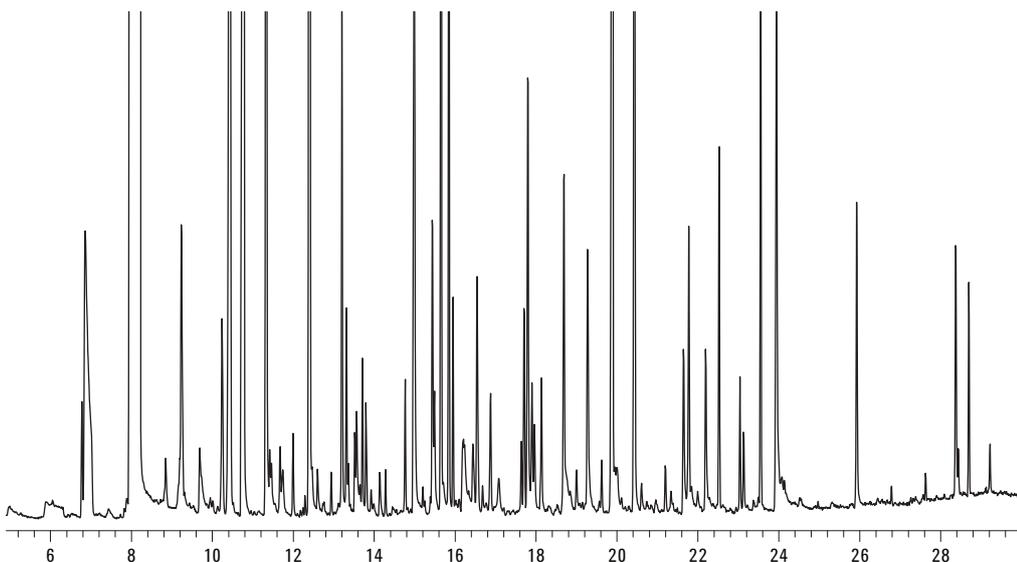


図2. 半揮発性物質試料のトータルイオンクロマトグラム (TIC) の例

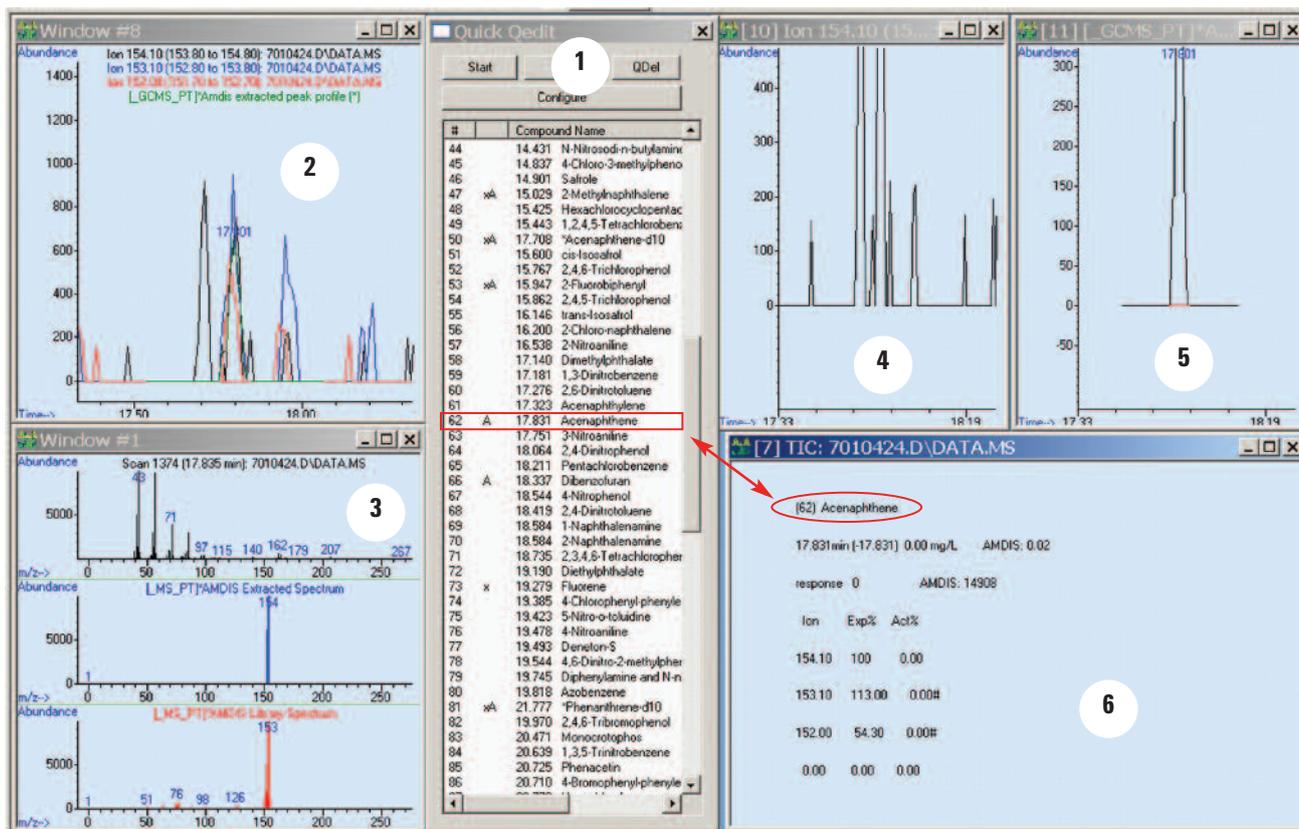


図3. MSD と AMDIS の情報が表示されている QEdit 画面。アセナフテンを例に選択

ある試料の詳細な分析結果を表 2 に示しますが、ここに示した情報は、2 つの別個の DRS レポートから得た情報を組み合わせたものです。最初の 3 つの列 (青色で強調されている部分) には、検出された化合物のリテンションタイム、CAS 番号、化合物名が表示されます。右側の 4 つの列 (緑色で強調されている部分) には、AMDIS 一致率 (デコンボリューションされた化合物と DRS 半揮発性物質データベース/ライブラリとの一致率) 保持時間の差 (AMDIS RT と予想 RT との差) が表示されます。この例では、AMDIS での最低一致率が 30 という低い値に設定されています。これにより、偽陽性の数は若干増えますが、偽陰性の数が最小限に抑えられることになります。右に続く NIST 一致率は、NIST ライブラリとの比較によって同定のさらなる確認を行うためのものです。最後の NIST Hit は、NIST で一致した化合物の数 (最大 100 まで) が表示されます。

表 2 に示されている中央の 3 つの列には、MSD ChemStation 定量データベースと比較できる計算定量値が表示されます。自動積分列には、ChemStation の自動積分による初期の計算定量値

が表示されます。範囲外のクオリファイイオン比を示している化合物には、クオリファイ不一致 (QMM) の印が付けられます。QMM の印が付けられている最初の 3 つのピークは自動的に積分されましたが、計算された定量値は間違っていました。間違ったピークが検出されたか、もしくはマトリックスの干渉による積分計算の誤りがあったためです。偽陽性と偽陰性には、それぞれ FP と FN という印が付けられます。手動積分列には、手動積分による計算定量値が表示されます。積分に使用されるリテンションタイムは、AMDIS の化合物リテンションタイムに基づいています。MSD というラベルの付いている左側 2 列は、どちらも、デコンボリューション処理を施していない通常の外観通りの生データを使用しています。「積分不能」というラベルの付いた 2 つの化合物は、手動積分でも計算できなかった不明瞭なピークです。AMDIS ng 列には、デコンボリューションされた「きれい」な抽出イオンに基づいて計算された定量値が表示されます。

表2. MSD ChemStation と DRS による計算結果の比較の例

| RT | CAS 番号 | 化合物名 | 自動積分 | 手動積分 | AMDIS | AMDIS | AMDIS | NIST | NIST |
|--------|---------|----------------------|---------|------|-------|-------|-------|------|------|
| | | | MSD | MSD | | 一致率 | RT 差 | | |
| | | | ng | ng | ng | | | | |
| 9.708 | 62533 | アニリン | 330 | 330 | 320 | 96 | 1.6 | 96 | 1 |
| 9.774 | 108952 | フェノール | QMM-18 | 2.26 | 0.29 | 31 | 1.4 | | NF |
| 9.851 | 111444 | ビス (2-クロロエチル) エーテル | QMM-320 | 積分不能 | 0.69 | 39 | -1.5 | | NF |
| 11.423 | 95534 | o-トルイジン | QMM-410 | 積分不能 | 0.38 | 84 | -0.8 | 73 | 10 |
| 11.467 | 621647 | N-ニトロソ-ジ-n-プロピルアミン | FP | | | | | | |
| 13.204 | 120821 | 1,2,4-トリクロロベンゼン | 0.08 | 0.08 | 0.07 | 85 | -0.8 | 72 | 2 |
| 13.356 | 91203 | ナフタレン | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 85 | -1.5 | 92 | 5 |
| 17.804 | 83329 | アセナフテン | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 98 | -1.3 | 88 | 1 |
| 18.004 | 51285 | 2,4-ジニトロフェノール | QMM | 5.3 | 5.5 | 38 | -3.3 | 84 | 22 |
| 18.316 | 132649 | ジベンゾフラン | 0.56 | 0.56 | 0.56 | 98 | -0.9 | 92 | 1 |
| 19.366 | 7005723 | 4-クロロフェニルフェニルエーテル | 0.16 | 0.16 | 0.10 | 81 | -0.7 | 74 | 1 |
| 19.716 | 122394 | ジフェニルアミン | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 88 | -1.4 | 96 | 2 |
| 19.792 | 103333 | アゾベンゼン | 0.50 | 0.50 | 0.23 | 84 | -1.1 | 81 | 2 |
| 21.832 | 85018 | フェナントレン | 0.17 | 0.17 | 0.13 | 95 | -2.0 | 87 | 4 |
| 21.836 | 120127 | アントラセン | FP | | | | | | |
| 23.544 | 84742 | ジ-n-ブチルフタレート | FN | 0.05 | 0.05 | 77 | -1.9 | | NF |
| 28.363 | 56553 | ベンゾ-a-アントラセン | 0.19 | 0.19 | 0.16 | 52 | -1.2 | 53 | 14 |
| 28.697 | 117817 | ビス (2-エチルヘキシル) フタレート | 0.46 | 0.46 | 0.48 | 94 | -1.4 | 86 | 3 |
| 30.226 | 117840 | ジ-n-オクチルフタレート | FP | | | | | | |

デコンボリューションされたターゲットイオンの定量値の一例を図 4 に示します。黒のトレース線が生の抽出ターゲットイオン 93 で、イオン 95 とイオン 63 という 2 つのクオリファイアがそれぞれ青のトレース線と紫のトレース線で示されています。ソフトウェアまたは分析者はデコンボリューション処理を行わずにこの区域から任意のピークを選択して定量化することもできます。しかし多くの場合、定量計算や同定を誤る原因にもなります。デコンボリューションされたターゲットイオン 93 は赤のトレースで表示され、積分しやすくなっています。

干渉レベルの高い 8 種類の土壌/水質試料を DRS が組み込まれている MSD ChemStation で処理を行いました。表 3 はその結果をまとめたものです。細心の注意を払って行った手動定量では、183 種類の化合物の存在が確認されています。MSD ChemStation のみを使用した自動定量では、多数の偽陽性 (FP) と偽陰性 (FN) が発生しました。これは、すべての化合物を定量データベースで 1 つずつ注意深く調べ上げる必要があるということです。表 3 の結果は、経験豊富な分析者による手動定量の前に実行された自動積分とデータ処理の結果です。AMDIS では、FP と FN の数は少なくなっていますが、これでもまだ予測として不十分です。

DRS を通して ChemStation と AMDIS を併用したときに FP と FN の数が最も少なくなりました。両方のプログラムで共通の FN は存在しません。このため、陽性のみを調べれば済むことになり、分析者にとってはかなりの時間の節約になります。

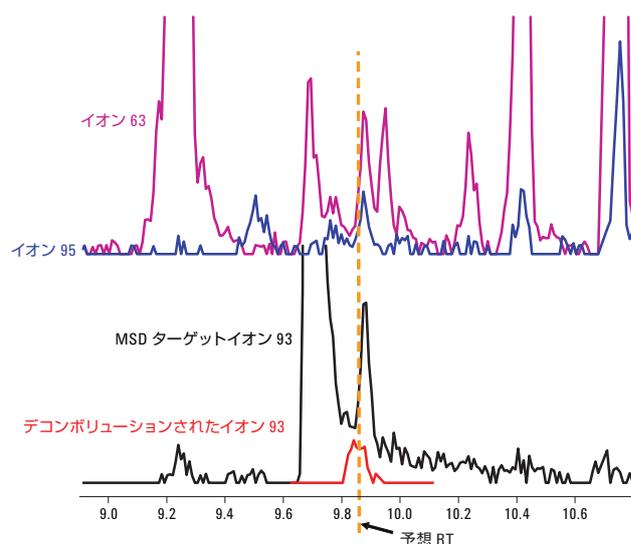


図 4. ビス (2-クロロエチル) エーテルのターゲットイオンとクオリファイアイオン。

表3. 8つの試料に関する結果のまとめ

| | 8つの試料 の合計数 |
|---|---------------|
| 手動定量によって特定された陽性の実数 | 183 |
| 絶対クオリファイアイオン一致率 20% における ChemStation の偽陽性の数 | 35 |
| 絶対クオリファイアイオン一致率 20% における ChemStation の偽陰性の数 | 56 |
| AMDIS の偽陽性の数 | 11 |
| AMDIS の偽陰性の数 | 11 |
| AMDIS と ChemStation の共通する偽陰性の数 | 0 |
| AMDIS と ChemStation の共通する偽陽性の数 | 2 |

結論

環境試料での GC/MSD による半揮発性物質の分析は、マトリックスの干渉により複雑なものになる場合があります。統合型デコンボリューションソフトウェアの使用により、データ確認の簡易化、データ品質の改善、および生産性の向上が実現できます。使い慣れた QEdit 画面の使用により、操作トレーニングが最小限に抑えられます。MSD ChemStation と DRS との併用により、偽陽性と偽陰性の数を最短の時間で最小限に減らすことができます。8 つの複雑な試料を分析しても、偽陰性は 1 つも発見されませんでした。

参考文献

1. Philip L. Wylie, Michael J. Szelewski, Chin-Kai Meng, and Christopher P. Sandy, "Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD Using Deconvolution Reporting Software," Agilent Technologies, publication 5989-1157, May 2004
2. Bruce Quimby and Mike Szelewski, "Screening for Hazardous Chemicals in Homeland Security and Environmental Samples Using a GC/MS/ECD/FPD with a 731 Compound DRS Database," Agilent Technologies, publication 5989-4834, February 2006
3. Michael J. Szelewski, "Semivolatiles Retention Time Locked (RTL) Deconvolution Databases for Agilent GC/MSD Systems," Agilent technologies, publication 5989-7875, February 2008

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。

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. 2008
Published in Japan
December 9, 2008
5990-3253JAJP



Agilent Technologies