

고분해능 Agilent 7250 GC/Q-TOF로 폐수 시료 분석을 통한 독성 화학물질 식별

저자

Sofia Nieto and Kai Chen
Agilent Technologies, Inc.

Thomas Young
Department of Civil and
Environmental Engineering,
University of California Davis,
CA, USA

개요

본 연구에서는 폐수 내 독성 화학물질을 식별하기 위해 광범위한 추정 물질 스크리닝 워크플로를 이용했습니다. 이 포괄적인 접근 방식에는 다중 이온화 모드의 고분해능 accurate mass Agilent 7250 GC/Q-TOF, Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.1의 GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로, 그리고 농약 및 환경 오염물질에 대한 GC/Q-TOF accurate mass 라이브러리를 사용한 표적 및 비표적 분석법이 결합되었습니다.

서론

폐수 내 독성 화학물질을 식별하는 작업은 다운스트림 생태계의 환경 수질을 개선하기 위한 핵심 단계입니다. 기존의 표적 분석 접근법은 제한된 범위로 인해 독성원을 식별하기에 충분하지 않은 경우가 많습니다. 일반적으로 비표적 분석을 포함한 포괄적인 스크리닝을 통해 이 문제를 해결하고 독성의 가능한 원인을 보다 심층적으로 이해할 수 있습니다. 환경 시료에서 화학물질을 종합적으로 특성 규명하려면 고분해능 질량 분석(HRMS)과 LC 및 GC 분리 기술을 결합시켜야 합니다. 그렇지 않고 LC/MS에만 중점을 두면 이러한 시료에 존재하는 많은 비극성 및 휘발성 화합물을 놓칠 수 있습니다. GC/HRMS를 이용한 소프트 이온화와 accurate mass 분석을 이용하면 미지 성분을 식별하거나 NIST 라이브러리에서 잠정적인 매치 결과를 검증하는 중요한 이점을 얻을 수 있습니다. 본 연구에서는 고분해능 GC/Q-TOF 분석을 통해 폐수 시료에서 독성 화학물질을 식별하기 위해 광범위한 추정 물질 스크리닝과 농약 및 환경 오염물질 검출을 위한 비표적 접근법을 결합했습니다.

실험

시료

폐수 시료(94940, 94941, 94943 및 94944)를 5일 동안에 걸쳐 1일차, 2일차, 4일차 및 5일차 반복해서 수집했습니다. 방류수 독성(WET) 시험에 나타난 바와 같이, 처음 두 개의 시료는 *Ceriodaphnia dubia*에 대해 급성 독성을 나타냈습니다.

시료를 GF/F 필터(0.45µm)로 여과하고 친수성 역상 고체상 추출 카트리지에 통과시켰습니다. 건조된 카트리지를 ethyl acetate 및 메탄올로 용리시켰습니다.

건조된 필터를 hexane/acetone 1:1로 담긴 초음파 수조에서 추출했습니다. 두 추출물을 합하고 내부 표준물질로서 dibromooctafluorobisphenol(DBOFB)을 스파이킹했습니다.

15 x 15m 중간 컬럼 백플러시 구성의 Agilent 8890 GC와 결합된 고분해능 7250 GC/Q-TOF를 사용하여 시료를 분석하였습니다(그림 1). 농약 및 환경 오염물질에 대한 GC/Q-TOF accurate mass 라이브러리와 RT 일관성을 보장하기 위해, 20분의 머무름 시간 고정(RTL) 분석법(9.143분의 RT

에서 chlorpyrifos-methyl에 고정)을 이용했습니다. 분석법에 사용한 백플러시는 일관된 RT를 유지하고, 캐리오버를 방지하고, 컬럼 수명을 연장하며, 이온화원 오염을 감소시키도록 돕습니다.

폐수 내 종종 발견되는 pyrethroid 및 기타 할로겐화 화합물에 대한 최고의 분석 감도를 보장하기 위해 전자 이온화(EI) 및 음이온 CI(NCI) 모드에서 시료의 오염물질을 스크리닝했습니다. 양이온 CI(PCI)는 분자 이온 부가물의 형성에 유리하기 때문에 화합물 식별을 위해 나중에 이 방법도 이용했습니다. 표 1에 조건을 나타냅니다.

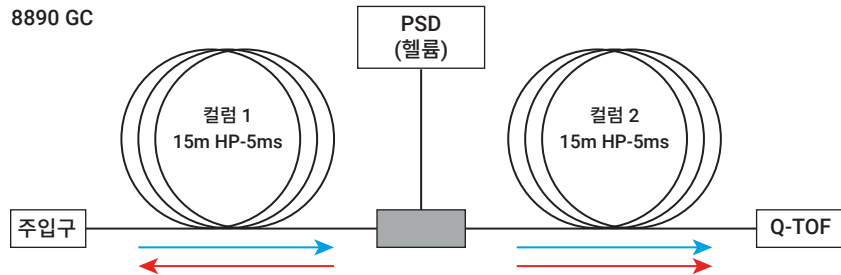


그림 1. 중간 컬럼 백플러시 구성. 분석 마지막의 백플러시 과정에서의 헬륨 유동 경로는 빨간색 화살표로 표시됩니다. 퍼지된 유니온의 압력은 주입구의 압력이 떨어지는 동안 상승했습니다. 그 결과 첫 번째 컬럼의 흐름이 역전되고 높은 비점의 화합물을 분할 배출을 통해 제거할 수 있습니다. 기계역학 스위칭 장치(PSD)는 Agilent 8890 GC 기계역학 제어 모듈이며, 이는 운반 가스 소모량을 크게 줄이면서 백플러시 기능을 제공했습니다.

표 1. GC/Q-TOF 수집 파라미터

GC 및 MS 조건	EI	음이온 CI	양이온 CI
GC	Agilent 8890 GC		
컬럼	2 × HP-5ms UI, 15m, 0.25mm, 0.25µm		
주입구	MMI, 4mm UI liner single taper with wool		
주입 부피	1µL		
주입 모드	냉각 비분할		
주입구 온도	60°C에서 0.2분 유지; 600°C/분으로 320°C까지 승온		
오븐 온도 프로그램	60°C에서 1분 유지; 40°C/분으로 170°C까지 승온; 10°C/분으로 310°C까지 승온; 3분 유지		
운반 가스	헬륨		
컬럼 1 유속	약 1.2mL/분		
컬럼 2 유속	약 1.4mL/분		
백플러시 조건	5분(분석 후), 310°C(오븐), 50psi(AUX EPC 압력), 2psi(주입구 압력)		
이송 라인 온도	280°C		
질량 범위	m/z 50~650		
스펙트럼 수집 속도	5Hz		
사중극자 온도	150°C		
이온화원 온도	280°C	150°C	280°C
전자 에너지	70eV	250eV	100eV
방출 전류	5µA	10µA	15µA

추정 물질 스크리닝 워크플로

EI 모드에서 수집한 GC/Q-TOF 데이터를 먼저 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.1에서 사용할 수 있는 GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로를 이용해 처리하였습니다. 표적물질 목록은 1,000종 이상의 고유 화합물을 포함한 완벽하게 큐레이션한 accurate mass 농약 개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리 (PCDL)를 기반으로 합니다. 데이터 처리 속도와 품질을 높이기 위해 분석하기 전에 GC/Q-TOF 데이터를 SureMass 포맷으로 전환했습니다. 스크리닝 분석법은 총 7개의 특이성이 가장 높은 accurate mass 이온과 함께 각 스펙트럼에서 해당 비를 이용하여 GC/Q-TOF 농약 및 환경 오염물질 PCDL로부터 자동으로 생성하였습니다. 스크리닝 분석법 파라미터는 SANTE¹ 및 FDA² 지침에 따라 설정되었으며 RT 범위, 질량 정확도 및 라이브러리 매치 스코어 등을 포함합니다.

비표적 식별 워크플로

비표적 분석법에서는 MassHunter Quantitative Analysis 10.1의 Unknowns Analysis 기능으로 EI 데이터를 처리했습니다. 특징 추출 단계에 이어 Agilent Mass Profiler Professional(MPP)의 차이 분석과 NIST17 라이브러리 검색을 이용해 폐수 시료의 보다 높은 독성과 관련된 화합물을 식별했습니다. 비표적 스크리닝을 통해 미지 화합물 분자 이온 또는 식별 검사가 필요한 화합물을 더 상세히 식별하기 위해, EI 및 양이온 화학적 이온화 (PCI) GC/Q-TOF 데이터에 MassHunter Qualitative Analysis 10의 Fragment Formula Annotation 도구를 사용했습니다.

GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로에서 NCI GC/Q-TOF 데이터를 사용하기 위해 NCI 모드에서 수집한 스펙트럼에 기반한 더 집중적인(pyrethroid 등)과 같은 약 120종

화합물) accurate mass PCDL을 생성했습니다. 그런 다음 동일한 GC/Q-TOF 스크리닝 도구를 사용하여 NCI 데이터를 처리했습니다.

결과 및 토의

EI 모드에서 추정 물질 스크리닝

*Ceriodaphnia dubia*에 대해 다양한 수준의 급성 독성도(0~80%)를 나타내는 폐수 시료를 고분해능 GC/Q-TOF를 사용하여 분석했습니다. MassHunter Quantitative

Analysis 소프트웨어 10.1(그림 2)에서 사용할 수 있는 스크리닝 워크플로를 이용해 GC/Q-TOF PCDL에 포함된 많은 중요한 농약과 환경 오염물을 모니터링했습니다.

이 워크플로에서 질량 정확도 <5ppm 및 라이브러리 매치 스코어 >75를 갖는 EI GC/Q-TOF PCDL을 사용하여 각 폐수 추출물에서 90종 이상의 화합물을 식별했습니다. 그림 3은 EI 스크리닝 창과 보고서의 예를 보여줍니다. 스크리닝 워크플로에서 자동으로 확인된 화합물은 녹색으로 표시됩니다.



그림 2. GC/Q-TOF PCDL을 사용한 표적 및 추정 물질 스크리닝 접근법과 NIST 라이브러리를 사용한 비표적 스크리닝에 기반한 결합된 오염물질 스크리닝 워크플로를 모두 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1 소프트웨어 내에서 수행했습니다.

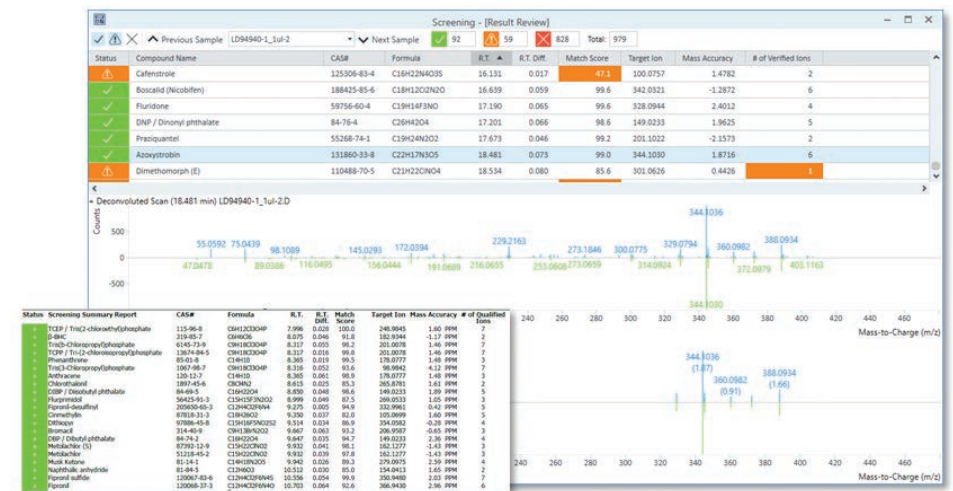


그림 3. Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.1의 EI PCDL 기반 스크리닝. 자동으로 확인된 화합물은 녹색으로 표시됩니다. 추가적인 검토가 필요한 화합물은 주황색으로 표시됩니다. 하단 부분에 부분 보고서 예시가 표시됩니다.

추가적인 수동 검토가 필요한 화합물은 주황색으로 표시됩니다. 라이브러리 매치 스코어 또는 확인된 이온 수와 같은 파라미터 하나에서라도 실패가 있는 잠정적인 매치 항목(주황색으로 강조 표시됨)은 스펙트럼에서 몇 개의 (그리고 선택적이지 않은) 이온만 있거나 낮은 감응을 갖는 경우를 제외하고 위양성일 수 있습니다. GC/Q-TOF 추정 물질 스크리닝 워크플로는 높은 유연성을 제공하므로 이러한 까다로운 화합물을 위해 분석법을 특별히 최적화할 수 있습니다.

GC/Q-TOF 스크리닝에서 *C. dubia*에 대한 사망률 %로 그룹화한 시료 간 감응 수준에서 약간의 차이를 나타낸 것으로 식별된

화합물은 표 2에 나타내며, 이러한 화합물은 잠재적으로 독성의 원인물질로서 조사해야 하는 대상입니다.

폐수 시료의 NCI 분석

또한, 앞서 설명한 폐수 추출물은 할로겐화 오염물질 및 전자 받개(electron withdrawing group)를 포함한 다른 화합물에 대해 최상의 분석 감도를 얻기 위해 NCI 모드에서 분석했습니다. NCI 데이터는 동일한 GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로를 사용하여 분석했습니다. NCI에서 GC/Q-TOF 스크리닝 접근법을 사용할 수 있도록 할로겐화 니트로 화합물과 전자 포획 그룹을 갖는 다른 오염물질의 NCI 스펙트럼을

포함하는 보다 특정한 PCDL을 생성했습니다. 평균적으로, NCI PCDL과 함께 NCI 모드를 사용하여 각 폐수 내 약 40종의 화합물이 확실하게 식별되었습니다. 그림 4와 표 3은 NCI 스크리너 결과를 보여줍니다. 소수의 화합물에는 오직 하나의 우세 이온 또는 동위원소 클러스터가 있으며 확인을 위해 추가 작업이 필요할 수 있지만(그림 4A), 대부분의 화합물은 PCDL 스크리닝 워크플로에 사용하기에 충분한 메탄 NCI를 가진 조각을 생성했습니다(그림 4B). 따라서 이 GC/Q-TOF 스크리닝 워크플로는 해당 PCDL이 있을 때 언제나 NCI 데이터에도 적용할 수 있습니다.

표 2. 디 추정 물질 스크리닝에서 선택된 결과. 감응 값은 시료에 대한 상대적인 수준에 기반해 색상으로 구분됩니다. 정량 이온에 대한 질량 오차와 라이브러리 매치 스코어도 표시됩니다.

시료	사망률 80%						사망률 20%						사망률 0%					
	LD94940-1			LD94940-2			LD94941-1			LD94941-2			LD94943-1			LD94943-2		
화합물 명	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어	감응	질량 오차	라이브러리 매치 스코어
TBEP/Tris(2-butoxyethyl) Phosphate	2013504	2.8	99.9	1502528	3.9	99.9	1289372	2.5	99.9	1559301	3.8	99.9	787113	3.1	99.9	784473	3.8	99.9
tert-Butylphenyldiphenylphosphate	16799	2.1	92.9	4948	3.2	74.6	2828	1.1	82.5	10468	0.8	91.9	2950	1.3	70.6	2766	0.8	91.9
Chlorantraniliprole	6298	0.2	76.8	5330	2.0	79.4	3572	1.7	63.2	3494	1.8	66.4	3458	1.1	52.4	2710	1.8	66.4
Flurprimidol	16518	1.3	80.4	15240	0.5	76.4	10698	2.6	73.7	12065	2.1	80.2	6038	2.0	74.2	4976	2.1	80.2
Paclobotrazol	16985	0.9	96.8	15763	1.6	98.7	10725	0.9	92.4	12090	2.1	94.9	9106	1.8	79.1	8448	2.1	94.9
TBZ/Thiabendazole	1570235	1.4	99.7	1536170	2.4	99.7	1282402	0.6	99.7	1368732	2.2	99.8	774093	0.6	99.7	675439	2.2	99.8
Azoxystrobin	134463	1.8	99.1	139960	3.0	98.9	109579	1.4	98.9	119004	1.7	98.8	104804	1.7	89.9	94511	1.7	98.8

표 3. NCI 추정 물질 스크리닝 결과

시료	94940-1		94940-2		94941-1		94941-2		94943-1		94943-2	
	감응	라이브러리 매치 스코어	감응	라이브러리 매치 스코어	감응	라이브러리 매치 스코어	감응	라이브러리 매치 스코어	감응	라이브러리 매치 스코어	감응	라이브러리 매치 스코어
Deltamethrin	16837	71.4	14202	42.7	6474	83.7	4138	36.3	3253	56.5	4294	36.3
Endosulfan sulfate	3372	98.8	3013	91.9	12182	98.9	11865	99.1	18103	98.8	15859	99.1
Fipronil sulfone	1184481	99.4	989538	99.3	1058932	99.4	898204	99.3	1218463	99.4	1089462	99.3
Chlorfenvinphos	22450	94.7	13196	86.3	16668	94.4	14469	94.7	14757	95.7	12834	94.7
Fipronil	1312800	98.7	1269915	97.7	1255881	97.1	1307988	96.8	1519654	95.8	1350814	96.8
Fipronil-sulfide	201344	99.9	192041	100.0	224062	100.0	218654	100.0	241255	100.0	274001	100.0
Chlorthal-dimethyl	1730		1409	94.1	1468	94.3	1489	96.2	2204	80.0	1807	96.2
Triadimefon	22376	94.1	16547	94.2	19705	96.0	17006	96.4	18710	97.2	16675	96.4
Malathion	474	86.6	249	86.6	0	-	0	-	0	-	0	-
Fipronil-desulfinyl	128886	97.8	111722	97.8	122423	97.8	119001	97.9	164450	97.8	135773	97.9
Chlorothalonil	23789	99.4	12226	99.2	14367	99.0	15765	99.1	14714	99.2	12680	99.1
BHC-beta	36573	88.4	19696	91.7	25594	81.4	19439	84.7	23983	69.4	13527	84.7
Dicloran	30089	92.3	33303	93.2	34005	92.6	39632	93.8	44118	95.1	35911	93.8
Hexachlorobenzene	13573	99.3	10353	99.6	11863	99.3	9934	99.1	14371	98.7	12048	99.1
Trifluralin	10334	86.6	11119	94.1	12089	94.2	11454	92.8	13550	94.5	9293	92.8
2,4-Dinitrotoluene	81406	90.1	91627	89.0	75770	84.4	67256	83.3	43423	91.1	41979	83.3
2,4,6-Trichlorophenol	2551498	92.2	2250861	91.6	2525758	91.5	2544336	91.4	2707308	91.2	2736603	91.4

EI 및 NCI 스크리닝 접근법을 사용하여 많은 농약을 포함한 폐수 시료에서 수많은 환경 오염물이 식별되었습니다. 그러나, 폐수 시료에서 fipronil 및 fipronil 분해 생성물을 포함한 이러한 물질 중 대부분은 독성이 없다는 것으로 식별되었으며(표 3), 관찰된 독성의 원인일 가능성이 낮습니다.

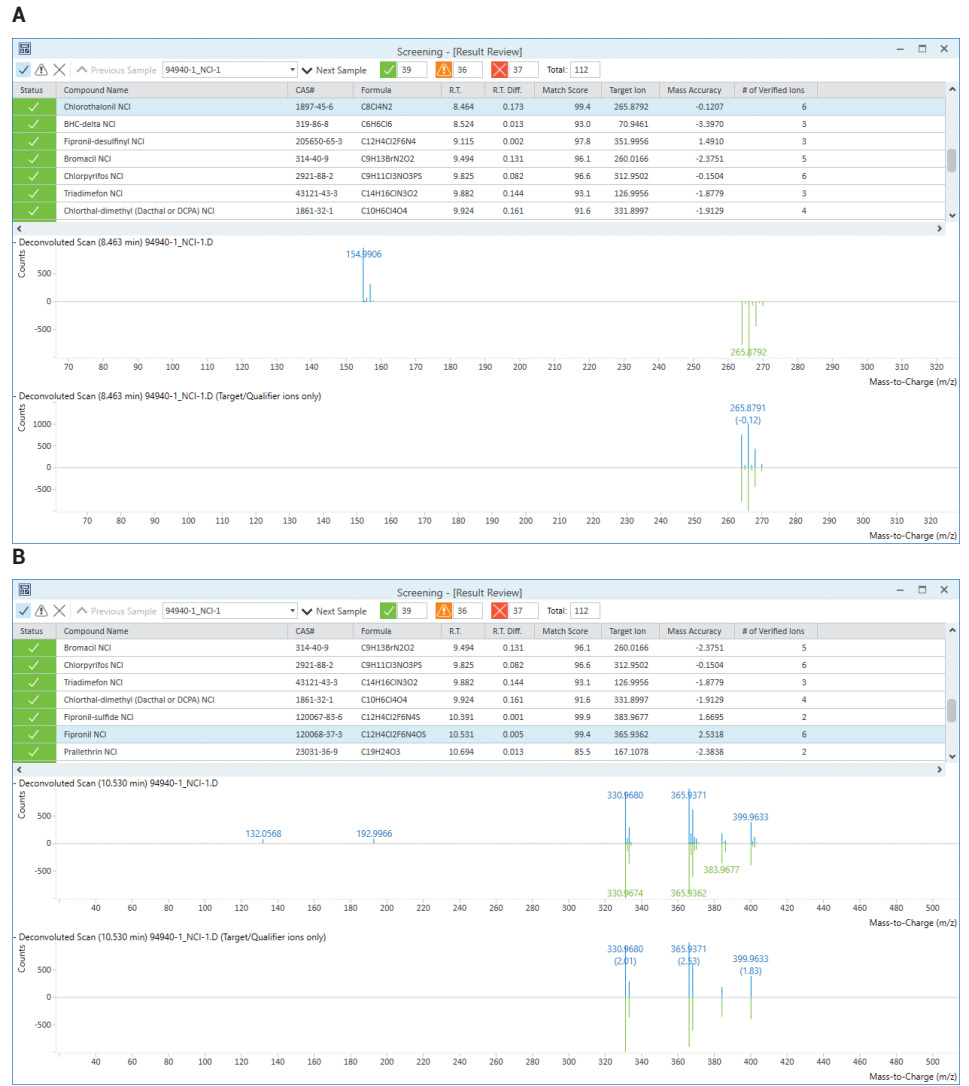


그림 4. NCI에서 추정 물질 스크리닝을 사용하여 식별된 화합물의 예시. 하단의 mirror 플롯은 스크리닝 알고리즘으로 선택된 대부분의 특정 이온에 대한 스펙트럼 매칭을 보여줍니다. A) 매우 간단한 NCI 스펙트럼을 가진 매치 항목. B) NCI 스펙트럼에서 확인을 위한 충분한 수의 이온을 가진 매치 항목의 예시

폐수 시료의 비표적 분석

폐수의 독성 증가와 관련이 있을 수 있는 추가 오염물질을 식별하기 위해 비표적 워크플로를 이용하여 데이터를 처리했습니다. 이 접근 방식에서는 Unknowns Analysis를 이용한 특징 추출 및 NIST 17 라이브러리 검색을 포함하고, 그 다음 MPP에서 높은 수준의 독성을 나타낸 시료에서 함량이 높은 화합물을 식별하기 위한 차이 분석을 수행합니다(그림 2).

Unknowns Analysis에서 식별 및 미식별된 성분을 화합물 교환 포맷(.CEF) 파일로 내보내고 MPP로 가져왔습니다. 주성분 분석(PCA) 플롯에서 독성이 다른 3가지 폐수에 대응하여 3개의 그룹으로 명확하게 분리된 결과를 볼 수 있습니다(그림 5).

배수 변화 대 통계적 유의성을 보여주는 volcano 플롯은 대량의 데이터셋 변화를 시각화하는 데 도움이 될 수 있으며, 본 연구에서는 80% 및 0%의 사망률 그룹 사이의 차이를 신속하게 검출하는 데 사용되었습니다(그림 6). *C. dubia*에 대해 0%의 사망률을 나타낸 폐수 추출물에 비해, 80%의 사망률을 나타낸 폐수 내 많은 화합물이 현저히 더 높은 수준으로 발견되었습니다. 이러한 화합물은 volcano 플롯의 오른쪽 상단에서 찾을 수 있으며 빨간색으로 표시됩니다.

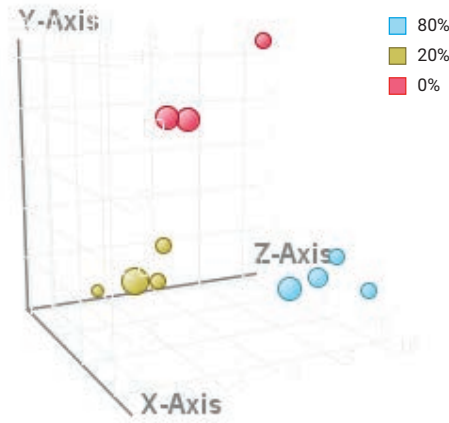


그림 5. 폐수 추출물이 독성에 따라 세 그룹으로 명확하게 분리되었음을 나타내는 PCA 플롯

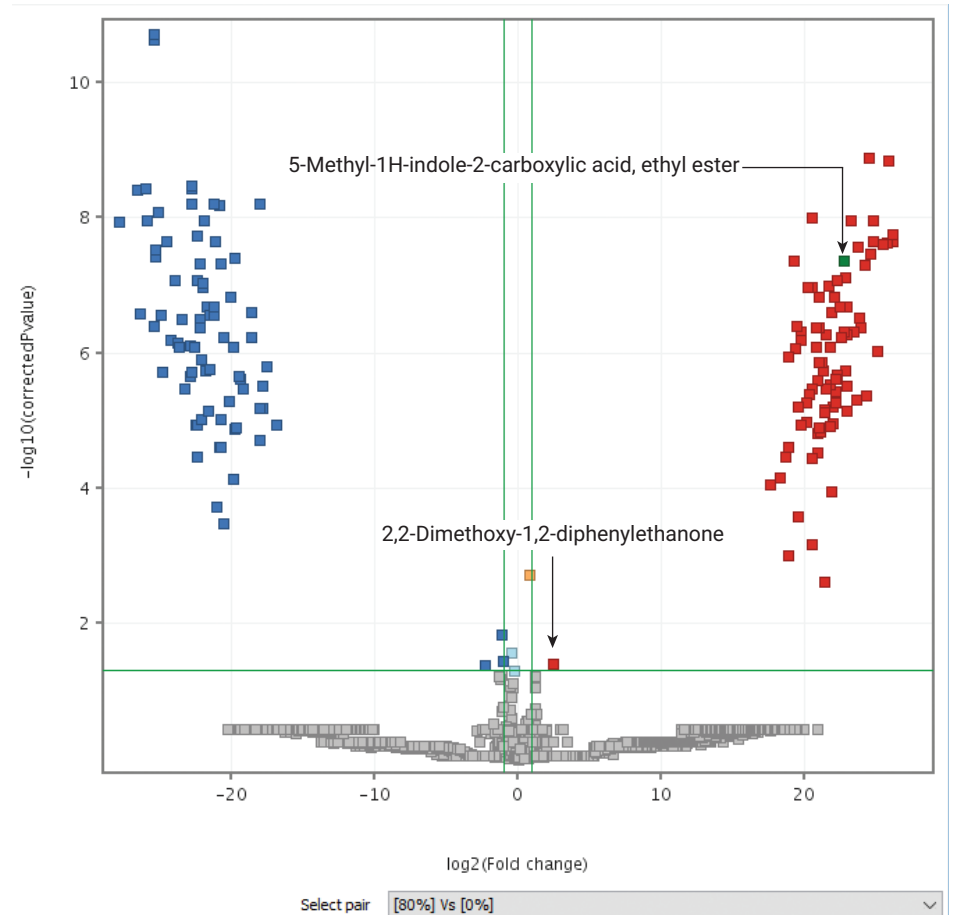


그림 6. 80% 사망률 그룹과 0% 사망률 그룹을 비교한 volcano 플롯. Volcano 플롯의 오른쪽 상단에 빨간색 사각형으로 표시된 화합물은 폐수 내 상당히 높은 수준으로 존재하며 0% 사망률과 80% 사망률을 특성 규명한 결과를 나타냅니다.

폐수의 독성과 해당 추출물에 존재하는 잠정적으로 식별된 화합물 사이의 상관 관계를 더 상세히 조사하기 위해 상관 분석을 수행했습니다. FC cutoff가 2이고 $p < 0.05$ 인 3가지 폐수 독성 그룹에 대한 배수 변화(FC) 분석 결과를 상관 분석을 위한 물질 목록(그림 7A)으로 사용했습니다. 사망률 백분율을 필터링 파라미터로 선택했습니다. 강한 상관 관계가 있는 화합물만 표시하기 위해 cutoff가 0.6인 Pearson 유사성 측정을 선택했습니다(그림 7B 및 7C). 다음 섹션에서 논의된 바와 같이 volcano 플롯과 상관 분석에서 잠정적으로 확인된 몇 가지 화합물(그림 6 및 7C)을 추가적인 화합물 ID 확인 대상으로 선택했습니다.

잠정적 매치 항목 검증 및 미지 성분 식별

폐수의 독성과 관련이 있는 화합물을 확인하기 위해 Unknowns Analysis의 ExactMass(조각 화학식 주석) 기능을 사용했습니다(그림 8A 및 8B). NIST 17.L 라이브러리를 사용하여 라이브러리 매치 스코어가 85.9인 2,2-dimethoxy-1,2-diphenylethane으로 잠정 식별된 화합물은 잠정 매치 항목의 분자식을 고려했을 때 모든 조각 이온에서 작은 질량 오차를 나타냈습니다(그림 8A). 조각의 m/z 가 잠정 매치 항목의 분자식과 매치하지 않기 때문에 관심 대상인 두 번째 화합물은 잘못 식별되었습니다(그림 8B). 이 화합물의 티 스펙트럼은 검출 가능한 어떤 분자 이온도 제공하지 않았기 때문에, PCI를 사용하여 분자 이온을 식별하고 MassHunter Qualitative Analysis의 Fragment Formula Annotation 도구를 함께 이용하여 이 미지 물질에 대한 분자식을 제안했습니다(그림 8C). PubChem 데이터베이스는 acetyl triethyl citrate(그림 8C)에 해당하는 이 화합물의 구조를 이 화합물의 화학식과 가장 관련이 높은 것으로 제안했습니다.³

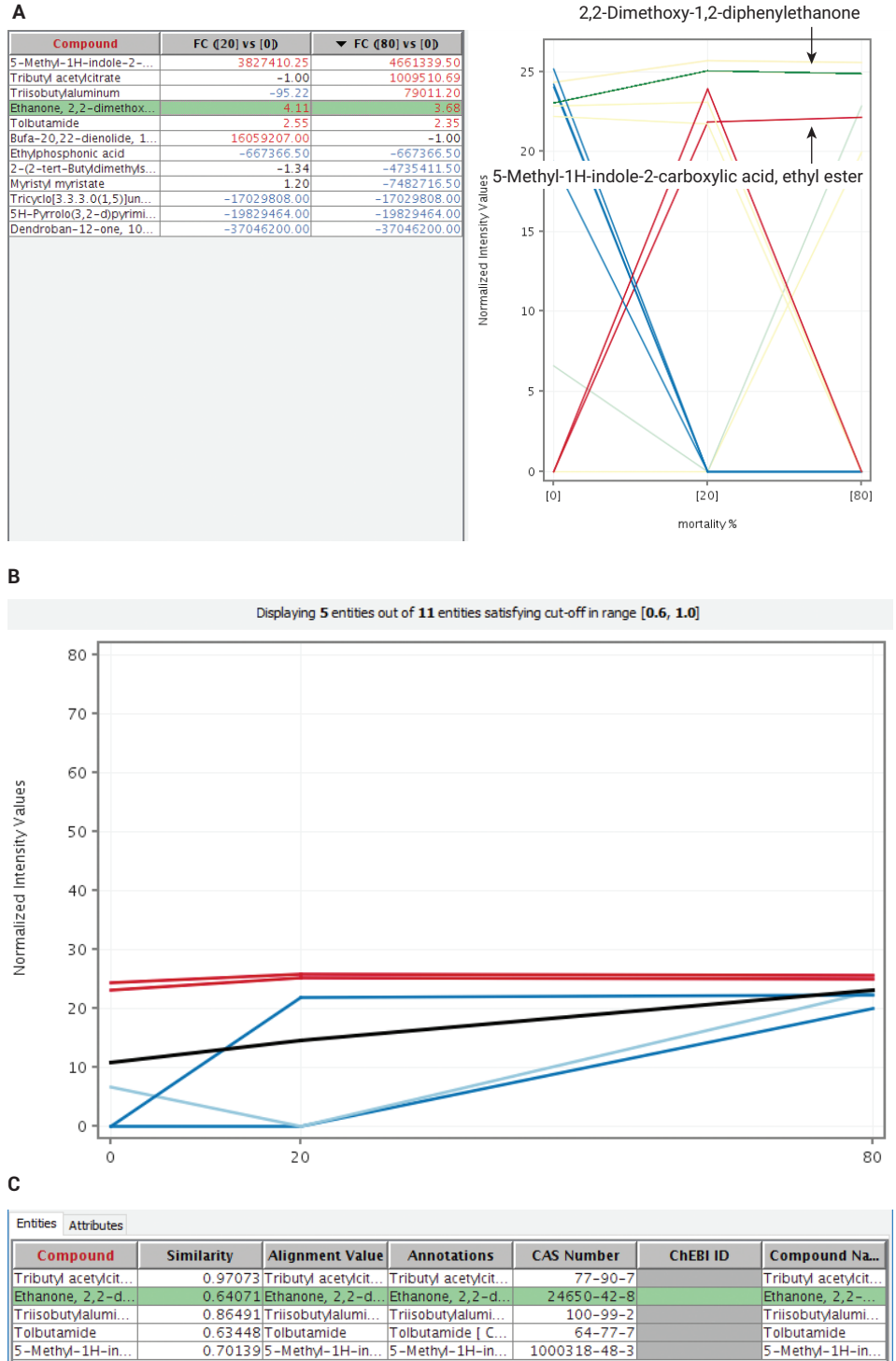


그림 7. 애질런트 MPP의 상관 분석. A) 3개 폐수 시료에 대한 배수 변화(FC) 분석; B) 파라미터 출력 필터; C) 유사성 cutoff 0.6을 사용할 때의 상관 분석 결과 화합물 목록

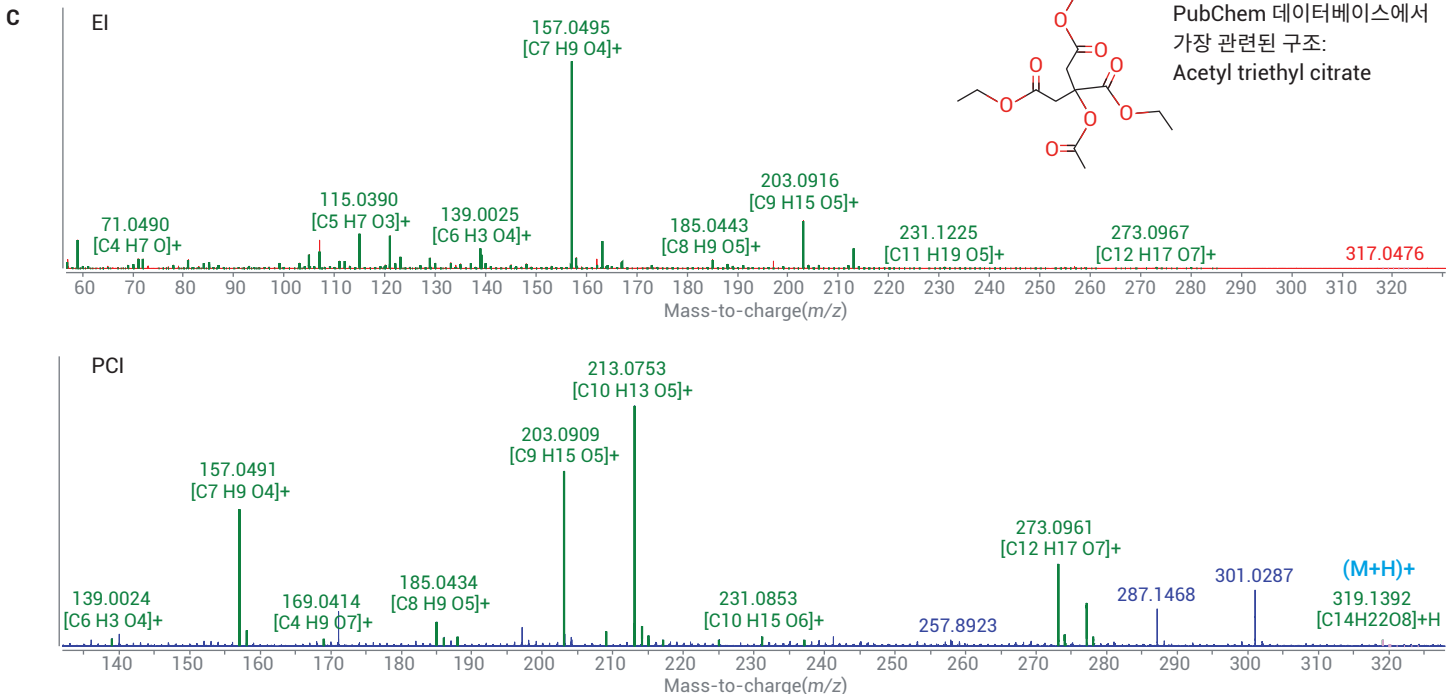
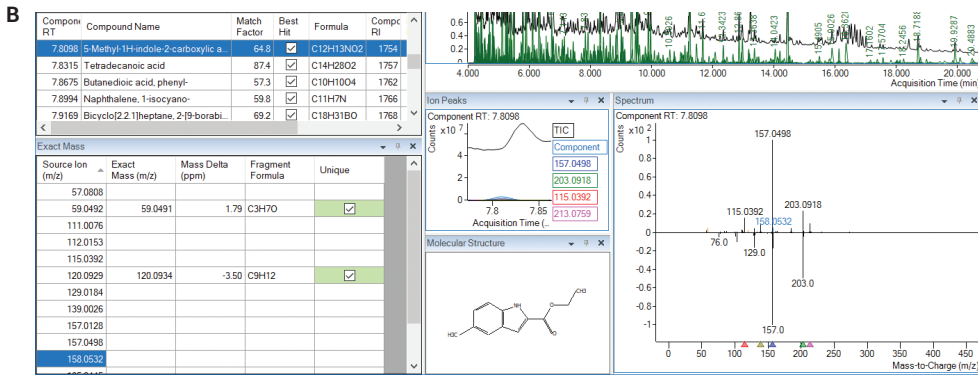
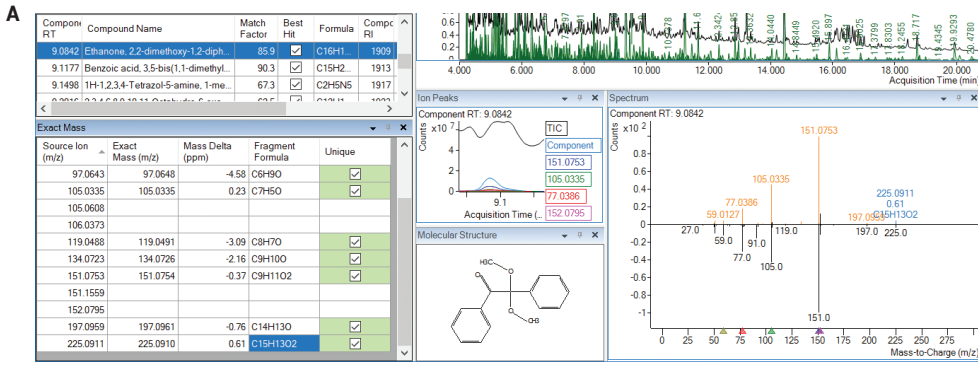


그림 8. ExactMass 기능과 함께 Unknowns Analysis를 사용한 화합물 검증 및 식별: (A) 확인된 ID, (B) 거부된 ID 및 거부된 ID를 갖는 화합물에 대한 EI(C, 상단)와 PCI(C, 하단) 스펙트럼의 Agilent MassHunter Qualitative Analysis의 Fragment Formula Annotation

결론

Agilent 7250 GC/Q-TOF 시스템을 사용하여 비표적 스크리닝과 결합된 티 및 NCI 환경 오염 추정 물질 스크리닝 접근법을 보여주었습니다. Flurprimidol, paclobutrazol, azoxystrobin 및 chlorantraniliprole과 같은 농약을 포함한 몇 가지 관심 대상 화합물이 어느 정도의 독성 수준과 관련된 시료에서 주로 식별되었습니다.

비표적 접근법은 *C. dubia*의 사망률과 관련이 있을 수 있는 추가 화합물을 식별하는 데 도움이 되었습니다. 비표적 접근법은 극미량 화합물 수준에서 약간의 차이를 검출할 가능성이 낮지만 추정 물질 스크리닝 접근법과 달리, accurate mass PCDL를 벗어난 잠재적인 오염물질을 찾을 수 있습니다.

참고문헌

1. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (**2015**).
2. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Memorandum: Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data within the Office of Foods and Veterinary Medicine (**2015**).
3. Kim, S. *et al.* PubChem 2019 Update: Improved Access to Chemical Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47(D1), D1102-1109.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 9월 16일, 한국에서 인쇄,
5994-1345KO

한국에질런트 테크놀로지스(주)
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

