Cerno Bioscience MassWorks: Agilent GC/MSD를 이용한 검교정 데이터 수집

응용 자료

저자

Harry Prest, Ph.D.
Senior Chemist in GC-MS
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd
Santa Clara, CA 95051
USA

Yongdong Wang, Ph.D.
Principal Scientist
Cerno Bioscience
14 Commerce Drive
Danbury, CT 06810
USA

소개

Cerno Bioscience MassWorks는 데이터 수집 후 소프트웨어 솔루션으로, 기존의 한계를 넘어 질량 정확도를 확장하고 MS 정성 분석에 스펙트럼 정확도를 더합니다. 이 혁신적인 검교정 알고리즘[1]은 화합물 식별에 도움이 되는 분자 또는 조각 이온에 대한 질량 배치 신뢰도를 높히고 개연성 있는 분자 화학식을 제안할 수 있습니다[1,2]. 이 접근법을 적용하기 위해서는 관련 검교정을 이용한 적절한 형식의 데이터로 수집해야 합니다. 이 문서는 MSD Productivity ChemStation 소프트웨어(ChemStation)를 사용하여 Agilent GC/MSD의 전자충격 이온화(EI) 모드에서 필요한 “내부(internal)” 및 “외부(external)” 검교정 데이터를 수집하는 방법을 요약하였습니다. 화학 이온화(CI) 모드의 검교정 확장은 간단해야만 합니다.

Agilent Technologies

기기 설정

MassWorks 소프트웨어에 적합한 질량 분석 검출기(MSD) 데이터를 얻으려면 raw 스캔 모드에서 수집해야 합니다. 이 기능은 ChemStation G1701DA 소프트웨어 버전 D.02.00 이상에서 사용할 수 있습니다. Raw 스캔 모드를 시작하기 위해 **MS SIM/Scan Parameters** 창을 띄웁니다(그림 1). **Acq Mode**를 **Raw Scan**으로 설정합니다. 이 항목이 옵션에 없다면 소프트웨어 버전을 확인하십시오. 이 메뉴에서 사용할 수 있는 다른 중요한 파라미터는 **Solvent Delay**(데이터 수집 전, 분(min) 단위의 지연 시간)와 **EMV 모드**입니다. 수집 중에 **Gain Factor**를 선택하여 사용하는 것이 좋습니다. 신호 이온 흐름(signal ion current)을 한계 값 이내로 유지하는 데 매우 수월하도록 사용자는 **Gain Factor**를 이용하여 신호의 크기를 직접 조절할 수 있습니다[3].

Edit Scan Parameters에서 일반적인 파라미터도 최적화합니다. 이 값은 amu 스캔 범위(**Start at Mass**와 **End at Mass**), 임계값(0으로 설정)과 시료의 수입니다(**Sampling Rate**) (그림 2).

일반적인 규칙을 적용합니다. 관심 화합물 스펙트럼을 커버하도록 질량 범위는 최대한 짧게 설정하고 최상의 통계로 데이터를 수집하려면 속도는 가능한 낮게(또는 **Sampling Rate**는 가능한 높게) 설정합니다. MassWorks는 크로마토그래피 피크의 7~25회 스캔을 선호합니다. 또한 더 높은 질량 조각만 관심 있는 경우, 스캔 범위를 좁힐 수 있으며 더 높은 시작 질량(**Start at Mass**)을 사용할 수 있습니다. 스펙트럼 정확도[4]를 98% 이상을 달성하려면 크로마토그래피 피크 전체에서 평균 질량 스펙트럼을 측정할 때 신호 대 잡음 비율이 최소 50:1이어야 합니다. 이는 스캔 범위 또는 스캔 속도와 같은 주어진 수집 모드에서의 관심 이온의 검출 한계보다 약 17배 높은 수치입니다. 이는 크로마토그래피에 따라 탐구하여야 하지만 표준 컬럼(내경 0.25mm 및 길이 30m)에서 일반적으로 샘플링 속도 n은 2 또는 3으로 설정합니다. 다시 한번, MassWorks의 임계값은 0이 가장 좋습니다.

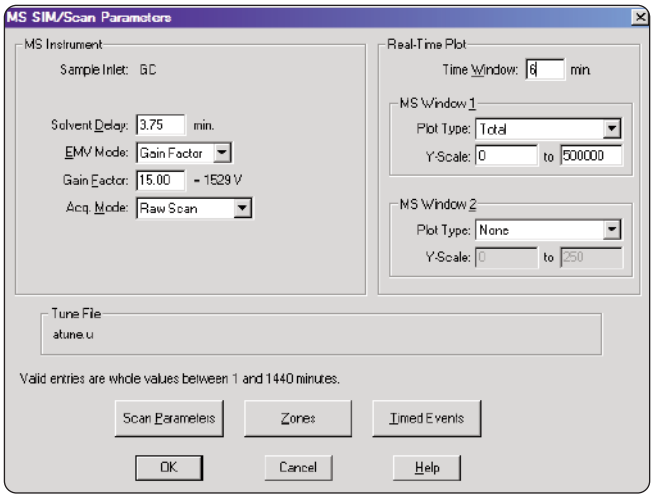
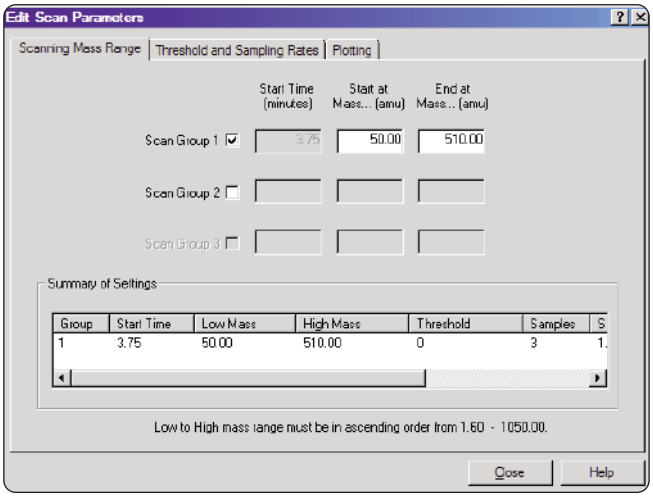


그림 1. MS Parameters 창



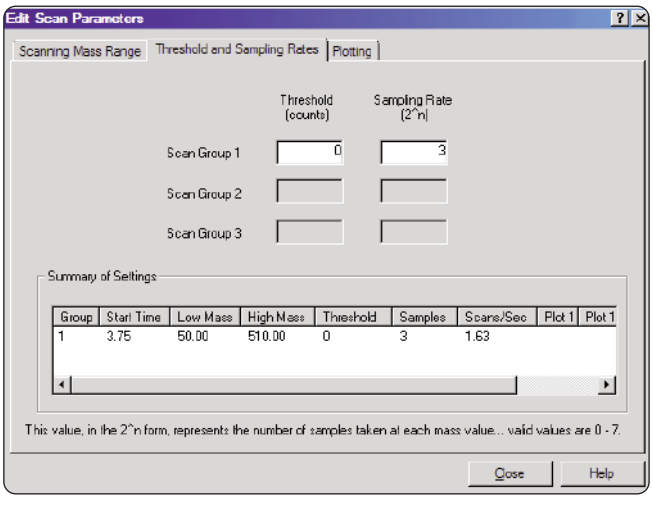


그림 2. Scan parameters 창(상단)과 임계값 및 샘플링 속도(하단) 창

MassWorks 검교정 분석법 생성

MSD EI 검교정 가스인 PFTBA는 MSD 기기 튠(tune)에 사용하며(이온 *m/z* 배치 검교정과 피크 너비 설정) MassWorks를 이용한 검교정 데이터 생성에도 사용됩니다. 화학적 이온화 검교정 가스로는 다른 물질(PFDTD)을 사용합니다. 외부 검교정은 검교정 가스 수집만으로 정의하며, MassWorks 분석을 위한 시료 세트 수집 전 또는 후에 별도의 run(분석법)으로 수집합니다. 내부 검교정은 동일한 run 내에서 검교정 가스 및 시료 수집으로 정의하며, 따라서 각 시료 데이터 수집 시 수행합니다. Agilent MSD의 가열된 쌍곡선 구조 사중극자는 매우 안정적인 질량 배치를 가지며, 대부분의 응용에서 외부 검교정을 사용합니다[5-6]. 보다 자동화되고 수행 빈도가 낮은 시료 분석의 경우, 내부 검교정을 포함한 분석법이 더 나은 접근법이 될 수 있습니다 [2]. 이 두 가지 접근법에 대한 지침과 제안은 아래에 자세히 설명되어 있습니다.

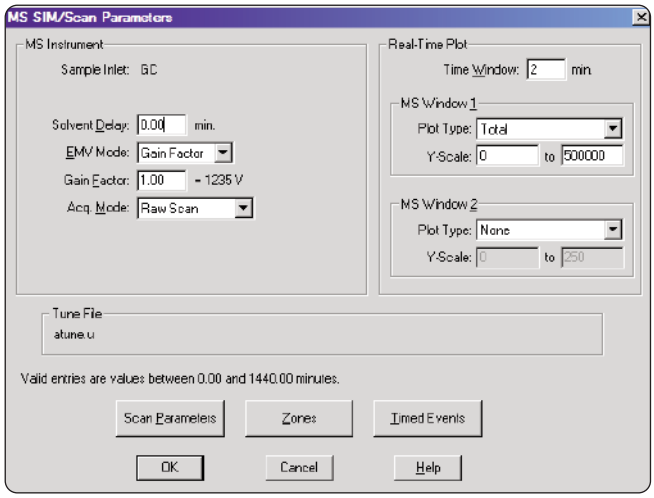


그림 3 외부 검교정 분석법에 대한 MS Parameters 예시 창

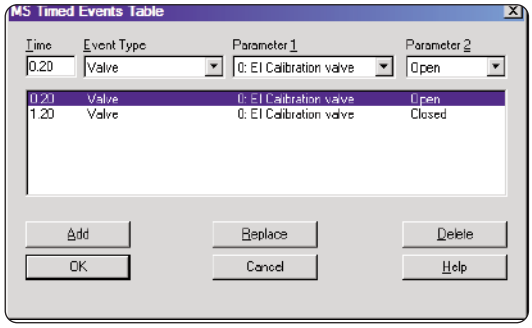


그림 4. EI와 CI 검교정 가스를 제어하는 MS Timed Events Table

외부 EI 검교정 분석법 설정

이 접근법은 시료 주입 없이 PFTBA 검교정 가스 수집이 단독으로 시행됩니다. 오븐 온도는 크게 중요하지 않으며 오븐 프로그램은 시작 온도(등온)일 수도 있습니다. 그러나, 컬럼 유속은 일반 분석법과 동일하여야 합니다. 또한, 스캔 범위, 샘플링 속도 및 임계값과 같은 모든 MS 파라미터는 시료 데이터 수집에서의 파라미터와 동일해야 합니다. **Solvent Delay** 및 **Gain Factor**는 예외입니다. 아무것도 주입하지 않으므로 Solvent Delay는 0분이 될 수 있고 Gain factor은 1이어야 합니다(그림 3).

PFTBA 검교정 가스 제어:

1) **MS Parameters** 창(그림 1)에서 **Timed Events** 버튼을 클릭하여 **MS Timed Events Table**을 띄웁니다.
2) **Time**에 run을 시작한 후 PFTBA가 켜지기 전까지 대기하는 시간(분, min)을 입력합니다.
3) **Event Type**에서 **Valve**를 선택합니다.
4) **Parameter 1**에서 **Calibration Valve**를 선택합니다.
5) **Parameter 2**에서 **Open**을 선택합니다.
6) **Add** 버튼을 선택하여 **Timed Events Table**에 라인을 추가합니다.

상태를 **Closed**로 설정하기 전에 이 절차를 30분 이상 추가 반복합니다. 그림 4의 예시는 밸브를 0.20분에 열고 1.2분에 닫습니다.

Instrument View의 **Instrument**에서 메뉴의 맨 위쪽 항목인 **Inlet/Injection Types**을 선택하여 **Inlet and Injection Parameters** 창을 띄웁니다. **Injection Source**를 **Manual**로 설정합니다. **GC Edit Parameters** 창을 선택하여 그림 6과 같이 일반적인 분석법의 컬럼 유속과 1.5분의 분석시간으로 등온 분석 조건을 설정합니다. 분석법에 압력 펄스 또는 컬럼 유속 변화가 없는지 확인하십시오. 주입구 창은 펄스 없는 Split 또는 Splitless을 표시해야 합니다. 분석법을 저장합니다.

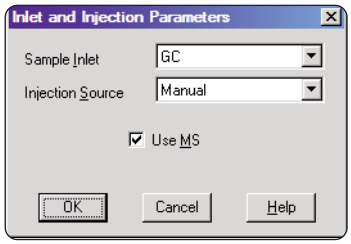


그림 5. Inlet and Injection parameters, 수동(manual)으로 주입 방법 (Injection source) 설정

Run Method를 선택하면 **Acquisition-Prepare to Inject** 창(그림 7)이 나타나며, 먼저 **Prep Run**을 누르고 GC의 **Start** 버튼을 눌러야 합니다.

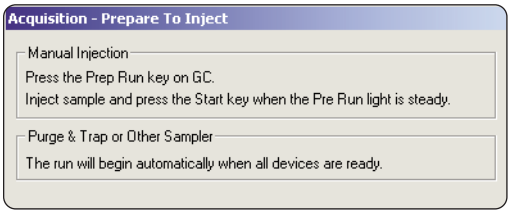


그림 7. Run method, Acquisition - 주입 준비 창, 수동 주입 정보

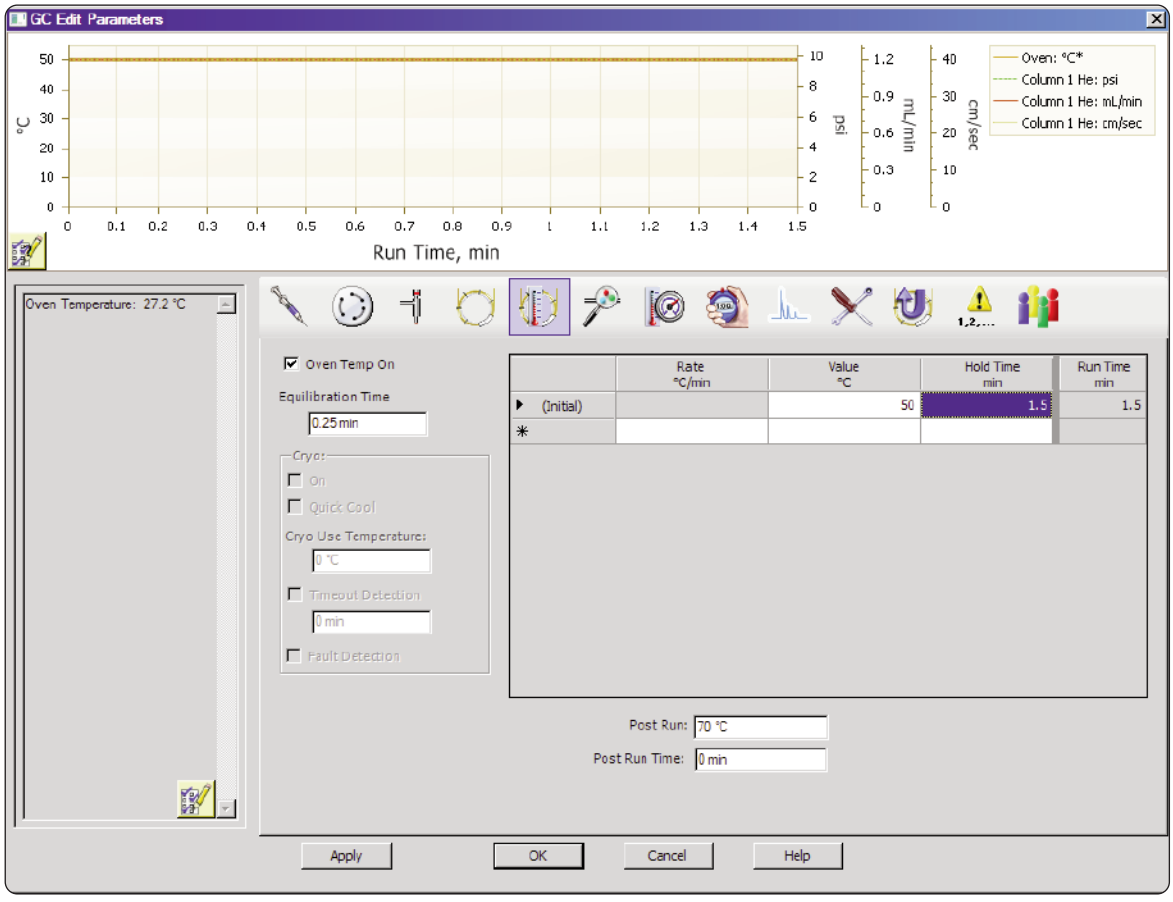


그림 6. GC Edit Parameters 창: GC 오븐 프로그램

Data analysis에 데이터 파일을 불러오면, 이 수집은 그림 8과 유사한 재구성된 총 이온 크로마토그램(RTIC, Reconstructed Total Ion Chromatogram)과 스펙트럼을 나타냅니다. 밸브가 열리면 초기에는 신호가 상승하나 이어서 안정하게 떨어지는 것을 알 수 있습니다. 게인(gain) 설정은 스펙트럼(그림 8 아래 도표)의 개별 이온 강도가 >3 × 10^6에 도달하지 않게 하는 것이 중요합니다. PFTBA 또는 수집 시료가 거의 포화 상태가 되면 스펙트럼 정확도가 떨어져 좋지 않은 결과를 만듭니다. 따라서 이 분석법에서는 게인 계수를 1 또는 2로 설정하고 검교정을 점검하여 튜닝(tuning) 질량, 특히 동위원소에서 충분한 신호가 얻어지는지 확인해야 합니다. 게인 계수는 앞서 언급한 한계까지 신호를 개선하기 위해 높일 수 있습니다.

내부(internal) 검교정 분석법 설정

이 접근법에서 수집된 모든 데이터 파일은 PFTBA 검교정 물질을 포함합니다. 이는 각각의 데이터 파일이 항상 검교정 또는 잠재적인 검교정과 연결된다는 이점이 있습니다. 난점은 시료를 수집하는 동안에도 이러한 현상이 발생한다는 것입니다. 따라서 PFTBA 스펙트럼은 실행 중 초기 용리 용매, 높은 바탕선(컬럼 고정상 분리, bleeding) 또는 늦은 용리 분석물질에 의해 오염되지 않도록 해야 합니다. 이를 확인하는 가장 좋은 방법은 오븐이 식은 후 run 끝 부분에 검교정을 시행하는 것입니다.

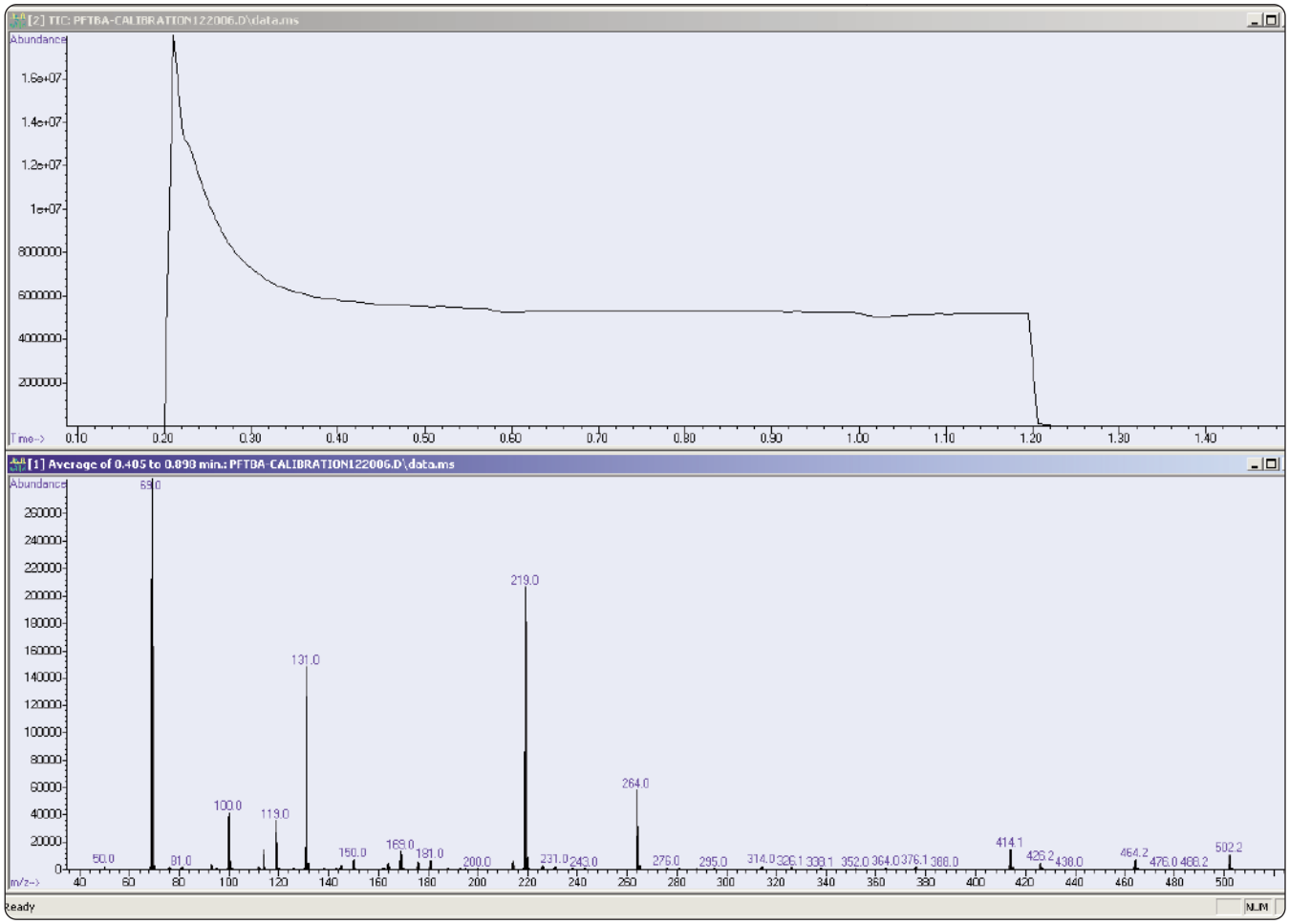


그림 8. 외부 PFTBA 검교정 데이터

이를 위해 사용자는 그림 9의 예시와 같이 단순히 GC 오븐을 띄워 온도 하강 단계(ramp)를 추가하면 됩니다. 이 예시는 과장된 경우이며, Agilent 7890A GC의 향상된 냉각 기능은 run에 많은 시간을 추가할 필요가 없습니다. 그런 다음 사용자는 MS 파라미터를 편집합니다. 일반적으로 수집은 높은 EMV 또는 게인 계수 설정에 따르므로 PFTBA 수집 중에 EMV 설정을 낮추기 위해 라인을 추가합니다. 이는 그림 11에 나타나 있으며 검출기가 포화되고 검교정을 왜곡하는 과도한 이온 세기(count)를 방지합니다. EMV를 약 300 또는 200V까지 낮춤으로서 포화 상태를 방지할 수 있음을 유의하여야 합니다. 검교정 이온 신호에 따라 더 높은 전압이 필요할 수도 있습니다. 최적의 EM 전압 값은 기기 ATUNE 보고서에서 확인할 수 있습니다.

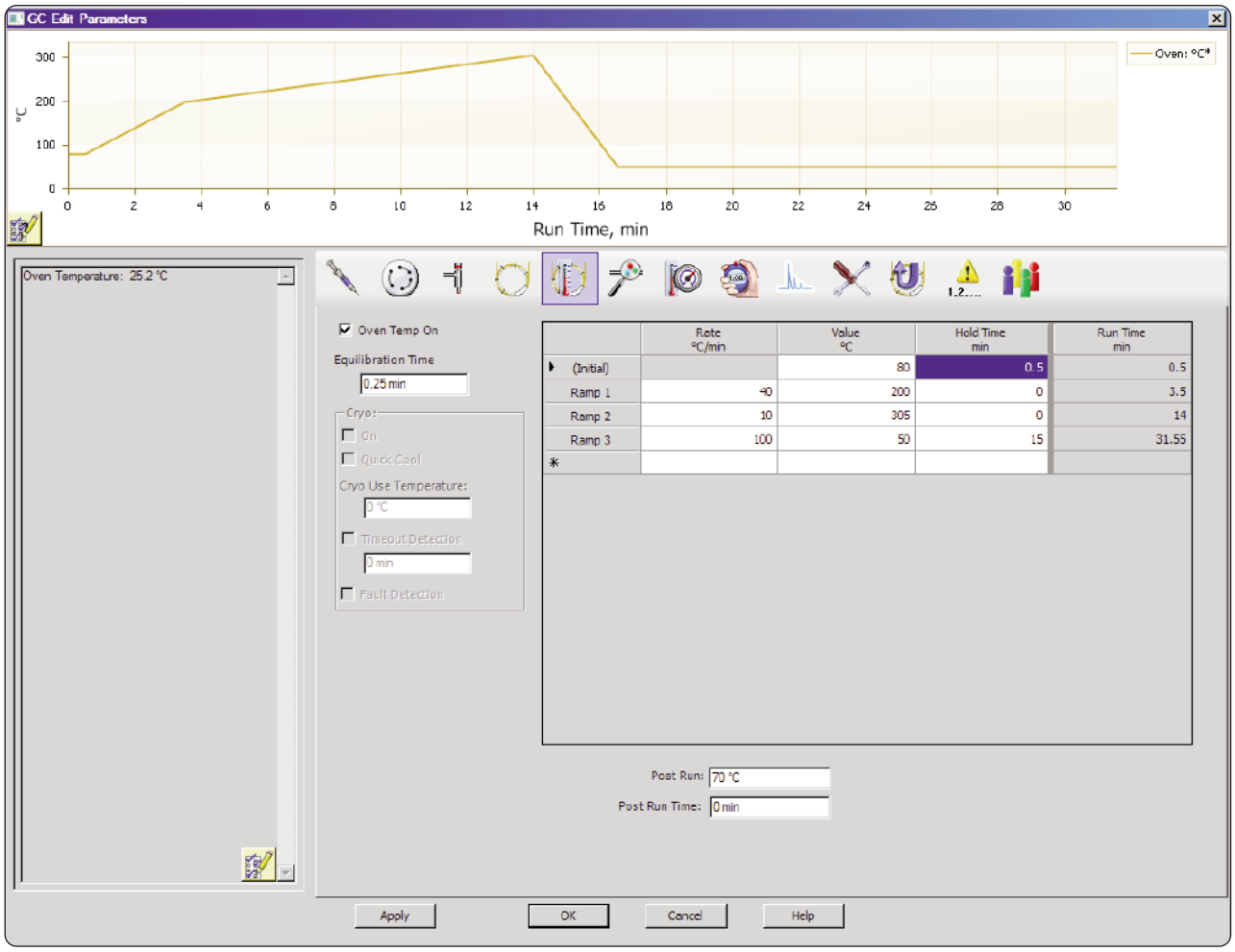


그림 9. 내부 검교정을 위해 띄운 GC 오븐 창

이 전압을 구하기 위해, ATUNE 보고서의 전압 또는 게인 계수가 1일 때 설정된 전압을 **MS SIM/Scan Parameters** 창에서 확인합니다(그림 10, 하단). 분석 물질 수집에 사용한 게인 계수 전압을 차감 계산합니다(그림 10, 상단, 1235V-1529V). 그 차이는 그림 11의 **Parameter 1** 입력란에 작성하는 값이며 그 값은 음수(-294V)일 수도 있습니다. 시작이 잘 진행되었으며, 수정할 수도 있습니다.

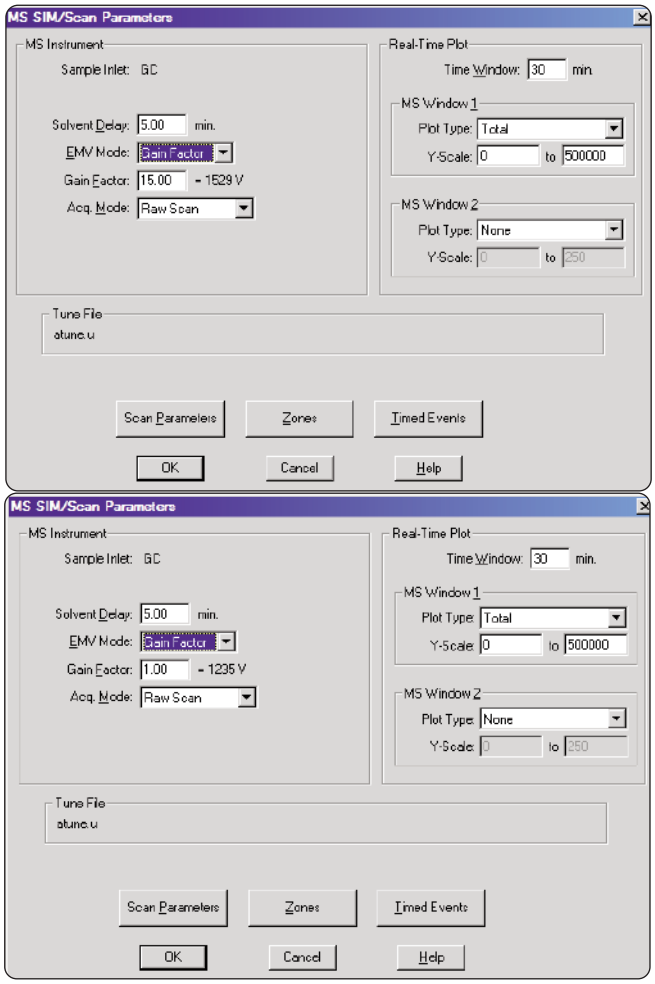


그림 10. 시료 수집을 위한 MS Parameters 창– - 일반적인 EMV 설정과 용매 지연(화면 상단) 및 수집 검교정 가스의 전압 확인(화면 하단)

내부 PFTBA 검교정을 사용한 시료 수집 예시는 그림 12에 나와 있습니다. 시료와 PFTBA 검교정 가스 사이의 지연 시간은 그리 길지 않아도 됨에 유의합니다.

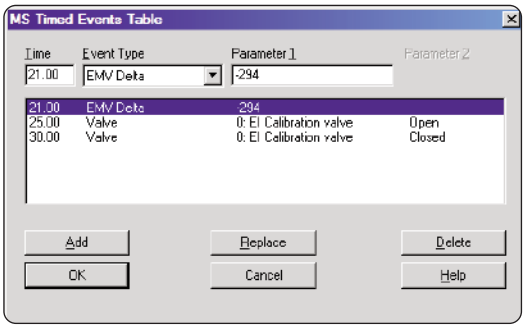


그림 11. MS Timed Events 창 - 내부 검교정 예시

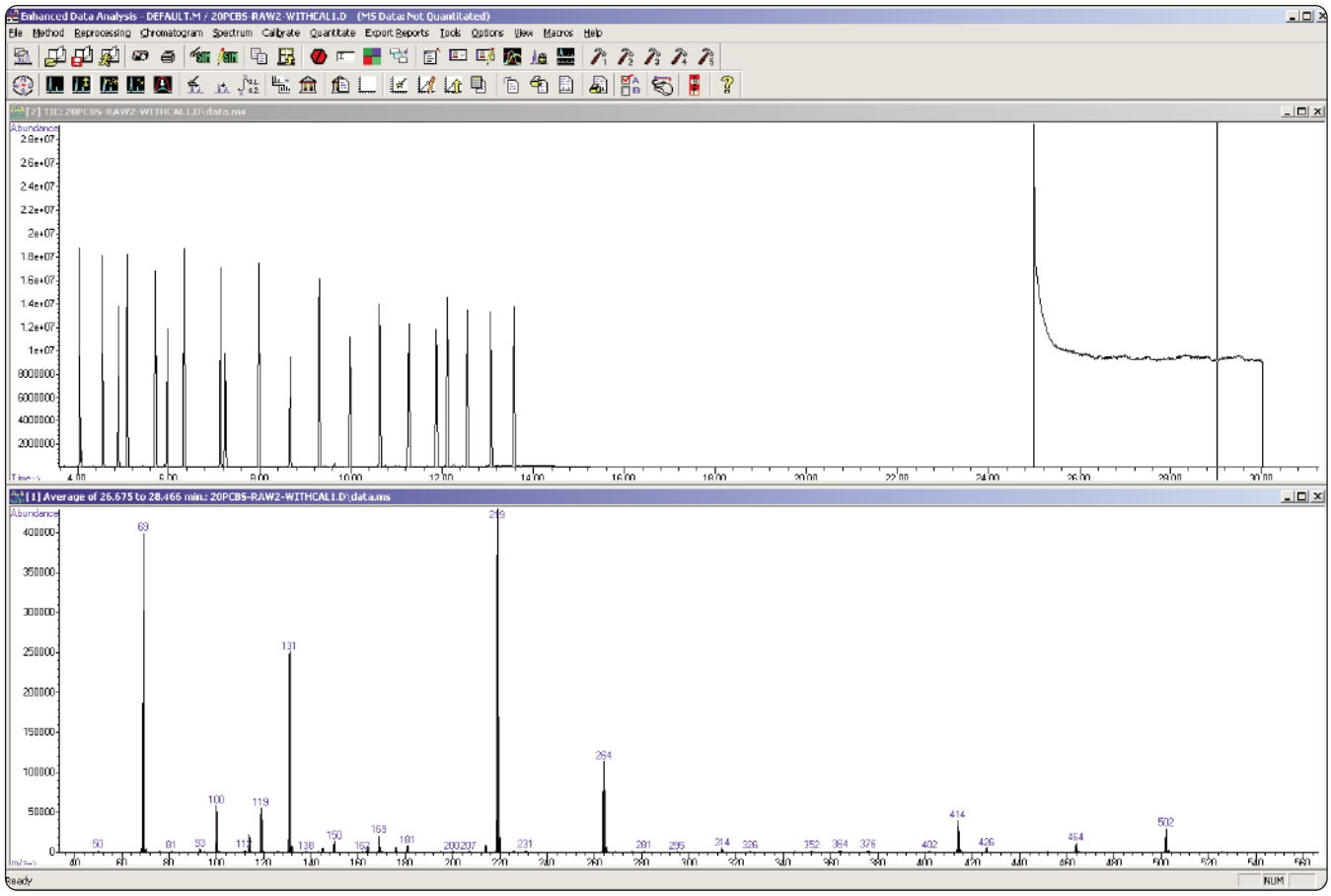


그림 12. run 마지막의 내부 검교정

결론

본 응용자료에 제공된 정보를 통해, 사용자는 MassWorks 소프트웨어에 필요한 정보를 포함한 데이터 파일을 수집할 수 있습니다. MassWorks는 검교정 데이터와 시료의 raw 스캔 수집을 사용하여 이온 배치에서 높은 수준의 질량 정확도를 제공함으로써 실증적인 분자 화학식을 결정할 수 있도록 합니다. 제공된 참고문헌은 이 접근법의 유용성과 화합물 식별을 지원하는 MassWorks의 강력한 기능을 몇 가지 예시로 언급하였습니다. MassWorks는 전자 충격(EI) 이온화 모드에서 수집한 데이터뿐만 아니라, 화학 이온화(CI) 데이터도 처리함으로써 EI와 CI의 결합 접근법으로 미지 화합물 분자량에 대한 통찰력과 조각 분석을 통한 유용한 구조 정보를 제공합니다.

참고문헌

1. MassWorks Calibration and Formula ID Tutorial (a web-based flash at http://www.cernobio-science.com/CernoDemo.html).
2. GC/MSD Formula Determination for Forensic Chemistry, Cerno Bioscience Application Note No.106, 2009 (http://www.cernobioscience.com/resources/ApplicationNotes/GCMSD_FormulaID4ForensicChemistry.pdf).
3. Enhancements to Gain Normalized Instrument Tuning: Understanding the Benefits and Features, 5989-7654EN. (Under Literature Library at www.chem.agilent.com).
4. Erve J. C. L.; Gu, M.; Wang, Y.; DeMiao, W.; Talaat, R. E., JASMS, 2009, 20(11), 2058.
5. Wang Y, Prest H. Chromatography, 2006, 27(3), 135.
6. Wang Y, Gu M. Spectroscopy (MS Supplement), May, 2008.

부록

PFTBA의 유용한 튜닝 이온: 중요한 EI 조각 분자식

화학식	M^+ Exact Mass[1]	$[M+1]^+$ Exact Mass	(상대 존재비)
$C_{12}F_{24}N$	613.9648	614.9681	(13.7%)
$C_9F_{20}N$	501.9711	502.9745	(10.37%)
$C_8F_{16}N$	413.9775	414.9809	(9.26%)
$C_5F_{10}N$	263.9871	264.9905	(5.93%)
C_4F_9	218.9856	219.9890	(4.45%)
C_3F_7	168.9888	169.9922	(3.34%)
C_3F_5	130.9920	131.9954	(3.34%)
C_2F_5	118.9920	119.9954	(2.22%)
CF_3	68.9952	69.9986	(1.11%)
CF_2	49.9968	51.0002	(1.11%)

1. 이 부록의 모든 추출 질량은 전하의 전자 획득 또는 손실 계산 없이 연산하였음에 유의합니다.

PFDTD의 유용한 튜닝 이온: 중요 PCI 튜닝 조각 분자식

화학식	M^+ Exact Mass
C_3F_7	168.9888
$C_5F_{10}O_1H$	266.9868
$C_{11}F_{22}O_3H$	598.9574

PFDTD의 유용한 튜닝 이온: 중요 NCI 튜닝 조각 분자식

화학식	M^- Exact Mass
C_3F_7O	184.9837
$C_6F_{13}O_2$	350.9691
$C_8F_{16}O_3H$	448.9670

애질런트테크놀로지스와 Cerno Bioscience는 이 자료에 포함된 오류 또는 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공,
이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는
결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은
사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2009
2009년 11월 10일
한국에서 인쇄
5990-4966KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies