ゲインノーマライズされた装置のチューニングによる性能向上: その利点と特徴

技術概要

Harry Prest、James D. Foote、Jeffrey T. Kernan、Dave Peterson

緒言

一般的に「オートチューニング」と呼ばれる質量分析計 (MS) でのイオン検出の自動最適化により、MS の操作は簡単になりました。オートチューニングは通常装備されている機能となり、非常に便利なものですが、検出器のエレクトロンマルチプライア電圧の設定は、オペレーターの経験に委ねられています。ChemStation G1701EA (E.00.xx) ソフトウェアでは、10^5、10^6、または 1.5×10^6 のゲインでゲインノーマライズチューンを行うことができます [1]。新しい ChemStation G1701EA (E.02.xx) ソフトウェアでは、検出器ゲインに関しての選択肢を増やし、化学イオン化モードを含めてゲインのノーマライズの機能を拡張しました。E.00 リビジョンではチューンファイルをゲインノーマライズすることが可能でしたが、E.02 ではユーザーがゲインノーマライズメソッドを作成できます。この技術概要では、ゲインノーマライズの利点、ChemStation ソフトウェアでの実行方法、ゲインの設定方法について説明します。

質量分析計のチューニングと検出器ゲイン

図 1 に、高エネルギーダイノード、エレクトロンマルチプライア（EM)、四重極のイオン検出システムの概念図を示します。チューンまたはオートチューンは、MS システムに揮発性キャリブレーション化合物を導入し、MS パラメータを調整して、キャリブレーション化合物に特徴的な特定のイオンのアバンダンスなどの基準を満たすことで行います。これが従来の 597X シリーズのチューニング方法です (ユーザーはチューンウィザードを通じて、これらのチューニングを変更または調整できます)。イオン光学系を最適化し、キャリブレーション化合物由来のイオンのピーク幅を調整した後、EM に印加する電圧を調整することで、対象キャリブレーション化合物のフラグメントイオンのアバンダンスを確保します。EM にかける電圧により、マスフィルターから出てくる非常に小さなイオン電流 [i] を増幅し、ターゲットとなるシグナルのアバンダンスに合うように大きな電子電流 [I] を生じさせます。この非常に小さな電流から、容易に定量が可能な高い電流へと増幅するための指標は、マルチプライア「ゲイン」と呼ばれます (つまり、ゲイン ≡ I/i)。イオン源中で相対的に高い圧力になっているキャリブレーション化合物ガス (PFTBA など) から生じる、キャリブレーション化合物イオンのアバンダンスに基づくエレクトロンマルチプライア電圧 (EMV) を決定します。分析の際には、メソッドパラメータにおける直線範囲、検出下限などの分析要件を満たすようにこの電圧を調整します。非常に低濃度で化合物を測定する必要がある場合は、キャリブレーション化合物のオートチューニングで得られる電圧を超える電圧 (たとえば、ATUNE.U + 400 V) を加えることが一般的です。これにより、微量分析に適したゲインを生じ、ATUNE.U 電圧だけを使用する場合よりも高いシグナルが得られます。そのため、要件を満たすよう、ゲインを間接的に調整することになります。しかし、この方法では、EM の経年数によるシグナルの減少や、機器間での相違といった問題が生じる場合があります。

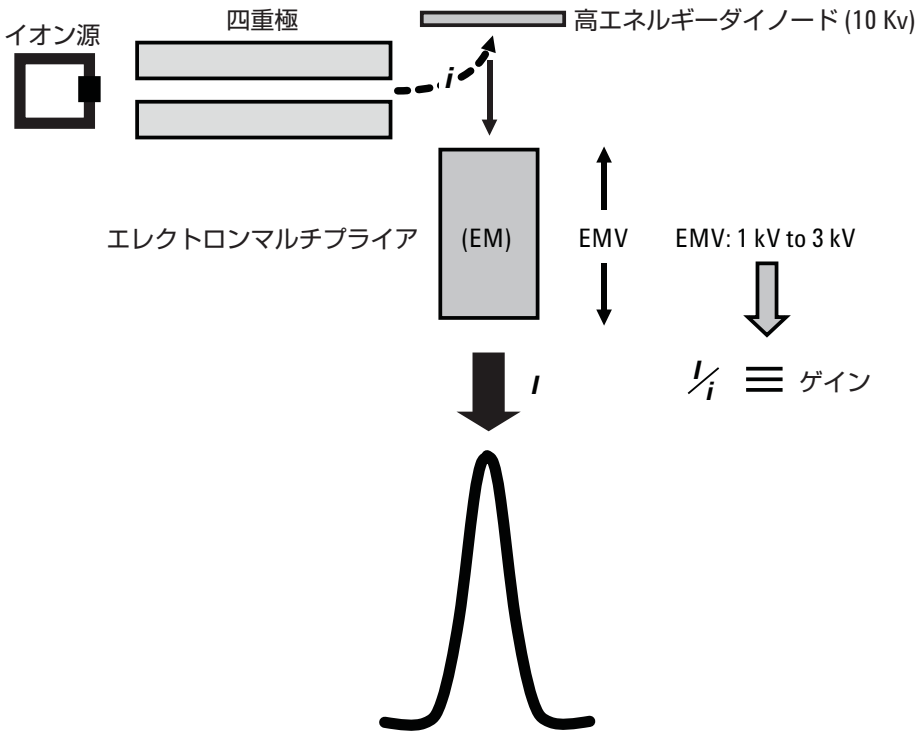


図 1.　MS の仕組みと検出器ゲイン

「新しい」EM と「時間を経過した」古い EM について、電圧と検出器シグナルの関係を図 2 に示しました。左の曲線は、新しい EM のレスポンスを示しています。1,000 V では、EMV がオートチューン (ATUNE) で設定されたターゲットアバンダンスを満たします。微量濃度検出の分析要件を満たすため、チューン電圧に 400 V を加算すると、高シグナル (S_{new}) が得られます。しかし、しばらく使用すると、検出器特性が変わり、EMV 対シグナルの曲線は変化します。チューニングプロセスでは同じアバンダンスをターゲットとしますが、それを満たすために 1,700 V の高電圧を必要とします。メソッドではさらに 400 V の増加を必要としますが、グラフで分かるように生じるシグナルは以前よりも低く、問題となります。レスポンスの減少が、検出器の経年変化によるものであっても、イオン源クリーニング、カラムメンテナンスなどのトラブルシューティングを行うことがあります。

この状況を調べる別の方法として、2 つの異なる GC/MS システムで新しい EM と経年使用した EM を比較することがあげられます。一方のシステムが、他方よりも高感度システムであると誤認されているかもしれません。つまり、時間とともに検出器には経年変化が生じ、同じ電圧設定でも必ずしも同じシグナルを生じるとは限らない、ということです。

また、ゲインの観点からは、特定ゲイン設定でのシグナルは検出器の使用年数には依存しません。図 3 に、新しい検出器と経年使用した検出器の両方に対する、ゲイン対シグナルの曲線を示します。新しい検出器と経年使用した検出器の両方に対して、電圧を調整し、一定ゲインが得られるようにします。ここでは、同じシグナルを生成する ($S_{aged} \cong S_{new}$) 10 ($\times 10^5$) を選択しました。時間とともに検出器間に使用による差が生じても、同じ検出器ゲインでは同じシグナルが生じる、ということがいえます。ゲインノーマライズメソッドでは、時間が経過してもレスポンスを維持します。

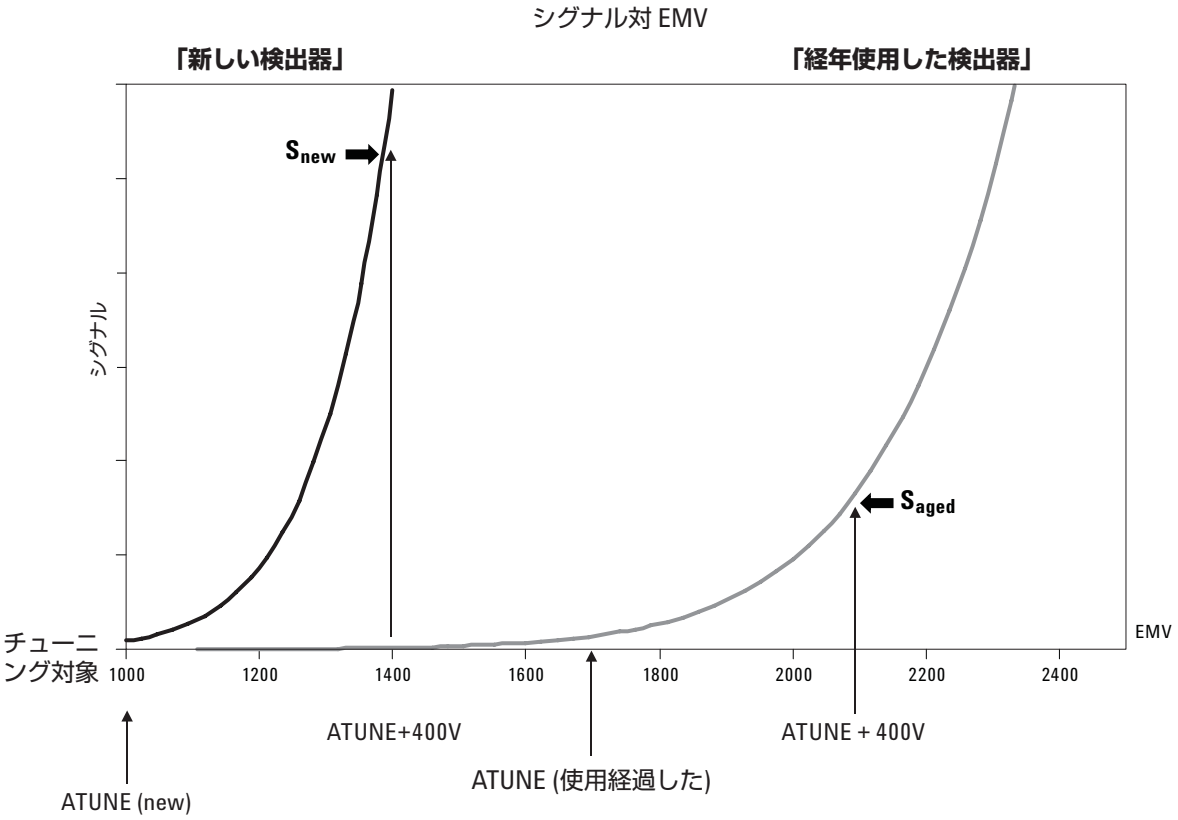


図 2.　EM 電圧を用いた場合の欠点: EM の使用年数によるシグナルの違い

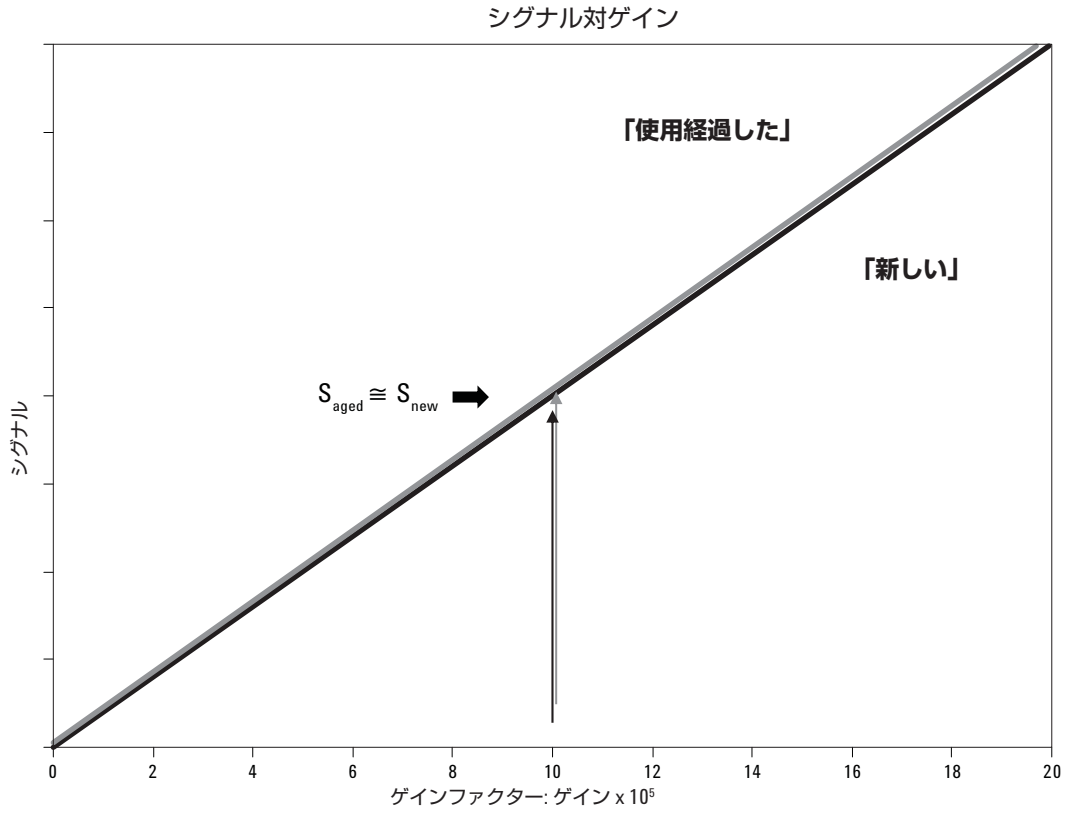


図 3.　ゲインノーマライズの利点: EM 間のシグナルの一致

この様子を図 4 に示します。左図は、新しい検出器を用いて取り込んだ選択イオン検出法（SIM）による PCB 分析データについて、固定ゲイン (1.5×10^6) を用いたメソッドと、チューニング電圧を増加 (ATUNE + n V) したメソッドの結果を重ね書きしたものです。検出器が新しい場合、PCB レスポンスは一致します (ゲインファクターが一致するため)。一方、右図は、経年使用した検出器で同じメソッドを用いた結果を示しています。この場合、ATUNE + n V を用いたメソッドではレスポンスが異なりますが、ゲインノーマライズメソッドは同じ結果を生じます。複数の装置を比較すると、名目上同等の機器でも非常に異なる結果を生じることがわかります。

ゲインノーマライズメソッドでは、機器の経年数の違いに関わらず、機器間で一貫性の高い結果が得られます。

この方法の利点は次のようになります。

- **化合物に対するレスポンスの優れた一貫性。**イオン源クリーニング、カラムの点検、EM の交換などのメンテナンス後も、同じゲインに調整された機器は、メンテナンス前と同等の一貫性のある化合物に対するレスポンスを示します。
- **同一化合物に対する機器間での結果の一致。**同じ基準を用いて、同じゲインに機器をチューンすると、複数の機器間でも化合物に対するレスポンスは一致します。
- **チューニングとトラブルシューティングにおける優れた診断機能。**特定のゲインにチューニングした後、空気と水のバックグラウンドを調べることで、より厳格な水と空気の基準を決められます。固定ゲインの下で得られたクロマトグラムを調べると、経過時間に伴ってカラムブリードプロファイルが増加したのか減少したのかを見極めることが簡単になります。さらに、チューニング中の電圧が固定ゲインに到達するのに過剰な電圧を必要とするのかあるいは固定ゲインが得られない場合は、マルチプライアが寿命に達したことがわかります。また、重要な点としては、化合物に対するレスポンスが点検前後、あるいはチューン間で異なる場合は、GC/MSD の GC 部分に問題があることを示しており、注意が必要です。
- 最も大きな利点は、シグナルがゲインに正比例するため、メソッドの状況をユーザが直接管理できることです。下記のゲインファクターノーマライズメソッドの作成方法では、これを詳細に説明します。

ゲインファクターノーマライズメソッドの作成

新しい ChemStation G1701EA (E.02.xx) ソフトウェアでゲインノーマライズメソッドを使用できます。このメソッドでは、通常の電圧調整の代わりにゲインファクターを使用し、ファイルをチューニングします。図 5 に

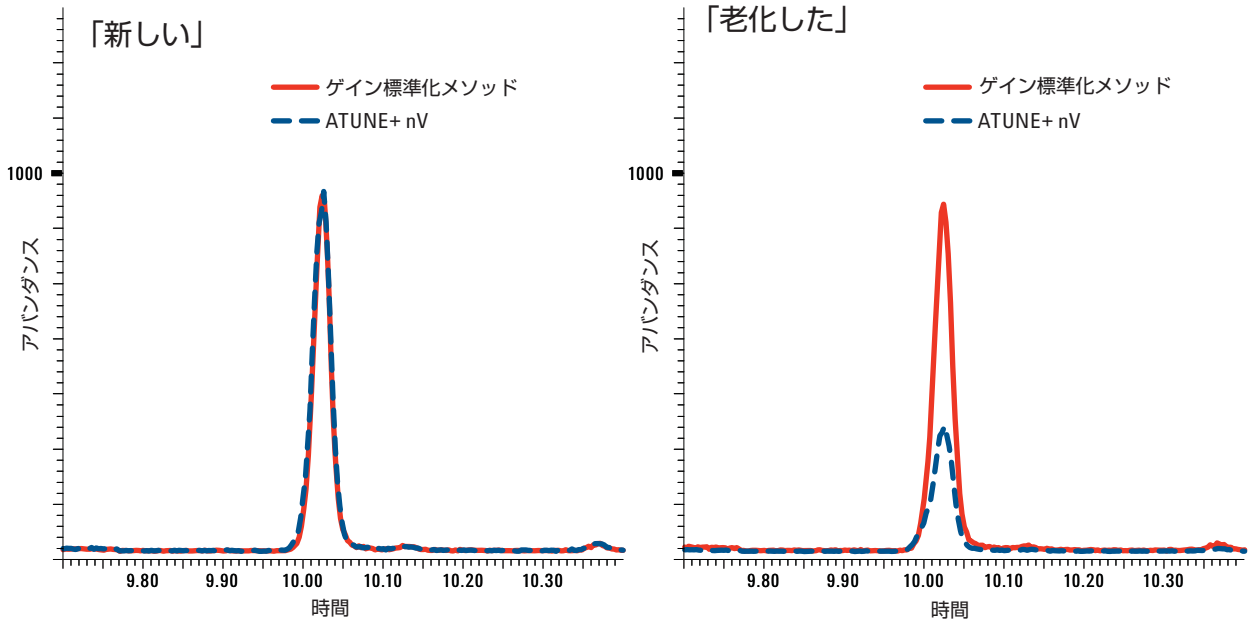


図 4.　ゲインノーマライズメソッドと EM 電圧調整メソッドの比較

は、**MS パラメータ**の設定画面を示します。この画面では、EM 設定について、従来の相対 (**REL**) モードまたは絶対 (**ABS**) モードを選択でき、さらに**ゲインファクター**モードを使用するために、**EM モード**を選択できます。ゲインファクターモードでは、0.25 ～ 25 の間のゲインファクターを、0.01 刻みで選択でき、この値を**ゲインファクター**の隣のボックスに入力します。ゲインファクターは 10^5 の倍数です。つまり、15 のゲインファクターでは、検出器が 15 x 10^5、つまり 150 万のゲインを生じるように設定されます。EM 電圧対ゲインの曲線の最後のキャリブレーションに基づき、選択したゲインファクターを実現する EM 電圧設定が表示されます。ユーザーは、この電圧を記録し、EM 寿命の追跡できます。メソッドを保存する際に、ゲインファクターも保存され、メソッドはゲインファクターノーマライズメソッドになります。

ソフトウェアでのゲインファクターの決定方法

ChemStation G1701EA (E.02.xx) ソフトウェアでは、オートチューンを行うごとに、EM ゲインと EM 電圧の関係も規定します。マニュアルチューンを作成する場合、**[チューン]** ビューの **[パラメータ]** の下の **[EMV ゲイン係数の更新]** を実行することで、EM ゲインと EM 電圧の間のキャリブレーションを更新できます。オートチューンごとにこれらの係数は更新されるため、ゲインノーマライズメソッドの使用は、**MS パラメータ**でのゲインファクターの設定やチューンの実施と同様にシンプルです。

使用するゲインファクター

表 1 に、推奨ゲインファクター範囲と微量分析アプリケーションに対する値を示します。

イオン化モード	推奨ゲインファクター範囲	微量分析用設定値
電子イオン化 (EI)	0.5 ～ 15	15
正イオン化学イオン化 (PCI)	0.5 ～ 2	2
負イオン化学イオン化 (NCI)	1 ～ 14	14

GC/MSD の設置時に 1 pg のオクタフルオロナフタレンで実行した EI チェックアウトメソッドでは、低濃度で高感度が必要なため、ゲインファクターは 15 に設定します。

適切なゲインファクターの決定

既存のメソッドの場合
良好に機能するメソッドがすでに存在している場合、以下のステップに従うことで、現在のゲインファクターを見つけ出すことができます。

1. メソッドの種類と、メソッドのチューンファイル値に対して適用されている電圧オフセットを調べます。ここでは、メソッドは Atune.U で EM 電圧は相対的で、–200 V の場合を例として示します。

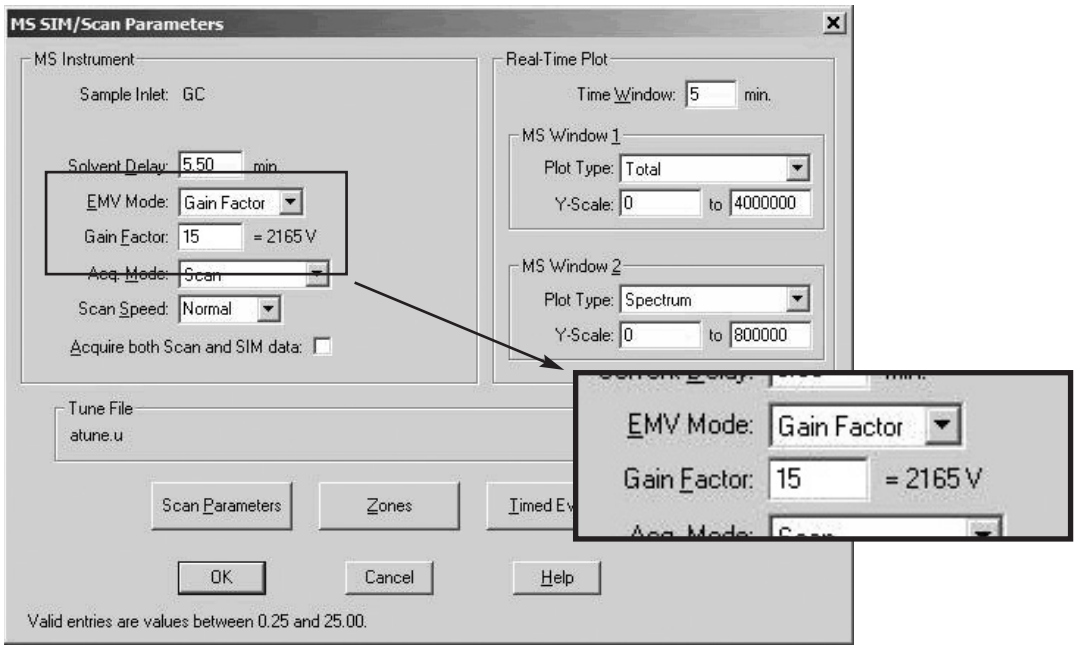


図 5.　新しい MS 条件設定画面

2. **[チューン]** ビューを入力し、**[パラメータ]** の下で、**[マニュアルチューン]** を選択します。オフセットによりメソッドで計算された EM 電圧に EMV 設定を変更します。たとえば、ATUNE.U の最終チューン電圧が 1,200 V の場合、メソッドは以下の条件で実行します。

   Atune.U – 200 V = 1,200 V – 200 V = 1,000 V

   EM 設定のチューン値は 1,000 V になります。
   OK をクリックして設定を完了します。

3. **[チューン]** ビューで、**[ファイル]** の下の **[レポート作成]** を選択します。これにより、チューン値を実行し、チューンレポートが印刷されます。チューンレポートの右下隅に EM ゲインとゲインファクターが表示されます。

<u>メソッド開発の場合</u>
メソッドに最適なゲインファクターの決定は、分析目的に応じて方法が異なります。非常に低濃度の測定を伴うメソッドの場合は、表 1 に示した推奨ゲインファクターが良い指針となります。目的が微量分析ではなく、高濃度測定を伴う場合は、以下の方法が役立ちます。

1) 機器をチューニングします。GC/MS メソッドで、ゲインファクターを 1.0 に設定し、最高濃度の標準試料を取り込みます。

2) データファイルを調べ、最も高いピークの再構成全イオン電流 (RTIC) クロマトグラムを確認します。以下の 2 つのケースが考えられます。

   a) 対象化合物のピーク高さが低く (<< 10^6 カウント)、より多くのシグナルが必要な場合。RTIC クロマトグラムの最も高いピークのピーク高さを測定します。2 × 10^6 の新しい RTIC 高さのアバンダンスを対象とし、必要なゲインファクターを計算し、(式 1) により、必要なゲインファクターを計算します。

      (現在のピーク高さ)/(現在のゲインファクター) = (新しいピーク高さ/新しいゲインファクター)

      => (新しいゲインファクター) = (2 × 10^6)/[(現在のピーク高さ)/(1.0)]

      メソッド (MS パラメータ) に移動し、新しいゲインファクターに変更し、高濃度標準試料を再び取り込みます。新しいデータにより、2 百万カウントに近い高さの測定対象化合物のピークを示すはずです。

      このメソッドが適切であることを確認するために、最低濃度の標準試料中の測定対象化合物を検出する能力を調べ、それに応じてゲインファクターを調整する必要があります。

      10 ng 未満の濃度での検出では、表 1 の微量分析の推奨値のゲインファクターはほとんどの場合で適切です。

      この計算について、図 6 を例に説明します。1.0 のゲインファクターで取り込んだ場合、高濃度標準試料の RTIC クロマトグラムの最も高いピークは 180,000 カウントです。測定対象化合物に対して約 200 万カウントを得るために、上記の方程式 1 を以下のように再調整し、使用します:

      [1.0]×(2 × 10^6 カウント)/(180 × 10^3 カウント) ≅ 11 (新しいゲインファクター)

      メソッドのゲインファクターを 1.0 から 11 に変更し、標準試料を再び取り込むことで、204 万カウントの新しいピーク高さを生じます。

      最もアバンダンスが高いシグナルに対して抽出イオン電流を用いて、実際にゲインファクターを最適化する必要があることに注意してください。また、多くの化合物が大きなフラグメンテーションを示すため、200 万カウントは、RTIC クロマトグラムよりも再構成抽出イオン電流 (REIC) クロマトグラム（SIM クロマトグラムやマスクロマトグラムに相当）に適切な近似値と考えることができます。

   b) 過剰なシグナルやクロマトグラフィックなピークがあるか、REIC クロマトグラムの上部が平坦な場合。

      ゲインファクターを 0.25 に減らし、高濃度標準試料を再注入し、測定対象化合物 REIC クロマトグラムを調べます。イオンの REIC は 400 または 500 万カウント未満のはずです。この状況を図 7 に示します。REIC が約 400 万より低い場合、ゲインファクタを比例的に上げます。まだ非常に高い場合 (600 万カウント以上) は、注入時のスプリット比を高める、サンプル前処理時の希釈の程度を変えるなどのメソッドの変更を検討します。

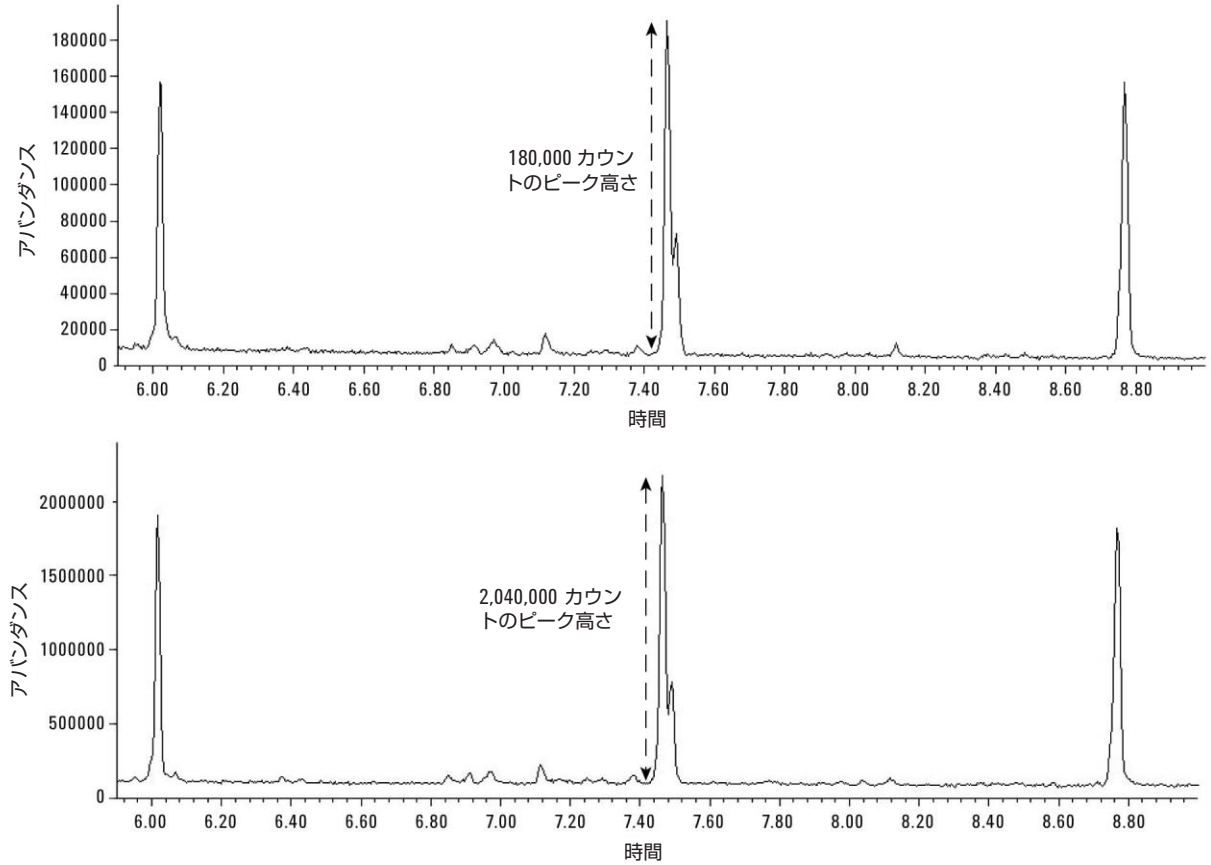


図 6.　ゲインファクターを用いたメソッド最適化。
上図: ゲインファクター 1.0 で取り込んだ標準試料の RTIC (ピークの最大値は 180,000 カウント)。
下図: 2 x 10^6 カウントを生じるように計算したゲインファクター 11 で取り込んだ結果。

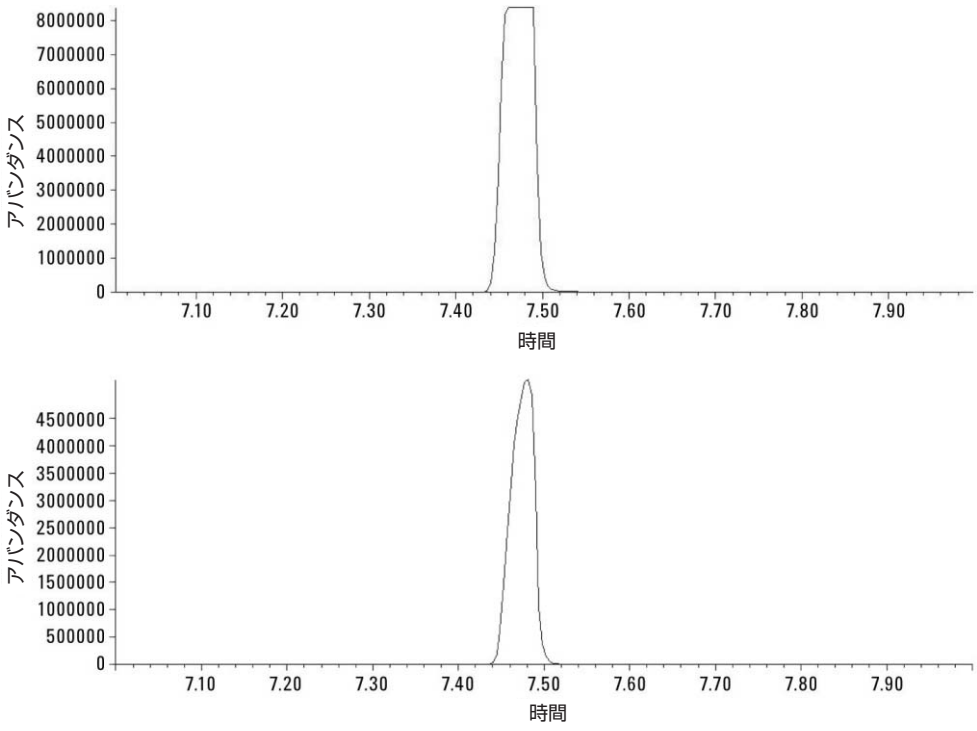


図 7.　ゲインファクターを用いたメソッド最適化: 過剰シグナルの場合。
上図: ゲインファクター 1 で取り込んだ最も存在量の多い成分ピークを示す再構成抽出イオンクロマトグラム (REIC)。
下図: ゲインファクター 0.25 でのクロマトグラム。

まとめ

ゲインノーマライズメソッドには多くの利点がありますが、最も重要なことは、シグナルがゲイン設定に正比例することです (ゲインファクターを 2 倍にすると、シグナルが 2 倍になる)。ユーザーはエレクトロンマルチプライア電圧設定を変更することに慣れていますが、ゲインと違い、シグナルは EM 電圧には正比例しません。ゲインノーマライズメソッドでは、シグナルがゲインに比例し、検出器の使用年数に影響されないため、EM の寿命までゲインを一定に維持できます。このメソッドの利点は次のとおりです。

- 時間が経過しても化合物に対するレスポンスの一貫性が高い
- 機器間の一致
- 診断が簡単
- メソッドの最適化
- チューニングが簡単で使用しやすいシンプルなメソッド

ゲインファクターに基づく検量線や他の化合物に対するレスポンスなど、より高度な使用も可能です。

参考文献

1. J. Kernan, H. Prest,「5975C シリーズ:ノーマライズされた装置チューニング」資料番号 5989-6050JAJP

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. 2008

Printed in Japan
August 31, 2008
5989-7654JAJP

Agilent Technologies