

Technical Report

GC-MS用全自動同定・定量データベースシステムの開発

Development of a Novel Automated Identification and Quantification System with a Database for GC-MS

門上 希和夫¹

Abstract:

ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) で多数の化学物質を定量するための新しい全自動同定・定量データベースシステム (AIQS-DB) を開発した。AIQS-DBには、マススペクトル、保持時間及び検量線が登録され、標準品を用いることなく1000物質以上を一齐に同定・定量できる。試料測定時の保持時間の予測誤差は±3秒以内で、マススペクトルと併せて確実な同定ができた。定量値の室間再現精度は20%以下であり、試料測定時に検量線を作成する従来法とほぼ同程度であった。検出限界も登録物質の90%以上が10 pg以下であった。AIQS-DBを用いることにより、標準品を使用することなく多数の化学物質を測定でき、様々な用途に適用できる。

Keywords: GC-MS, AIQS-DB, Semi-volatile Organic Compounds, Retention Index, System Performance Check Standards

1. はじめに

ケミカルアブストラクト登録化学物質数は、2012年1月現在6400万種を超え、市場に流通している物質数も10万種に達している。また、生産量も1970年から1998年の約30年間で8倍になり、化学物質の種類及び量は急激に増加している。この様に化学物質は現代社会に必要な資材であるが、負の面も持ち合わせている。残留性有機汚染物質、農薬及び違法薬物などによるヒトの健康や野生生物への影響がこれまでに数多く報告され、近年はエマージング物質などによる悪影響も懸念されている。このような化学物質の負の面を押さえ、安全・安心に化学物質を使用する規制の有無に拘わらず多数の化学物質の分析が必要である。

化学物質の分析には、現在ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) が最も多く利用されているが、対象物質を定めた分析では、その標準品が不可欠である。その主な理由として、測定時のGC-MSの状態により、保持時間や応答値が異なるため、試料測定前に対象物質を測定し、保持時間及び注入量と応答値の関係 (検量線) を確認しなければならないことが挙げられる。このことは逆に、GC-MSの状態を常に一定にすれば、試料測定毎に標準品を測定しなくても対象物質の同定・定量が可能であることを示している。我々は、GC-MSの性能評価と対象物質の保持時間を予測するための手法を開発し、その結果を基に標準品を使用せずに1000種以上の化学物質を一齐に測定できる全自動同定・定量データベースシステム (AIQS-DB) を開発した。本報告では半揮発性化学物質用に開発したAIQS-DBの仕組み、同定・定量性能及び性能維持法を解説する。

2. 全自動同定・定量データベースシステム (AIQS-DB) とは

通常のGC-MSによる化学物質測定では、試料測定時に検量線を作成 (確認) する。この作業には、費用、時間、労力、使用した物質や溶媒の廃棄という問題がある。また、一齐に測定が出来る物質数は最大でも100物質程度である。

AIQS-DBはこの標準品測定問題をトリプルデータベース (保持時間、質量情報、検量線) を使用することで解決する手法である。標準品測定工程の代わりにデータベース登録データを用いるため、理論的には採用したGC-MS条件で測定可能な物質を全て測定できる。

また、通常の測定では、高感度な選択イオンモニタリング (SIM) が用いられるため、未知物質の検索は原理的にできない。AIQS-DBでは、近年のGC-MSの高感度化を活かしてスキャン (全イオンモニタリング、TIM) で試料を測定するため、対象物質だけでなく未知物質の検索も可能である。

3. 半揮発性化学物質用AIQS-DB登録物質

半揮発性化学物質用AIQS-DBの登録物質数をTable 1に示す。本AIQS-DBは、環境汚染物質や食品中残留農薬を測定する目的で開発したものであり、各国の規制物質や環境検出例のある物質及びGCで測定可能な農薬のほとんどを登録している。また、8種の重水素ラベル化多環芳香族炭化水素を内標準としている。

Table 1 半揮発性化学物質用AIQS-DB登録物質^(注)

物質分類1	物質数	物質分類2	物質数
CH構成物質	194	多環芳香族	79
		PCBs	62
		その他	53
含酸素化合物	150	フェノール類	50
		その他	100
含窒素化合物	113	芳香族アミン	43
		ニトロ化合物	42
		その他	28
含硫黄化合物	12		12
含リン化合物	8		8
PPCPs	14		14
農薬	451	殺虫剤	184
		除草剤	118
		殺菌剤	116
		その他	33
計	942		
内標準	8		

(注) (株)島津製作所 一斉分析用データベースソフトウェア 第2版

4. 装置及び測定条件

本AIQS-DBでのGC-MS測定条件をTable 2に示す。GC-MSは、島津製作所製のGCMS-QP2010を採用し、キャピラリーカラムは半揮発性化学物質の測定に適した微極性カラムのJ&W DB-5 msの中から最適と考えられる長さ、内径と膜厚を選択した。試料溶媒はヘキサンを想定しているため、カラム初期温度は溶媒効果が発揮される40°Cとし、毎分8°Cで310°Cまで昇温する。310°Cまで測定することで大半の半揮発性化学物質を測定できる。また、注入口温度は、最も汎用性がある250°Cとした。

Table 2 半揮発性化学物質用AIQS-DBのGC-MS測定条件

GC-MS	: Quadrupole GC-MS (e.g. Shimadzu GCMS-QP 2010)
Column	: J&W DB-5 ms (5% phenyl-95% methylsilicone) fused silica capillary Column, 30 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film
[GC]	
Injection volume	: 1 µL
Injection temp.	: 250°C
Column oven temp.	: 40°C (2 min) - 8°C/min - 310°C (5 min)
Control mode	: Constant velocity (40 cm/s)
Injection mode	: Splitless
Sampling time	: 1 min
Carrier gas	: He
[MS]	
Interface temp.	: 300°C
Ion source temp.	: 200°C
Ionization method	: EI
Tuning method	: target tuning for US EPA method 625
Mass range	: m/z 45 to 600
Event time	: 0.3 sec

5. AIQS-DBの構築と物質登録法

AIQS-DBに新しい物質を登録する手順を示す。GC-MSをTable 2の条件に設定した後、米国環境保護庁が半揮発性化学物質の分析法(EPA Method 625)に採用しているデカフルオロトリフェニルフォスフィン(DFTPP)のフラグメントパターンを満足する方法でMSをチューニングする。次に、後述する装置性能評価標準物質(チェック物質)を測定してn-アルカンの保持時間及びGC-MSの性能を確認した後、登録対象物質の検量線用標準液を測定する。データベースへ登録する情報は、保持時間、マススペクトル、内標準法による検量線、及びn-アルカンの保持時間である。

6. 試料の測定及び同定・定量法

試料測定では、チェック物質による性能確認まで上記「5 AIQS-DBの構築」と同一に操作し、測定試料液に登録時と同量の内標準混合溶液を加えて測定する。

対象物質の同定は、予測保持時間を含む一定時間範囲に対象物質の定量イオンのピークが存在し、もし存在する場合は、そのピークのマススペクトルに登録マススペクトルが含まれるか類似度を計算し、一定以上の類似度が得られた場合に対象物質が存在すると判定する。存在が確認された物質については、内標準とのピーク面積比を求め、AIQS-DBに登録された検量線から検出量を計算する。

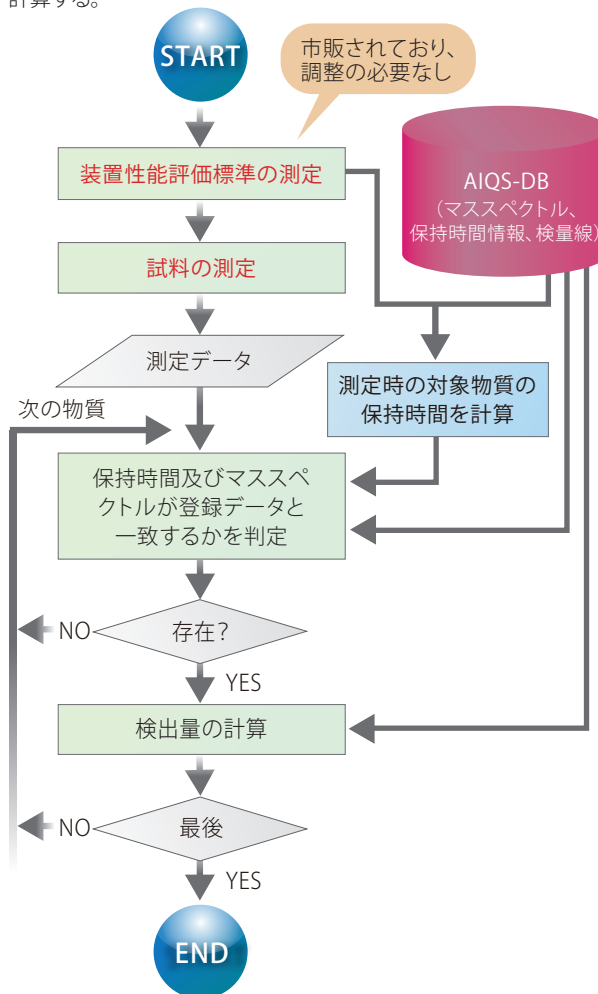


Fig. 1 AIQS-DBによる化学物質測定フロー

7. 保持時間の予測手法

GCで対象物質を同定するとき最も重要な情報は保持時間である。AIQS-DBでは、試料測定時の対象物質の予測保持時間を、試料測定時のn-アルカンの保持時間とAIQS-DBに登録した対象物質とn-アルカンの保持時間から次式により計算する。

$$RT_T = RT_{C_n} + (RT_T - RT_{C_n}) \times (RT_{C_{n+1}} - RT_{C_n}) / (RT_{C_{n+1}} - RT_{C_n}) \dots \text{式1}$$

ここで、 RT_T 、 RT_{C_n} 、及び $RT_{C_{n+1}}$ は、AIQS-DBに登録した対象物質T及びTの前後に出現するn-アルカン C_n と C_{n+1} の保持時間である。また、 RT_T 、 RT_{C_n} 及び $RT_{C_{n+1}}$ は、試料測定時の対象物質T及びn-アルカン C_n と C_{n+1} の保持時間である。

8. AIQS-DBの同定・定量性能

AIQS-DBで確実に同定・定量するには、2つの条件を満足する必要がある。第1の条件は、測定試料中の登録物質を確実に検出し、同時に試料に含まれていない登録物質を間違えて検出しないことである。即ち、誤検出を少なくしつつ、誤不検出を絶対に発生させないことである。この矛盾する条件を満足するためには、ピーク出現保持時間を正確に予測し、その保持時間に対象物質のマススペクトルが存在することをおある信頼度をもって判定する必要がある。第2の条件は、定量値の信頼性が高いことである。対象物質の存在の有無だけでなく、既存のマススペクトルデータベースなどでもある程度可能である。この2つの条件を満足すれば、試料測定時に標準品の測定を行わなくても、AIQS-DB登録物質の同定・定量ができ、有害物質の使用量削減、分析時間の短縮、分析費用の削減が実現できる。

8-1. 装置性能評価標準物質(チェック物質)による装置性能の評価と維持

AIQS-DBで信頼できる測定値を得るには、装置をAIQS-DB構築時の装置性能に可能な限り近づけることである。同定及び定量に影響する要因としては、MSのチューニング、キャピラリーカラムの性能(汚れ、劣化など)、注入口の不活性度・汚れ、イオン源の状態(汚れ)、測定試料中の夾雑物の影響がある。そこで、試料測定によって生じる装置状態の変化を確実にモニターできるチェック物質を検討した。夾雑物を多く含む食品試料をGC-MSに160回注入後、注入口インサート交換、カラム切除、イオン源洗浄及び交換等の保守操作を行った。また、その間220種のチェック物質候補を計29回測定し、感度や保持時間の変化を調べた。その結果、試料注入により115物質の定量値が当初値の±20%以上に変化し、5物質の保持時間が予測値より6秒以上ずれ、またイオン源の保守操作では77物質の定量値が当初の70%未満に減少した。以上の結果とEPA採用物質などを参考にTable 3に示すチェック物質を考案した。具体的な評価手順は、使用するGC-MSの性能良好時にチェック物質の検量線を作成(例えば0.2 ppm~2.0 ppm)し、試料測定時に1.0 ppm標準液を測定して測定値、テーリング度、マスパターンなどを調べることで性能を評価する。

Table 3 装置性能評価標準

物質	評価内容
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	注入口インサート、カラム、イオン源
Pentachlorophenol	注入口インサート、カラム、イオン源
Isofenphos oxon	注入口インサート、カラム、イオン源
Benzidine	注入口インサート、カラム
Thenylchlor	注入口インサート、カラム
4,4'-DDT	注入口インサート
Butylbenzyl phthalate	注入口インサート
Chlorothalonil (TPN)	注入口インサート
1,4-Benzenediol	カラム、イオン源、保持時間
4-Nitrophenol	カラム、イオン源
Captafol	カラム、イオン源
Dibutylamine	カラム
2,6-Dimethylaniline	カラム
2,4-Dichloroaniline	カラム
2,6-Dimethylphenol	カラム
2,6-Dichlorophenol	カラム
Octanol	カラム
Nitrobenzene	イオン源
2,4-Dinitrotoluene	イオン源
Tributyl phosphate	イオン源
2,4,6-Trinitrotoluene	イオン源
2,4-Dinitroaniline	保持時間
Tris (2-chloroethyl) phosphate	保持時間
1,2,4,5-Tetrabromobenzene	マスパターン
DFTPP	マスパターン
trans-Nonachlor	マスパターン
Triphenylmethane	定量値安定性
Dimethyl phthalate	定量値安定性
Atrazine	定量値安定性
n-Alkanes (C9 - C33)	保持時間予測

8-2. 保持時間の予測精度

昇温GCでは、n-アルカンを用いた昇温保持指標が開発され、一部のマススペクトルデータベースでは、同定に利用されている。また、注入口圧と特定の化合物の保持時間の関係から保持時間を固定する方法も実用化されている。AIQS-DB向けに開発した保持時間予測法は、昇温保持指標に類似した方法である。即ち、あるGC条件でn-アルカン系列と対象物質を測定し、対象物質の保持時間とそれを挟む2つのn-アルカンの保持時間をデータベースと一緒に登録する。実際の試料測定時には、n-アルカン系列のみを測定し、その保持時間から前述の式1により対象物質の保持時間を予測する。

キャピラリーGC分析において保持時間を決定するGCの要因は、カラムに関してはカラム長、内径、液相及び膜厚であり、キャリアーガスに関しては種類と線速度、さらに昇温条件である。AIQS-DBでは、試料注入法として環境や食品分析で最も使用されているスプリットレス注入法を採用したため、注入溶媒の種類も保持時間に影響を与える可能性がある。これらの中でGC-MS測定時に変更可能な

要因を対象に、保持時間の予測精度への影響を検討した。

まず、カラムだけを変えて保持時間の予測値の精度を検討した。3本のカラムを用い、チェック物質の保持時間を予測値と比較した結果、予測誤差は±3秒以内であることを確認した。この結果から、カラムを交換しても同一のGC条件ならば、試料から得られるマススペクトルの質が一定以上である限り、第1種のエラー（誤検出）は、確実に防ぐことができることが確認された。

次に、昇温条件、カラム長、膜厚、キャリアーガス線速度及び注入溶媒を変えて検討した。その結果、カラム長、膜厚や昇温条件などを大きく変更すると、予測保持時間と実保持時間との差が大きくなることが確認された。特に、差が大きい物質は、内標準とした重水素化多環芳香族炭化水素であった。そのため、カラムの交換や切断後は、保持時間の予測に用いるn-アルカンと対象物質の挙動に差が生じ、一部の対象物質の保持時間が予測値からずれることがあった。このことは、第2種のエラー（誤検出）の発生を増やす可能性がある。この様な、予測値との誤差は、チェック物質を測定することにより判定できる。即ち、予測保持時間との差が最も大きな内標準（通常ペリレン-d12）の保持時間差を確認することで、同定のためのサーチ範囲を決定することが可能である。また、必要なら保持時間を正確に予測するためのGC条件、例えばカラム長に合ったキャリアーガス線速度などを得ることができる。

注入溶媒の種類も保持時間に影響を与える。AIQS-DB作成では、ヘキサン溶液を測定している。その為、ヘキサンより沸点が高い溶媒では、保持時間が短い物質の保持時間が予測値より大きくなる。この様な場合は、試料と同一の溶媒で調製したn-アルカンを測定して保持時間を予測する。同様な機構による保持時間の変化が、極端に夾雑物が多い試料、例えば食品試料についても見られた。この場合、特定の物質の保持時間が予想より遅くなるため、サーチ範囲を広げる必要がある。

8-3. 同定の信頼性

GC-MSでの同定には、質量情報と保持時間情報を用いる。前述のように保持時間の予測精度は標準品を測定する従来法と同程度である。質量情報に関しては、AIQS-DBはスキャン（全イオンモニタリング、TIM）測定であるためマススペクトルが得られ、SIMを用いる従来法に比べて同定の信頼性は優れている。

同定の精度を向上させるには、保持時間の精度に加えてマススペクトルの質がある。即ち、非常に強度が小さいピークではバックグラウンドの影響を受け、また大きなピークが重なった場合はそのスペクトルの影響を受ける。また、MSのチューニング条件がデータベース測定時と大きく違っていれば、マススペクトル自体が異なったものとなる。

これらについて検討した結果、以下のことが確認された。試料測定時のMSのチューニング条件がデータベース作成時と大きく違っていれば、測定マススペクトルがデータベース登録

スペクトルと異なり、時として類似度が大きく低下して不検出となった。その為、試料測定時のMSのチューニングは、AIQS-DB作成時と同一条件で行う必要がある。バックグラウンドや他の物質の影響を最小限として良好なスペクトルを得るにはバックグラウンド消去が有効であった。しかし、強度が非常に大きなピークが対象物質と完全に重なった場合は、高い類似度を得ることができなかった。この様な場合は、目視で対象物質の有無を判定する必要がある。フォワードサーチとリバースサーチの同定精度を比較した結果、ピーク強度が小さい場合や妨害ピークが存在する場合などマススペクトルの質が悪い時は、リバースサーチの同定精度が高いことが確認された。

8-4. 定量値の信頼性

AIQS-DBでは、検量線をデータベース化して何時でも何処でも精確な定量値が得られることを重要目標としている。そこで、微極性カラムで測定が難しい物質を含む広範囲の物理化学的性質から構成される114物質を用い、4機関4台のGC-MSで室内併行、室内および室間再現性を検討し、測定値のばらつきを把握すると共に、ばらつきの原因を検討した。ここでは室間再現性試験結果を3分類してTable 4に示す。

Table 4 室間再現性試験結果

室間再現性	RSD、% (物質数)
10%未満	41% (47)
10~20%	37% (42)
20%以上	22% (25)

(I) GC-MSの性能を一定レベル以上に維持すれば、フタル酸エステル類、有機塩素系農薬、芳香族系複素環、多環芳香族炭化水素類、ベンゼン類、芳香族アミン類、フェノール類、ニトロベンゼン類等の内、高極性官能基（水酸基、アミノ基、ニトロ基）の数が1つである物質の多くの測定精度はRSD10%未満であり、内標準法と同等の精度で測定できる。(II) 高沸点の多環芳香族炭化水素類、定量イオン m/z 250以上で多くの塩素や臭素をもつ物質、リン酸エステル類及び水酸基、アミノ基、ニトロ基などの高極性官能基を持つ物質で水溶解度の比較的大きな物質 ($\log P < 3$) のばらつきはRSD10~20%程度であり、従来法には劣るが、目的によっては定量可能である。(III) 現在のGC-MSの性能や半揮発性化学物質用AIQS-DBのGC条件、特に微極性カラムでは、*m*-aminophenol、2,6-diaminotoluene、4-methyl-3-nitrophenol、bentazoneに代表される高極性官能基を2個以上持つ物質や2-ethyl-1-hexanol、tris (2-ethylhexyl) phosphate等、一部のアルコール類やリン酸エステルでばらつきが20~70%となり、精度良く定量することは困難であるが、スクリーニングには使用できる。

再現性が劣る物質への対策としては、(II)に属するn-パラフィンやハロゲン化合物などの低極性物質は、これらをチェック物質に加えることで容易に問題を発見することができ、

対策を講ずることで再現精度の向上が図れる。一方、(III)に属する物質はAIQS-DB法に限った問題ではなく、これらの物質を精度良く測定するには、異なるGC条件でデータベースを構築する必要がある。

ダイオキシン類などのGC-MSを用いる環境省の公定法では、試料測定時に検量線の間濃度の標準液を測定し、期待値の20%以内の変動であることを義務づけている。検討の結果、大半の物質はこの基準を満足しており、装置を適正に管理すれば標準液を測定しなくても精確な測定値が得られることを示している。

8-5. 検出限界

装置検出限界値は、スキャン(全イオンモニタリング、TIM)であるためSIMと比べて劣るものの、約9割の物質のS/N=3は10 pg未満であった。即ち、1 Lの水質試料を1 mLに濃縮した場合の検出限界は、10 ppt未満となる。この値は、ダイオキシン類など超微量分析が必要な一部の化学物質を除けば、充分低い検出下限である。

参考文献

1. 有害化学物質一斉分析用ガスクロマトグラフィー／質量分析法データベースの開発、門上希和夫、棚田京子、種田克行、中川勝博、分析化学、53、pp581-588、2004。
2. Novel gas chromatography-mass spectrometry database for automatic identification and quantification of micropollutants, Kiwao Kadokami, Kyoko Tanada, Katsuyuki Taneda, Katsyhiro Nakagawa, *J. Chromatogr A*, 1089 pp 219-226, 2005.
3. GC-MS全自動同定・定量データベースシステムにおける測定値の再現性の検証、宮崎照美、門上希和夫、園田裕一、陣矢大助、山上仰、東房健一、尾川博昭、分析化学、60、pp 543-556、2011。
4. 半揮発性化学物質多成分同時分析のためのガスクロマトグラフ-四重極型質量分析計の性能評価物質、陣矢大助、岩村幸美、門上希和夫、楠田哲也、宮川治彦、中川勝博、近藤友明、分析化学、Vol. 60、pp. 965-975、2011。

9. まとめ

半揮発性化学物質用AIQS-DBを開発し、その同定・定量性能を評価した。その結果、昇温保持指標を用いることで精確に保持時間を予測することができ、マススペクトルと併せて確実な同定が可能であった。また、チェック物質を用いて性能を一定に維持することで微極性カラムでの測定に適した無極性から中極性の物質をほぼ精確に定量できた。現在の半揮発性化学物質用AIQS-DBでは1000物質を測定できるが、登録物質数を増やすと共に他のカラムについても同様なデータベースを構築することにより、一層汎用的かつに網羅的にGC-MSで測定可能な化学物質を測定することが可能である。

AIQS-DBのメリットは、標準品を使用せずに1000種を超える化学物質を同定・定量できることである。それにより、直接的には低コスト、省力、省資源、減廃棄物、短時間に測定ができる。環境分析では、従来不可能であった環境の全体像の把握ができる。即ち、調査地点の化学物質の発生源、例えば農業由来、生活由来、工業由来の比率、さらには業種なども把握可能である。また、環境汚染事故の原因究明や緊急時の安全性確認に有効である。食品や飲料水の分析では、測定物質数が多いほど安全性の確認に有効であることは誰でも分かる。標準品が不要であるため、入手が困難な違法薬物や爆発物の分析、代謝産物の分析にも応用でき、医学分野での利用も考えられる。技術の進歩で分析機器の高感度化、高選択性化、装置安定性の向上が進んでいる。将来は、AIQS-DBによる分析が当たり前になる時代が来るかもしれない。

GC-MS一斉分析用データベースソフトウェア

GC-MS一斉分析用データベースソフトウェア(第二版)は、北九州市立大学 教授 門上希和夫先生(元北九州市環境科学研究所)が考案された全自動同定・定量データベースシステム(AIQS-DB)を、門上先生と当社が共同で製品化したものです。このデータベースには、1000物質におよびマススペクトル、保持時間及び検量線が登録され、標準品を用いることなく1000物質以上を一斉に同定・

定量できます。

このデータベースの性能を最大限に引き出すためには、装置側には高感度が、またソフトウェアには定量処理機能の充実が求められます。GCMS-QP2010 UltraとGCMSsolutionソフトウェアはこれらの要求を満たす、AIQS-DBに最適なGC-MSシステムです。

環境汚染物質を中心に942化合物を登録

対象化合物として、炭化水素(PAHs, PCBs など)194、含酸素化合物150、含窒素化合物113、含硫黄化合物12、含リン化合物8、PPCPs(Pharmaceuticals and Personal Care Products)14、農薬(殺虫、除草剤、殺菌剤など)451種について、保持指標、マススペクトル、検量線情報をデータベースに登録。n-アルカンによる保持時間の予測

と組み合わせ、信頼性の高い成分同定を支援します。

装置評価用物質により装置の稼動状況やメンテナンスが必要かを判断することができます。また、内部標準法によりおおよその定量値を求めることができます。

GCMSsolutionによる簡単操作

一斉分析用データベースは、標準ソフトウェアGCMSsolution用のメソッドを作成します。そのため、通常分析と同じ手順で分析やデータ処理ができます。GC-MS一斉分析用データベースソフトウェアで作成したメソッドを、Scan/SIMモードに切り替え、規制対象成

分についてはSIM測定とします。規制成分はSIMによる高感度測定ができ、Scanで網羅的に汚染物質をスクリーニングできます。汚染物質の水道水源水への流入などの事故にも迅速に対応できます。

AIQS-DBに最適な高感度GC-MS

通常的环境分析では、MSの測定モードとして高感度な選択イオンモニタリング(SIM)が用いられます。しかし、AIQS-DBでは同定に、マススペクトルを用いるためにスキャンモードで測定する必要

があります。そのため、高感度でスキャン測定することが重要です。当社のGCMS-QP2010 Ultraは、高感度イオン源を開発することによってスキャンおよびSIMモードでの高感度を実現しています。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2012年7月
© Shimadzu Corporation, 2012