



# 処理水中の消毒副生成物の同定

Jonathan D. Byer, LECO Corporation; Saint Joseph, Michigan USA  
 Susan D. Richardson, University of South Carolina; Columbia, South Carolina USA

**Key Words:** 高分解能飛行時間型質量分析 (HR-TOFMS)、未知化合物同定、ポストターゲット解析、消毒副生成物 (DBP)、化学イオン化法 (CI)

## 1. Introduction

LECO社のPegasus® GC-HRTを用いて、プールおよび温浴槽水中の「既知の未知 (known unknowns)」および「未知の未知 (unknown unknowns)」の同定を行いました。「既知の未知」は、LECOのChromaTOF-HRT®ソフトウェアを用いた高分解能デコンポリューションスペクトルのライブラリ検索により同定され、「未知の未知」は、電子イオン化法 (EI) と化学イオン化法 (CI) による正確質量データを組み合わせることで元素組成を推定し暫定的に同定しました。プールでは、遊泳者を病原体から保護し疾患を防ぐために消毒剤が使用されます。消毒剤は水中の自然発生有機物と反応するだけでなく、遊泳者自身によって水中に導入された化学物質とも反応して、有害の可能性がある副生成物を生成することがあります。プールや温浴槽という非常に複雑なマトリックスにおける消毒副生成物の化学的特性の解明は、遊泳者を保護するため、初期段階の重要な手順です。

完全に未知の汚染物質が多数存在することから、ノンターゲット解析 (NTS) が不可欠です。本ノートで紹介する主な機能には、高分解能デコンポリューション® (HRD®) を用いた自動ピーク探索、ChemSpider検索の起動、質量欠損プロット、先進的ピークフィルタリング、およびEIとCIの補完的データ取得が含まれます。

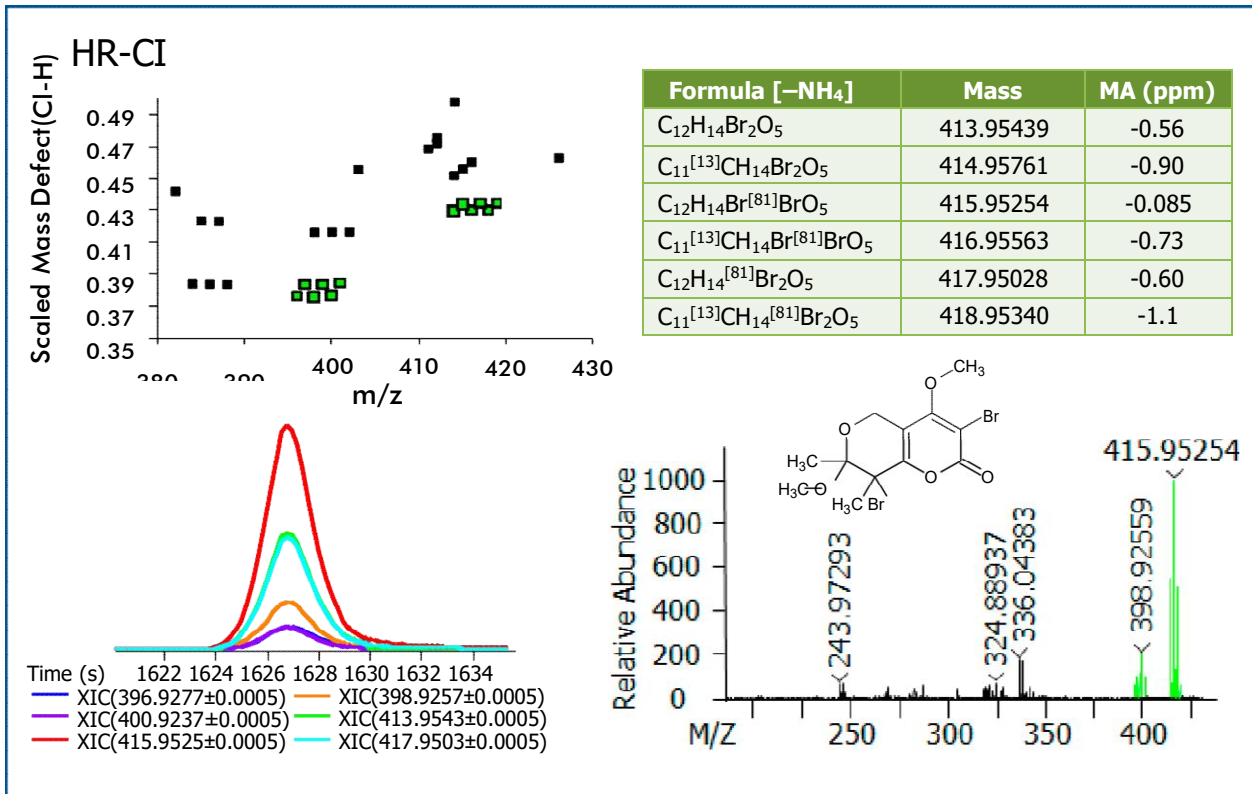


図1. 未知化合物 (unknown-unknown) の暫定同定ワークフローの概略図。ユーザー定義の質量欠損プロット (CI-HIに基づきスケールリング) を用いたHR-Clモードでのデータ取得は、ハロゲン化合物のポストターゲット解析に有効な手法です。質量欠損プロット上で緑色で示された点は、温浴槽サンプル中の未知化合物に対するアジクトイオン [M+H]<sup>+</sup> および [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> の同位体クラスターを表しています。デコンポリューションされた質量スペクトルと、優れた質量精度および同位体忠実度を持つ正確質量測定の結果を組み合わせることで、化学構造の推定および暫定的な化合物同定が行われました。

## 2. Experimental

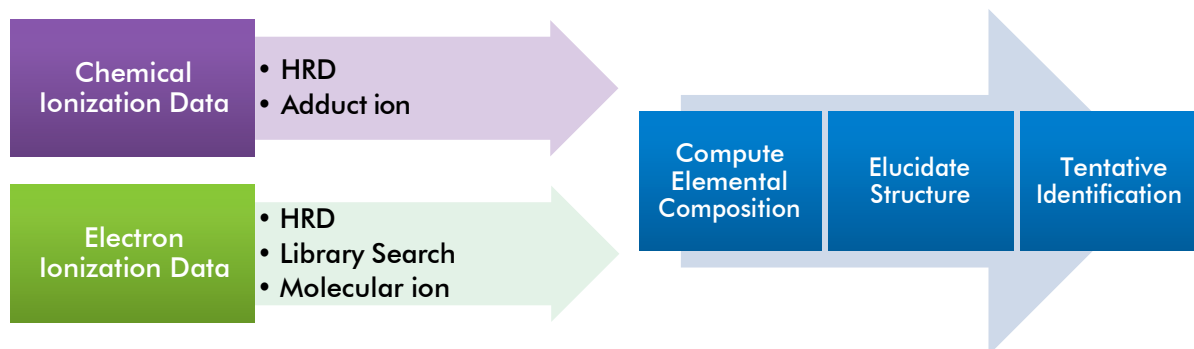
サンプル：プール水および温浴槽水（各10 L）を採取し、Amberlite XAD樹脂で抽出後、1 mLまで濃縮。その後、酸を0.5 mLのジアゾメタンで選択的に誘導体化しました。抽出液はLECOのPegasus GC-HRTで分析されました。データ解析：データはLECO ChromaTOF-HRTソフトウェアで収集・処理されました。分析対象ピークの検出には、高分解能デコンボリューション（HRD）とライブラリ検索を組み合わせ、正確質量による確認を行いました。正確質量測定により、EIおよびCIデータを用いた化学式の決定が可能となり、構造解析および暫定的な化合物同定に利用されました。ユーザー定義の基準式「CI-H」に基づく質量欠損プロットは、ハロゲン化物をターゲットとするデータフィルタリングツールとして生成されました。さらに、質量スペクトル上の特徴的な同位体パターンにより特定されたClおよびBr含有種を対象とするピークテーブルフィルタオプションが、未知の消毒副生成物を抽出するポストプロセッシング手法として使用されました。

Gas Chromatograph	Agilent 7890 with 7693 Autosampler
注入	1 $\mu$ L, MMI, 55°Cから250°Cまで 300°C / min
キャリアガス	He, 13 psi, 定圧
カラム	Rxi-5MS, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 $\mu$ m coating (Restek, Bellefonte, PA, USA)
昇温プログラム	35°C (4分保持) から280°Cまで 9°C / min (20分保持)
トランスファーライン	280°C
Mass Spectrometer	LECO Pegasus GC-HRT
取得モード	高分解能 (HR) R = 25,000 FWHM、超高分解能 (UHR) R = 50,000 FWHM
イオン源温度	200°C (EI); 200°C (CI)
イオン化モード	EI; CI (試薬ガス = CH <sub>4</sub> 中 5% NH <sub>3</sub> , 流量1.0 mL / min)
測定範囲 (m/z)	HRモード = 33-650 (EI) 、60-650 (CI) ; UHRモード = 200-650
取得速度	5 spectra/s

## 3. Results and Discussion

図1では、質量欠損プロットを含むワークフローが強調されています。質量欠損プロットは、各化合物がその化学式により特有の質量欠損を持つことを利用して構造解析や化合物同定を支援するソフトウェアツールであり、この特性は高分解能質量分析でのみ正確に測定可能です。この特徴により、ハロゲン化種のような特定の化合物クラスを区別でき、ユーザーはより多くの分析対象物を自信をもって発見できます。

未知化合物同定の典型的なワークフローは、まずEIデータを取得することから始まり、次に高分解能デコンボリューション（HRD）とライブラリ検索が行われます。もし測定された分析対象物が大きく断片化し、高いライブラリ類似度スコアで自信をもって同定できない場合、通常はCIデータを取得し、再びHRDとアドダクトイオンの同定を行います。これらのデータを組み合わせることで、元素組成の算出、構造解析、および暫定的な化合物同定が可能となります。



高分解能デコンボリューションは、このワークフローにおいて最も重要なステップであり、後続の同定ステップすべてで使用される質量スペクトルを生成します。図2は、UHRモードで取得されたEIデータに対するHRDの例を示しています。データ処理中に同定された各ピークの特徴的m/zに基づく抽出イオンクロマトグラム（XIC）が、クロマトグラム上の1104～1112秒の領域に表示されています。デコンボリューション（Peak True）によるジプロモピリジナミンの質量スペクトルは、生データから特徴イオンを分離して同定精度を高める利点を示しています。この8秒間の解析で、9つのユニークなピークがデコンボリューションされています。

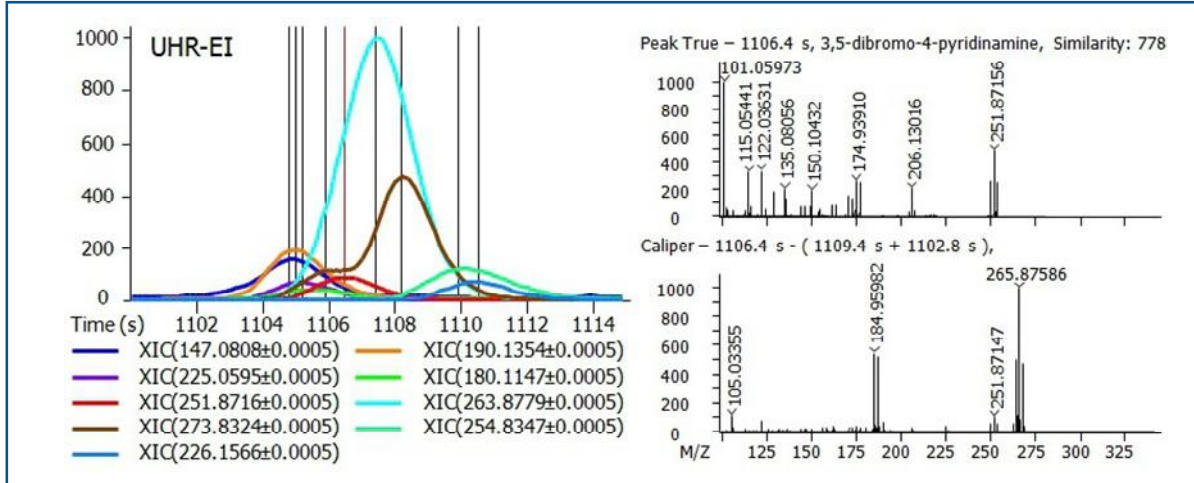


図2. HRDによりデコンボリューションされた9つのピークの特徴イオンの抽出イオンクロマトグラム（XIC）。赤色のピークマーカーで示されたピークのデコンボリューション後（Peak True）質量スペクトルは、バックグラウンドイオンや共溶出化合物由来のイオンなど、ジプロモピリジナミンに対応しない不要な質量が除去されていることを示しています。

電子イオン化法（EI）はハードイオン化技術ですが、GCにおいて最も広く使われるイオン化モードであり、その一因として再現性の高さから膨大な質量スペクトルライブラリが構築されてきたことが挙げられます。しかし、プールおよびホットタブサンプルで検出されたピークの大部分はNISTやWileyのデータベースにマッチしませんでした。両サンプルとも、ライブラリ類似度スコアが750を超えるピークは全体の5%未満であり、サンプル中の多くの成分は未知の未知（unknown unknown）であることが示唆されます。

真の未知分析では、分子イオンの正確質量測定が必要となりますが、EIでは低存在量で現れることが多く、熱に不安定な化合物では観測されない場合もあります。そのため、アドダクトイオンの検出を促進するために、よりソフトなイオン化技術である化学イオン化（CI）が開発されました。図3は、EIとCIの補完的データ取得による構造同定の利点を示しています。本例では、EI質量スペクトル中の提案される分子イオンはベースピークの2%未満であり、本当に分子イオンかどうか不確かです。一方、対応するCIスペクトルでは、アンモニウムアドダクトイオンのクラスターがベースピークとして現れ、全ての不確実性が解消されます。さらに、ChromaTOF-HRTソフトウェアでは、中性損失に基づくフラグメントの化学式算出が可能であり、EIおよびCIスペクトルにおけるフラグメントイオンの正確質量測定が損なわれることはありません。このように、構造解析を通じて暫定的な化合物同定が可能であることが、図3に示されています。

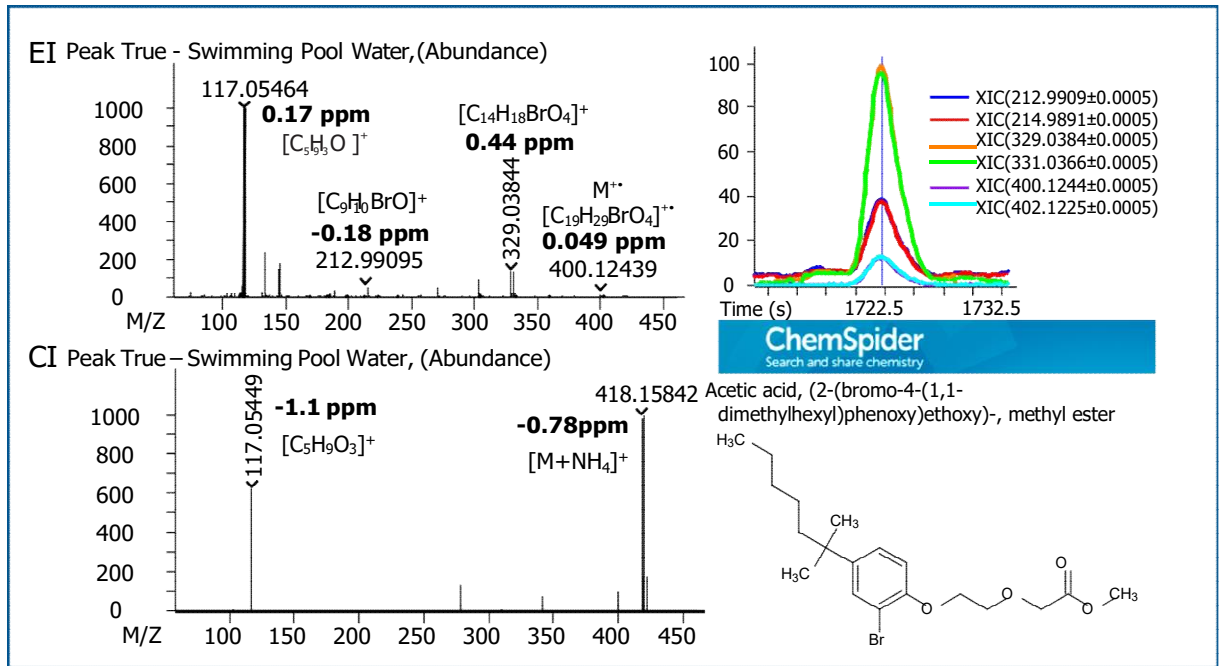


図3. 補完的な電子衝撃 (EI) および化学イオン化 (CI) 質量スペクトルにより、シアソメタン誘導体化されたプールサンプル中の未知化合物の暫定同定が可能となった。

温浴槽およびスイミングプールの水処理には臭素が、プールの給水に使用される水処理には塩素が用いられました。そのため、本解析では、化合物の同定はハロゲン化消毒副生成物に限定されます。ChromaTOF-HRTソフトウェアには、このように非常に複雑なサンプルのデータ解析および可視化を管理するための高度なフィルタリング機能が組み込まれており、例えばライブラリ類似度スコアが800以上、かつ/または質量精度 $\pm 2$  ppmのピークのみを表示することが可能です。図4に示すピークテーブルの抜粋では、ClおよびBrのピークフィルターを適用しており、ClおよびBrの同位体パターンや最大10個のハロゲンを含む混合Br/Clパターンを利用しています。テーブル内では、ライブラリ類似度スコアが800以上のピークには化合物名が付与され、それ以外の未知ピークはピーク番号で表示されます。すべてのピークには対応するデコンボリューション後 (Peak True) の質量スペクトルがあり、各m/z値に対して化学式の計算・注釈付けが可能です。さらに、質量間の中性差 (neutral difference) を算出することで構造決定を支援できます。分子イオンに割り当てられた化学式は、ChromaTOF-HRTソフトウェアから直接WebデータベースChemSpiderで検索可能です。ライブラリ検索で名前が付与されなかった未知ピークについては、高精度質量、フラグメンテーション (中性損失を含む)、元素組成の決定、およびChemSpider検索を組み合わせることで化合物同定が提案できます。これは高分解能質量分析計における究極の目的です。図4には、5,5'-ジメチル-3-ブロモシクロヘキサ-2-エノンの例として、高精度質量に基づく化学式割り当てとChemSpider検索による暫定同定の結果が示されています。

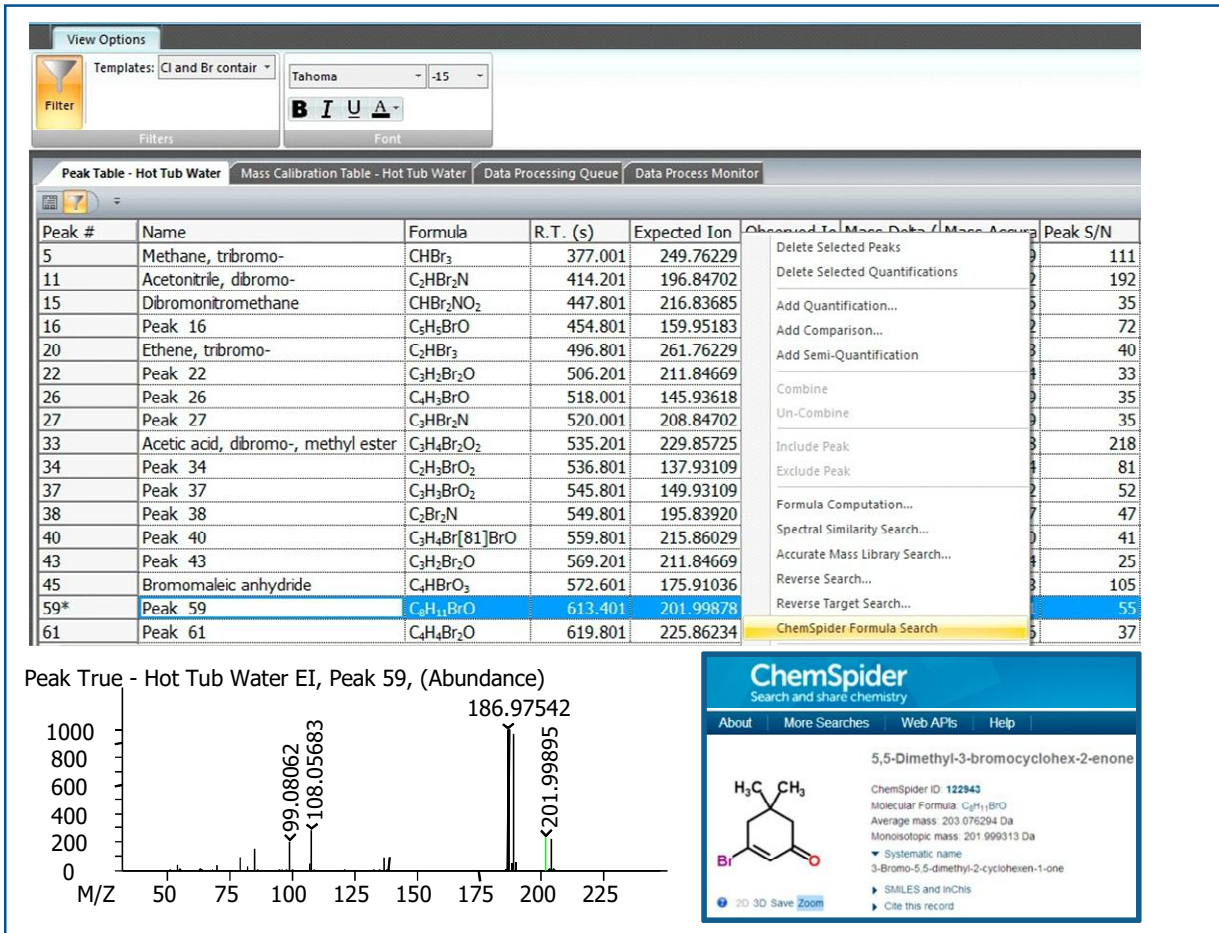


図4. 酸素・塩素含有化合物にフィルターをかけたピークテーブルは、ハロゲン化消毒副生成物の同定を容易にします。化学式が算出された未知化合物については、ChromaTOF-HRTソフトウェアから直接ChemSpiderを起動して検索でき、対応するデコンポリューション後 (Peak True) の質量スペクトルに基づき適切な構造を提案することが可能です。

#### 4. Conclusion

LECOのPegasus GC-HRTは、業界をリードする質量精度と分解能により、これまで以上に多くの化合物をこれらのサンプルから同定することを可能にし、サンプル中に含まれる未知の化合物の発見を支援しました。ChromaTOF-HRTソフトウェアに搭載された自動化ツールにより、従来は同定困難であった未知の消毒副生成物の発見・同定が実現しました。



LECO, Pegasus, ChromaTOF-HRT, High Resolution Deconvolution, HRD are registered trademarks of LECO Corporation.

LECO Corporation | 3000 Lakeview Avenue | St. Joseph, MI 49085 | Phone: 800-292-6141 | Fax: 269-982-8977  
 info@leco.com • www.leco.com | ISO-9001:2008 | HQ-Q-994 | LECO is a registered trademark of LECO Corporation.