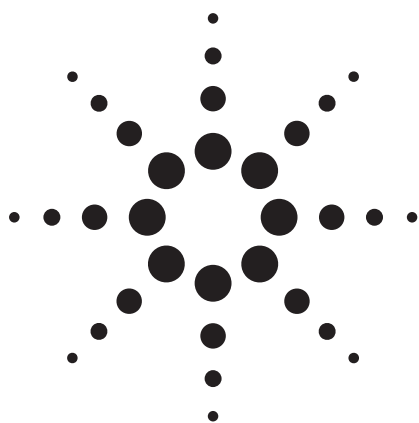


5975C シリーズ MSD: メソッド最適化と微量イオン検出 (TID)

技術概要



Randy Roushall, Harry Prest

緒言

ChemStation ソフトウェア (G1701EA) と 5975C MSD のハードウェアの改良によって、メソッドの改善を図ることができます。本資料ではその内容について紹介します。

イオン源温度上限の上昇 [1]

5975C MSD では、イオン源の使用温度上限が 350 °C に引き上げられました。アップグレードにより、5975A、B および 5973 MSD システムでも同様のことが可能になります。イオン源温度をデフォルトの 230 °C 以上にすると、化合物のレスポンス、クロマトグラムのピーク形状が向上し、使用可能期間が延びます。

ゲインをノーマライズしたチューニング [2]

アバンダンスに対してチューニングする標準手法の代わりに、特定の電子増倍管 (EM) ゲインを目標としたチューニングを MSD に対して行うことで、大きな利益を得られる可能性があります。増倍管の経年変化にもかかわらず、安定したレスポンスと、異なる機器間で比較可能な結果も得ることができます。特定の EM ゲインを目標とすることで、柔軟性が高くなります。相対的に高濃度のサンプルでは、低いゲインにより、最適で再現性のある操作が可能になります。低濃度や微量の分析では、HiSense.U チューンにより、 15×10^5 の EM ゲインを設定することで、メソッド検出下限近くでの操作において、再現性の高い検出と定量が可能になります。

微量イオン検出 (TID)

コンピュータ制御のデータシステムと高度なエレクトロニクスが質量分析にもたらした重要な貢献は、生の取込データを処理する能力です。これらのプログラムは、表には出てきませんが、長期にわたってファームウェア上または後処理のどちらかで動作しており、研究の有効な手段であり続けています。これらのアルゴリズムが生データを処理し、ピーク質量とアバンダンスの割り当てを行うことで、ユーザが検討できるスペクトルまたは再構成イオンクロマトグラムとして提供します。パフォーマンスエレクトロニクスパッケージの出現により、アジレントは微量分析での化合物検出という困難な分野において、既存手法の改善を模索してきました。その結果、5975C MSD の ChemStation G1701EA ソフトウェアで利用可能な、微量イオン検出 (TID) 操作モードの開発につながりました。

微量イオン検出を有効にする

ChemStation G1701EA ソフトウェアで、TID は機器メニューから設定できます(図 1 参照)。チェックボックスを設定し、メソッドを保存するだけで、TID モードで取得する取込メソッドを作成します。



Agilent Technologies

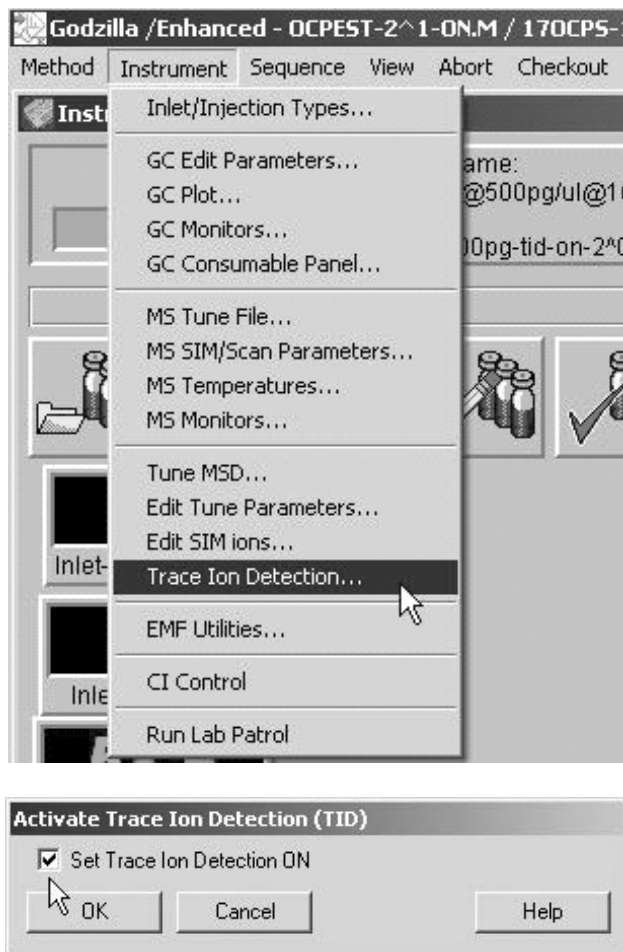


図 1. 微量イオン検出を有効にする。

化合物の検量線が、TID オンまたは TID オフのいずれかで一貫して取り込まれ、混ざっていないデータから構成されていることが重要です。TID はピーク高さと同面積、つまり化合物レスポンスに影響を及ぼします。

TID の検討事項とアプリケーション

質量分析のメソッドの設計では、常に二律背反がありました。“可能な限りゆっくりとスキャンする”というルールにより、機器のスキャン速度の選択については注意深く検討する必要があります。スキャン速度を速くするほど、クロマトグラムピーク全体にわたるデータポイントは多くなりますが¹、カウントされるイオンの量は少なくなり、ピークとスペクトルはノイズが多くなります。スキャン速度を落とすほどピーク上のスキャン回数は少なくなります、スペクトルの質が良くなり、その結果としてライブラリ検索結果や同位体イオン比などが良く

¹ほとんどの場合、用語“ピーク”は、イオン電流または全イオン電流で作成されたクロマトグラム上のピークについて言及しており、化合物に対応したものであり、マススペクトル上のものを示していません。

なるため、妥協点を見出すことが必要となります。質量分析における経験則として、良い定量結果を得るにはピークあたり 8 回以上のスキャンを、そして良いライブラリヒットを得るためには、ピークあたり 4 回以上のスキャンが使用されてきました。化合物のクロマトグラム上のピーク幅で定量する際、必要な速度以上に速くスキャンすると、“よりノイズの多い”データと数値の悪化を生じ、その結果として検出下限を低下させてしまうことも経験してきました。ハードウェアとソフトウェアの改善により、この状況が好転することが期待されます。5973 Inert と 5975 シリーズ MSD のパフォーマンスエレクトロニクスパッケージは、上記の改善を実現しました。高度なピーク検出アルゴリズムに相当するソフトウェア手法が幅広く研究されてきましたが、微量イオン検出は独自の技術革新の手法です。

ある意味で、TID は“フィルタリング”アルゴリズムであるため、ピークは“平滑化された”ように見えます。このフィルタリングは、“平均化”の高度な形であるため、期待されるピーク形状に対し、特にピーク高さの損失とピークの広がりがあります。変化の度合いは、ピーク上のサンプリング数に直接反映されます。例として、4 つの化合物の定量イオンの再構成した抽出イオンクロマトグラム (REIC) を図 2 に示します。この図から、ピーク上のスキャン数が増えるほど、TID オンと TID オフのクロマトグラムの各ピークの高さは同じようになり、ピーク形状は一致する傾向を示すことが分かります。すべての場合において、ピーク面積は 10% 以内で一致するため、損失はありません。これは、TID を用いるとピーク高さが下がりますが、バックグラウンドも下がり、ピークがわずかに広がり、ほぼ同じ面積になるためです。

TID と化合物のスペクトル

高濃度の場合、図 2 のように、TID の一般的な影響が見られる可能性があります、その実際の効果はノイズがシグナルに影響を及ぼし始める低濃度の場合にだけはっきりと見えます。最初の検討事項は、スペクトル品質に及ぼす TID の影響になります。図 3 に、TID の使用/不使用で取り込まれた標準試料中の低濃度の化合物 4 種類について、NIST 2005 スペクトルライブラリに対する PBM 検索の結果を示します。ピークは PBM 一致率の数値が付けられ、TID を適用した場合の一致率が大幅な向上を示しています。200 m/z 未満の質量範囲において、中間にある質量の絶対強度が抑制されている、図の右側にあるスペクトルの質の向上に注目してください。全体的に、TID モードでの再構成全イオンクロマトグラムのベースラインは、ノイズが抑制されたため、TID を用いない場合よりも変動をあまり示しません。

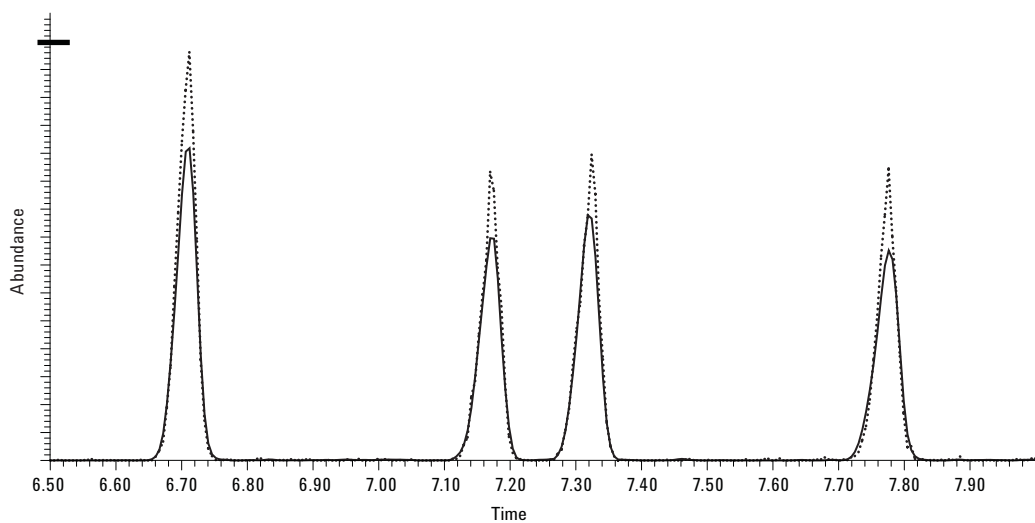
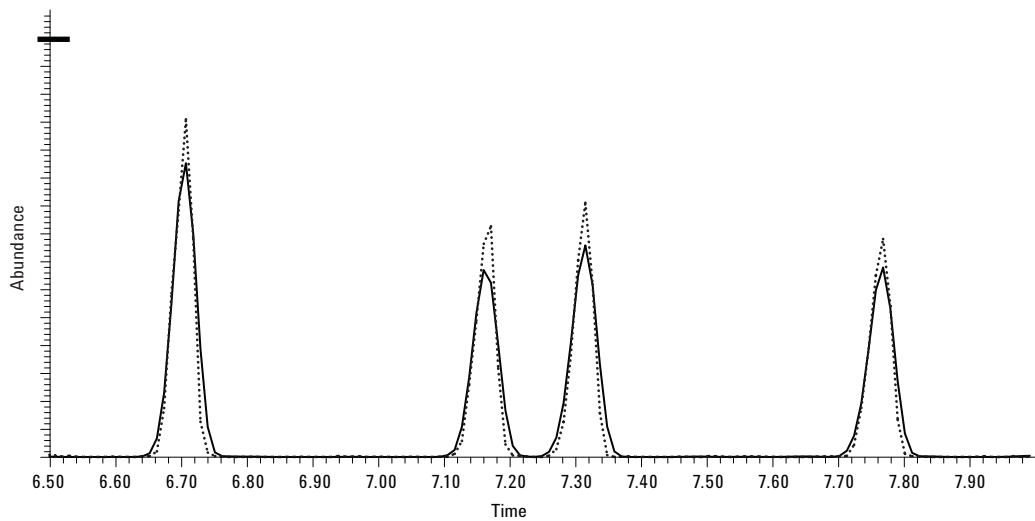
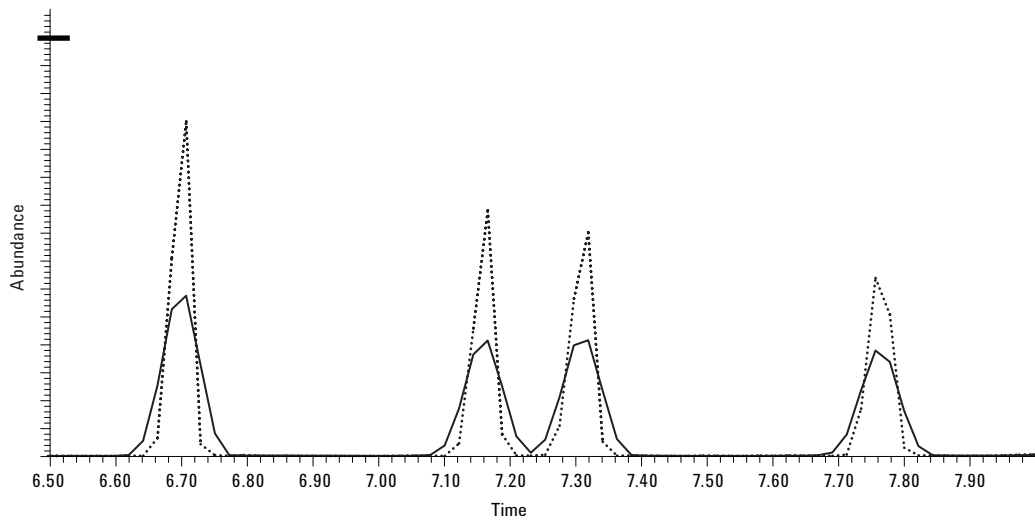


図 2. 微量イオン検出モードオン (—) と (.....) のクロマトグラム。定量イオンの REIC は、様々なサンプリング条件を用いて取り込まれたクロマトグラフピークに及ぼす影響を示しています。上段、5 スキャン/ピーク。中段、9 スキャン/ピーク。下段、18 スキャン/ピーク。

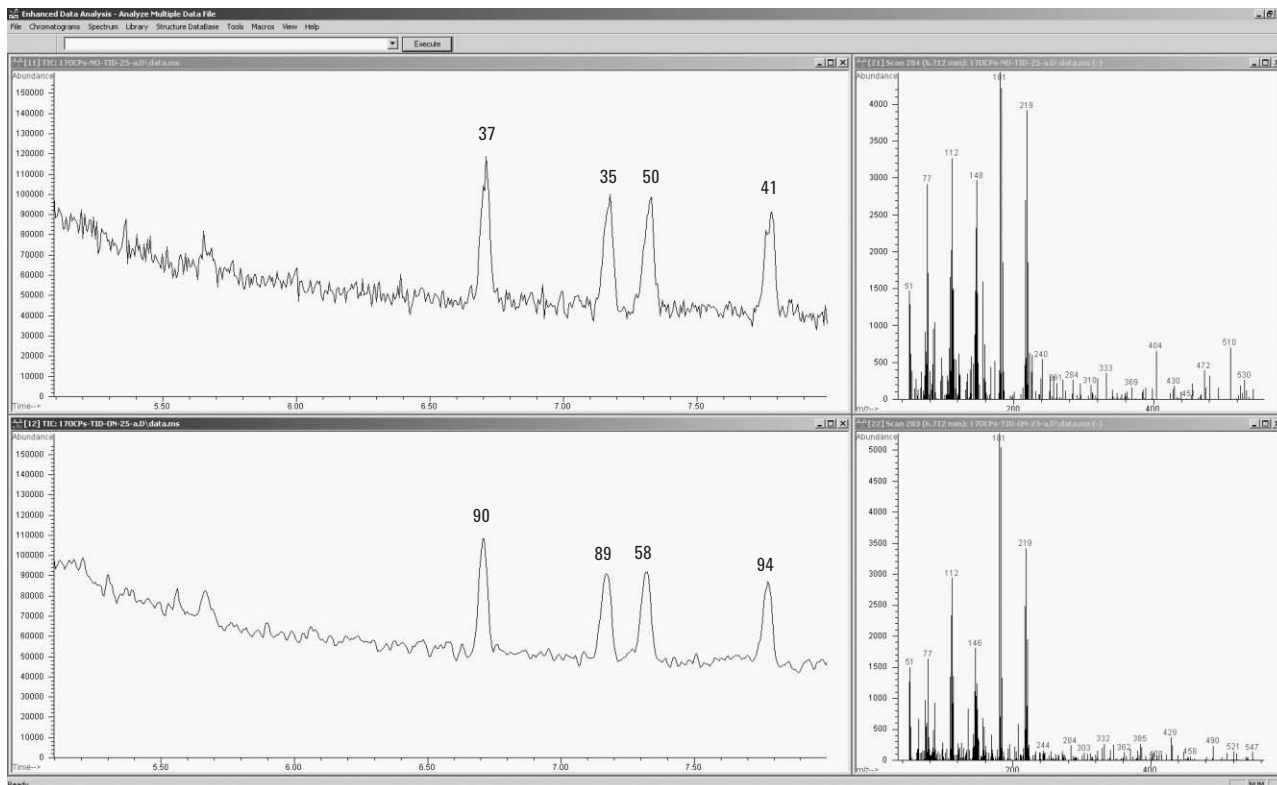


図 3. TID の使用/不使用中で取り込まれた再構成全イオンクロマトグラム。ピークには、TID 不使用 (上段) と TID 使用 (下段) で、PBM ライブラリ検索結果での一致率の数値が付けられています。ピークのスペクトルは固定のバックグラウンド範囲のもの差し引いています (5.5 ~ 6.5 分)。

TID と定量

TID を用いた場合のピーク高さの減少は、特に低濃度でシグナル高さが下がる場合、定量と検出下限に関する問題を引き起こすことがあります。表 1 には、TID の使用/不使用中で取り込まれた、4 種類のモデル化合物に対する、シグナル - ノイズ (S/N, rms) 比の相対的増加を示します (スキャンモードでの 4 回の取り込みの平均として)。S/N 比の増加は、TID は、すべての濃度でのノイズを抑えながら、シグナルをよく維持することを示します。低濃度で S/N 比が良いということは、化合物の優れた検出下限を意味しています。

表 1. 様々な濃度における、TID 使用/不使用中での、4 種類のモデル化合物に対する RMS での S/N 比における平均の相対的増加 (4 種類の化合物それぞれに対して、4 回の反復したデータ採取での平均)

濃度 (注入量 pg)	25	50	100	250	500
平均の相対的増加 rms S/N 比で (n = 4)	20%	34%	79%	48%	61%

化合物の検出下限、特に定量下限の関連する側面は、特定イオンのピーク面積の繰り返し再現性です。図 4 は、TID の使用/不使用中での濃度に対するピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を示しています。分析者は、化合物濃度が下がる際にピーク面積が変動しやすくなることを熟知しています。これは、注入の再現性、クロマトグラフの懸案事項などの他、化合物の定量下限に影響する化合物のスペクトルの特徴などの複数の機器的側面によるものです。図 4 からは、高濃度では再現性が高く、RSD が小さく、TID オンとオフの間で大幅には変わらないことが分かります。しかし、濃度が低下した場合、再現性は悪化し、RSD は大きくなります。黒いマーカーからは、濃度が低い場合に、TID がピーク面積の再現性を維持し、良好な化合物の検出下限を維持していることを示しています。また、イオンのプロファイルが改善されるとさらに安定したピーク形状を生じ、結果として良いピーク積分結果に結び付きます。

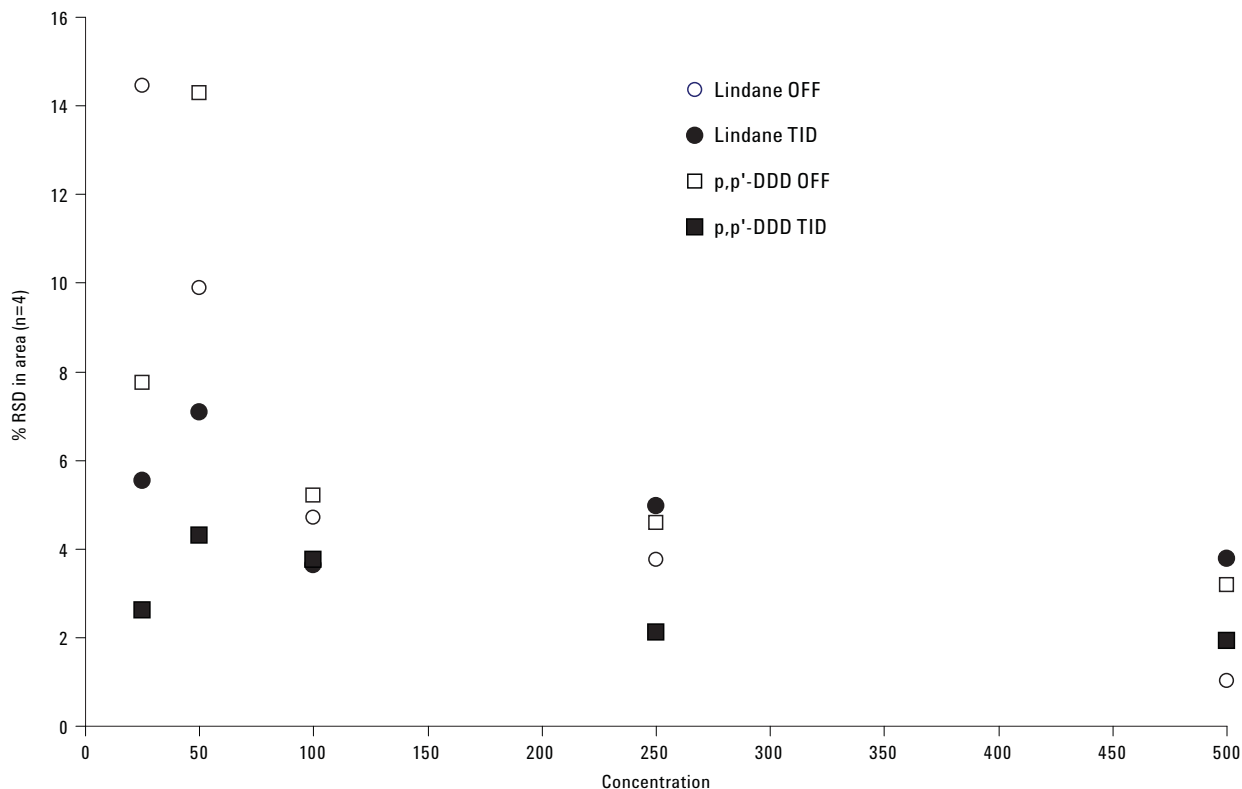


図4. TID オフ (白マーカー) と TID オン (黒マーカー) の場合での、2 種類の農薬における定量イオンのピーク面積の濃度に対する相対標準偏差。

要約

微量イオン検出は、GC/MS での化合物検出と定性を向上させる革新的な手法です。TID を適用することで、ユーザは質の向上したプロファイルデータを得ることが出来るようになり、その結果以下のことが達成されます。

- ピーク形状が良いことによる、安定した積分結果
- 複雑なサンプルにおける、よりよいスペクトルの一致
- 検出下限を向上させる S/N 比の向上
- 検出下限を向上させる、優れたピーク面積 (およびピーク高さ) の再現性

定量に用いられる化合物のピーク面積またはピーク高さは、クロマトグラムのピーク全体に影響し、この手法は多くのサンプルに対して適用しやすいため、TID は定量分析の改善に役立ちます。通常、ピークの“オーバーサンプリング”は、“ノイズの多い”シグナルを生じ、スペクトル信頼性を損なう場合があります。しかし、TID はこれらの状況で分析の質を維持し、優れた分析結果を導きます。

TID の適用に関する質問

TID と選択イオンモニタリング (SIM): SIM で TID を適用できますか?

TID では、取込モードの設定により、SIM データ採取を可能にします。スキャンに対する前述の記述通り、同じ効果と結果が、SIM の結果に適用されます。定量のための SIM での標準的な状況にあり、モニターすべきサンプルピークの数が多い場合、TID は良い結果をもたらします。化合物ピーク高さを用いているユーザ (農薬分析など) は、TID により下げられたように見えても、ピーク高さの値の改善に気付くでしょう。

定量に用いられるすべてのデータは、一貫性のある結果を得るために、TID オンまたは TID オフのどちらかで採取し、混合しないことが重要です。

GC/MS メソッドに変更を加える必要はありますか?

TID を有効にすることで、(MS パラメータの) スレッシュホールドを下げるのが期待できます。また、抽出イオンのウィンドウをデフォルトの $-0.3 \sim +0.7$ から、 ± 0.3 または $\pm 0.4 m/z$ に狭めることを検討できます。TID により、より安定したイオンの質量のアサインメントを行い、ウィンドウ幅を狭めることで、干渉により覆い隠されるピークを少なくします。

現在のメソッドに TID を追加するにはどうしたらよいでしょうか?

緒言で述べたように、メソッドを全体的に確認する必要があります。ゲインをノーマライズしたチューニングおよび最適化を行うと、イオン源温度の設定次第でメソッドを劇的に改善できる可能性があります。TID の使用/不使用での反復注入で低濃度の標準試料とサンプルを分析すると比較を行うことができます。また、TID を用いて、より狭い質量アサインメントウィンドウを試してください。直線範囲は変わりません。

TID の適用で、何か気を付ける必要はありますか?

TID ピーク形状はわずかに広がるため、共通のモニターイオンを持ち、近傍して溶出する化合物 (多環芳香族炭化水素など) では、クロマトグラムピークの分解能が低くなる可能性があります。クロマトグラムのピーク形状が広がることがある一方、形状の改善も示すことになり、簡単かつ安定した積分結果が得られます。このように、TID は優れたデータを生み出します。

どのようなメソッドで、TID の利点が見られますか?

クロマトグラム上に多くのピークがあるサンプルにおける定量を目的としているメソッドでは、大幅な改善が見られます。定圧モードを用いる GC メソッドは最も利点が見られます。定圧モードでは、GC 装置間の化合物のリテンションタイムでの高い再現性を可能にしますが、質量分析にとって最適なモードではありません。定圧モードでは、オープン温度が上昇した時に、キャリアガスの線速度が低下するため、早く溶出するピークは、遅く溶出ピークよりも鋭く (または狭く) なります。そのため、早く溶出するピーク上で最適なスキャン数を持つ MS メソッドは、遅く溶出するピーク上ではスキャン数が多くなりすぎます (MS メソッドを分けない限り)。化合物のクロマトグラムのピーク上におけるスキャン数が多すぎることの代償は、カウントされるイオン量が少なくなることです。TID は、この問題を大幅に改善します。

参考文献

1. Charles Thomson, Carolyn Broadbent, and Harry Prest, "The 5975C Series MSD: Guidance in Implementing High Ion Source Temperatures," Agilent technical overview 5989-6051EN.
2. Jeffrey T. Kernan and Harry Prest, "The 5975C Series MSDs: Normalized Instrument Tuning," Agilent technical overview 5989-6050EN.

詳細情報

弊社の製品およびサービスに関する詳細情報は、ホームページ www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料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。また、本資料掲載の装置類は薬事法に基づく登録は行っておりません。

本資料に記載の情報、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、本資料の複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

© Agilent Technologies, Inc. 2007

Printed in Japan
March 7, 2007
5989-6425JAJP

