

ブリードが GC/MS データにおよぼす影響と その抑制方法

はじめに

カラムブリードについて

質量分析 (MS) データによく見られるにも関わらず、正しく理解されていない現象の 1 つに、カラムブリードがあります。ブリードはクロマトグラムのベースラインを押し上げてスペクトルに干渉し、データの品質と信頼性を損なわせます。ブリードについて理解するには、まず、ブリードがどこで発生するのかを考えなければなりません。カラムの固定相の種類は多岐にわたり、現在、最も広く使用されている 1、5、624 などのカラムは WCOT (内壁コーティングオープンチューブラ) カラムに分類されます。この種のカラムは、図 1 に示すように、固定相の薄膜(μm 単位の多様な厚さ)で内壁がコーティングされたフューズドシリカチューブ(mm 単位の多様な内径)で構成されます。このコーティングされた固定相が成分と相互作用して、クロマトグラフィーの選択性とリテンション特性を生み出しますが、まさにこれらの特性がカラムブリードの発生源にもなります。

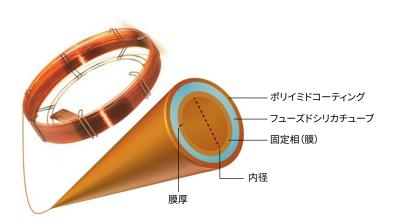


図 1. WCOT フューズドシリカ GC カラムの概略図と一般的なカラム属性

カラム相は、ポリシロキサンを主骨格とする幅広い極性の液体ポリマーでできています。熱が加わると、固定相のポリマーの末端が後方に曲がり、ポリマー自体を攻撃し始めます。この現象を「バックバイティング」と言います。その結果、図 2 に示すように、熱力学的安定性の高い環状構造が遊離し、ノイズが増加してベースラインが上昇します。このプロセスは、その後も繰り返されます。また、温度が高いほど、この反応は促進されます。300°Cを超える温度でベースラインが上昇しているのは、そのためです。

ベースラインの上昇幅が大きくなると、特に S/N 比の低い成分ではピーク積分がデータ品質に悪影響をおよぼし、問題になる可能性があります。ピーク積分の精度と再現性が最適化されるのは、安定した平坦なベースラインです。MS などの高感度検出器を使用する場合、検出器の感度が高いほど、バックグラウンドノイズとブリードの検出量が高まって過度なカラムブリードにつながり、微量化合物の感度に悪影響をおよぼします。

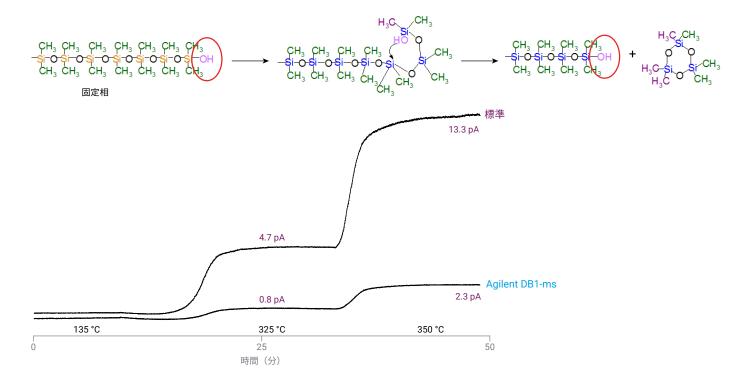


図 2. カラムブリードのメカニズムと、「標準」カラムおよび Agilent J&W DB-1ms カラムのブリードプロファイルの比較

バックバイティングによって遊離した環状構造が MS に進入すると、その質量もイオンソースでフラグメント化され、質量スペクトルに干渉イオンとして現れることがあります。図3に示すように、カラム相の極性にかかわらず、m/z 207 および 281 のイオンはスペクトルによく見られ、目的成分のスペクトルの完全性を損なわせる原因になります。このような理由から、GC/MS 分析、特に高感度の GC/TQ および GC/Q-TOF 機器には、低ブリードのカラムを使用することを強く推奨します。

カラムを温度限度内で使用すること

温度はカラムブリード量を大きく左右するため、GC カラムの温度プログラミングを守ることが重要です。どの GC カラムにも最高許容使用温度 (MAOT) がありますが、この温度はカラム相の種類によって異なります。MAOT とはカラムを曝露できる最高温度で、早期の劣化を抑えるには、この温度以下で使用する必要があります。一般に、最高温度は325/350°Cのように2つの数値で表され、最初の小さい方の数値は恒温分析における MAOT を示します。また、2番目の大きい方の数値は、サーマルグラジエントまたはオーブンプログラムを使用する場合の MAOTです。カラムの寿命を最適化し、ブリードの影響を抑えるため、オーブンプログラムはこの使用限度内で運用してください。

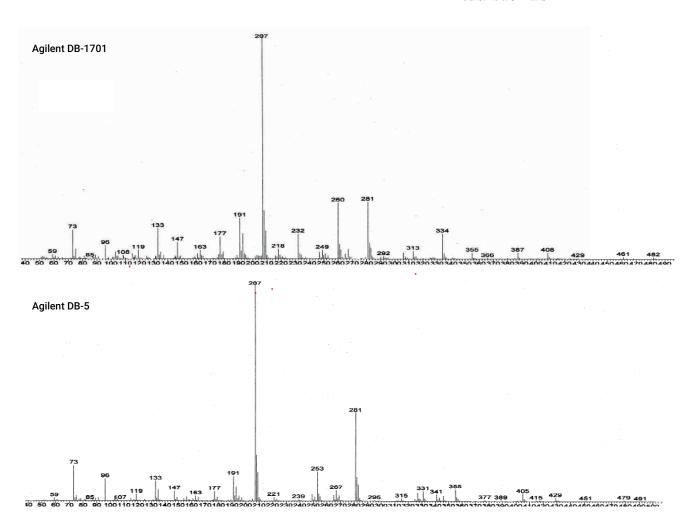


図 3. 極性が異なる 2 種類の GC カラム相によるブリードスペクトルの例

ガスクロマトグラフィー/質量分析用のカラムを選ぶこと

アジレントは、1991年に、低ブリードの MS アプリケーション用に設計された初のカラムである Agilent J&W DB-5ms を発売しました。このカラムは瞬く間に GC/MS アプリケーションの業界標準となりました。いまやGC/MS は感度が大幅に向上し、さらなる高感度化と精密質量機能により進化を続けています。最新のタンデムおよび飛行時間型質量分析計の感度およびスペクトル要件を満たすため、Agilent J&W DB-5Q および HP-5Q GC カラムには超低ブリードポリマーが採用されています。J&W HP-5Qカラムは、従来の GC/MS カラムよりブリードプロファイルを格段に低く抑えることでベースラインの安定性を高め、特に低い S/N 比の成分に対して正確な積分を実現します。また、干渉するブリードイオンを大幅に低減し、成分のスペクトル信頼性を確保します。

実験方法

データの採取には、Agilent 8890 GC と水素炎イオン化検出器(FID)を組み合わせたシステムと Agilent 5977 シリーズ B GC/MSD を使用しました。データ取り込みは、Agilent OpenLab ChemStation および MassHunter Acquisition ソフトウェアで行いました。さらに、Agilent Intuvo 9000 GC と FID を組み合わせたシステムでもデータを採取しました。J&W DB-5Q および J&W HP-5Q GC カラムと、従来のさまざまな 市販 5 ms GC カラムを比較しました。

表1~8に、各メソッドのパラメータを示します。

表 1. メソッド A の Agilent 8890 GC パラメータ

Agilent 8890 GC	
注入口	300 ℃、スプリットモード、スプリット 20:1
注入量	0.5 mL
注入ロライナ	Agilent 注入口ライナ、ウルトライナート、スプリット、低圧力損失 (p/n 5190-2295)
ガスセーバ	オン、3 分後に 20 mL/min
セプタムパージ流量	3 mL/min
オーブン	90 °C (0.5 分間)、20 °C /min で 330 °Cまで昇温(10 分間)、 10 °C /min で 340 °Cまで昇温(10 分間)、10 °C /min で 350 °C まで昇温(30 分間)
カラム	
キャリアガス	ヘリウム、2.0 mL/min の定流量
カラム	- Agilent J&W DB-5Q、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 122-5532Q) - Agilent J&W HP-5Q、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 19091S-433Q) - 従来の 5ms カラム X、30 m × 0.25 mm、0.25 μm - 従来の 5ms カラム Y、30 m × 0.25 mm、0.25 μm
注入口接続	スプリット/スプリットレス注入口
出口接続	FID

表 2. メソッド A の FID パラメータ

設定	条件
温度	325 °C
H ₂ 流量	30 mL/min
空気流量	400 mL/min
メークアップガス	N ₂
メークアップガス流量	25 mL/min、カラム + メークアップ = 一定

表 3. メソッド B の Agilent 8890 GC パラメータ

Agilent 8890 GC		
注入口	300 ℃、スプリットレスモード	
注入量	0.5 mL	
注入ロライナ	Agilent 注入口ライナ、ウルトライナート、スプリット、低圧力損失 (p/n 5190-2295)	
注入圧力	12.37 psi	
スプリットベントへの パージ流量	1.0 分で 100 mL/min	
セプタムパージ流量	3 mL/min	
オーブン	70°C(1.0 分間)、20°C /min で 200°Cまで昇温、10°C /min で 330°Cまで昇温(10 分間)、10°C /min で 340°Cまで昇温(10 分間)	
	カラム	
キャリアガス	ヘリウム、1.3 mL/min の定流量	
カラム	- Agilent J&W DB-5Q、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 122-5532Q) - 従来の 5ms カラム X、30 m × 0.25 mm、0.25 μm - 従来の 5ms カラム Y、30 m × 0.25 mm、0.25 μm	
注入口接続	スプリット/スプリットレス注入口	
出口接続	MSD	

表 4. メソッド B の MSD パラメータ

パラメータ	設定値
モデル	Agilent 5977B GC/MSD
イオン源	XTR
モード	スキャン(40 ~ 500 amu)
溶媒ディレイ	4.0 min
イオン源温度	300 °C
四重極温度	175 ℃
ゲイン	1.0

表 **5.** メソッド C の Agilent 8890 GC パラメータ

Agilent 8890 GC	
注入口	250 ℃、スプリットモード、スプリット 100:1
注入量	1.0 mL
注入ロライナ	Agilent 注入ロライナ、ウルトライナート、スプリット、低圧力損失 (p/n 5190-2295)
ガスセーバ	オン、3 分後に 20 mL/min
セプタムパージ流量	3 mL/min
オーブン	50 °C、30 °C /min で 350 °Cまで昇温(150 分間)、30 °C /min で 50 °Cまで昇温(10 分間)
カラム	
キャリアガス	ヘリウム、2.0 mL/min の定流量
カラム	- Agilent J&W HP-5Q、30 m × 0.25 mm、0.25 μm (p/n 122-5532Q) - 従来の 5ms カラム X、30 m × 0.25 mm、0.25 μm - 従来の 5ms カラム Y、30 m × 0.25 mm、0.25 μm - 従来の 5ms カラム Z、30 m × 0.25 mm、0.25 μm
注入口接続	スプリット/スプリットレス注入口
出口接続	FID

表 6. メソッド C の FID パラメータ

設定	条件
温度	325 °C
H ₂ 流量	30 mL/min
空気流量	400 mL/min
メークアップガス	N ₂
メークアップガス流量	25 mL/min、カラム + メークアップ = 一定

表 7. メソッド D の Agilent Intuvo 9000 GC パラメータ

Agilent 9000 GC		
注入口	300 ℃、スプリットモード、スプリット 236:1	
注入量	0.5 mL	
注入ロライナ	Agilent 注入口ライナ、ウルトライナート、スプリット、低圧力損失 (p/n 5190-2295)	
ガスセーバ	オン、3 分後に 20 mL/min	
セプタムパージ流量	3 mL/min	
ガードチップ	300℃、定温	
バス温度	300 °C	
オーブン	65 ℃ (11 分間)、20 ℃ /min で 350 ℃まで昇温(30 分間)	
	カラム	
キャリアガス	ヘリウム、3.27 mL/min の定流量	
カラム	– Agilent J&W DB-5Q、30 m × 0.25 mm、0.25 µm (p/n 122-5532Q-INT) – Agilent J&W DB-5ms ウルトライナート Intuvo カラム、 30 m × 0.25 mm、0.25 µm (p/n 122-5532UI-INT)	
注入口接続	スプリット/スプリットレス注入口	
出口接続	FID	

表 8. メソッド D の FID パラメータ

設定	条件
温度	325 ℃
H ₂ 流量	30 mL/min
空気流量	400 mL/min
メークアップガス	N ₂
メークアップガス流量	25 mL/min、カラム + メークアップ = 一定
検出器 1 Tail D1	320 °C

結果と考察

上限温度でのブリードプロファイルの比較

HP-5Q カラムと従来の 5ms カラムの熱安定性を比較するために、デュアルスプリット/スプリットレス注入口とデュアル FID を搭載した 8890 GC にカラムを取り付け、連続して実験を実施しました。カラムが正しく接続され、リークがないことを確認し、カラムをコンディショニングした後に、オーブン温度を 330 °Cおよび 340 °Cまで上昇させ、それぞれの温度で 10 分間維持しました。その後、オーブン温度を最終温度 350 °C (カラム相にプログラムされた MAOT) まで上昇させ、30 分間維持しました。

図 4 に示すように、DB-5Q および HP-5Q のどちらのカラムも上限温度で非常に低い FID レスポンスを維持し、340 °Cでのカラムブリードレベルは 1.0 pA 未満でした。また、カラムを 350 °C(プログラムされた最高温度)で 10 時間にわたって使用した場合も、DB-5Q および HP-5Q カラムのブリードレベルは 2.0 pA 未満にとどまりました。一方、従来の 5ms カラム X および Y のブリードレベルはそれぞれ 10 pA と 4 pA でした。以上の結果から、DB-5Q および HP-5Q GC カラムの優れた熱安定性が明らかになりました。

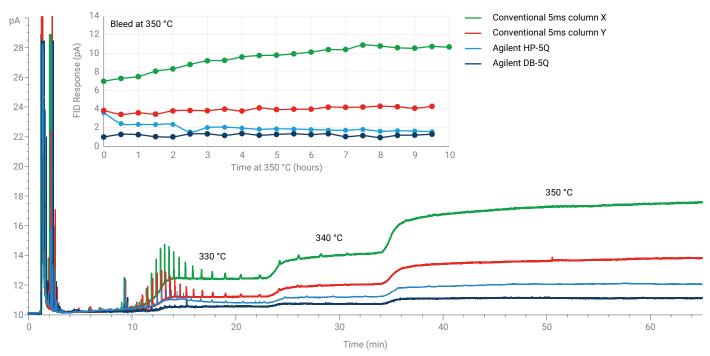


図 4. FID で GC メソッド A を使用して採取した 2 種類の従来の 5ms カラムと Agilent J&W HP-5Q および DB-5Q GC カラムによるブリードプロファイルの比較

熱安定性の向上がスペクトル干渉の抑制につながる

シングル四重極質量分析計を使用する場合、ピークのないクロマトグラム 領域のスペクトルスナップショットを撮れば、カラムブリードによるスペクトル干渉がわかります。実験では、2 種類の従来の 5ms カラムと DB-5Q カラムを 5977 シリーズ GC/MSD に取り付け、8890 GC でメソッド B を使用して比較しました。その際、330 $^{\circ}$ Cにおける、ベースラインの上昇のみでピークが存在しないスペクトルのスナップショットを撮り、スケー

リングなしで質量スペクトルを比較しました。図 5 に示すように、従来の 5ms カラム Y および X では、m/z 207 および 281 のイオンのアバンダンスが DB-5Q の場合より大幅に高くなっています。スペクトル干渉の小ささは、高感度の GC/MS 微量分析アプリケーションで一般的に使用される上限温度における DB-5Q カラム相の熱安定性の高さを裏付けています。

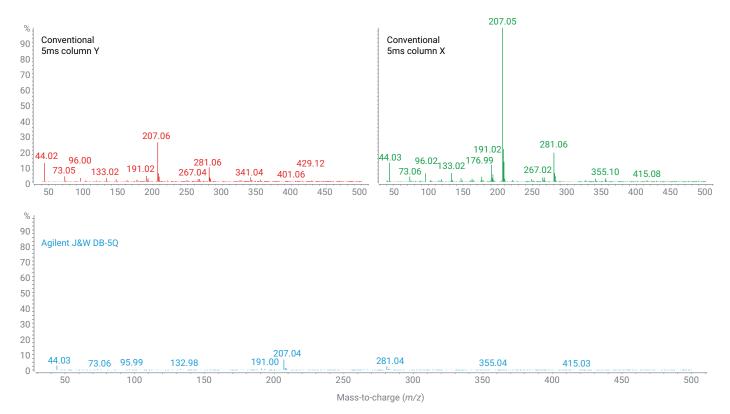


図 5. Agilent 5977 シリーズ B GC/MSD および 8890 GC でメソッド B を使用して 330 ℃で採取した、従来の 5ms カラム X および Y と Agilent J&W DB-5Q GC°カラムによる ブリードスペクトル

GC カラムを適切にコンディショニングすること

最初にカラムをGCの注入口と検出器に取り付けたら、カラムをコンディショニングすることが重要です。コンディショニングにより、過度なベースラインノイズが排除され、カラムの寿命が延び、分析間で正確な結果が保たれます。コンディショニングするには、カラムをトリミングして取り付けた後に、キャリアガス流をオンにし、オーブンを低温の40℃に設定します。昇温前にカラムから水分と酸素をパージすることで、カラム相の劣化を最小限に抑えることができます。リークのない接続とパージが完了したら、カラム流量をオンにしてカラムを最高使用温度にします。その際、ご使用のカラム相および構成のMAOTを超えないようにしてください。最初はベースラインが上昇しますが、分析に必要な最高温度でカラムを維持すると、ベースラインは下降し、安定して水平になります。ベースラインが

水平になった時点で、カラムはコンディショニングが完了したと見なされます。完了までの時間はカラム相によって異なりますが、一般には、カラム相の熱安定性が高いほど、カラムのコンディショニングにかかる時間は短くなります。

5%フェニル相などの非極性カラムでは、コンディショニングに 2 時間かかることも珍しくありません。図 6 からわかるように、350 ℃でコンディショニングした場合、HP-5Q は 1 時間足らずでベースラインが水平になっています。これに対し、従来の 5ms カラムは、コンディショニングが完了したと見なせるまでに 2 時間を要しました。短時間で適切にコンディショニングできる HP-5Q GC カラムなら、稼働可能な状態に復帰するまでの時間を短縮し、機器の生産性向上に貢献できます。

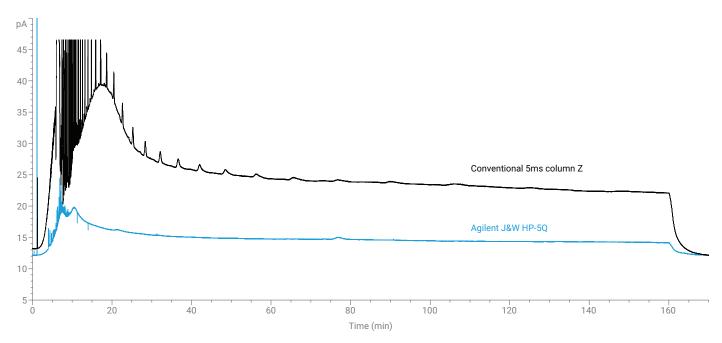


図 6. FID でメソッド C を使用して 350 ℃で採取した、従来の 5ms カラム Z と Agilent J&W HP-5Q°のコンディショニングプロファイル

カラムブリードによるベースライン安定化への影響

通常、クロマトグラムを見れば、GC オーブンプログラムの上限温度にカラムブリードがどのような影響をおよぼすのかが容易にわかりますが、熱安定性も、ベースラインの安定化という形で分析開始時に影響を与える可能性があります。オーブン温度が設定値に達して平衡化されたか、注入口温度が設定値に達したかなど、機器で次の注入準備が整ったと判断するために GC 取り込みプログラムが使用するインジケータは多数あります。これらの設定が設定値に達すると、注入サイクルが開始されます。ただし、これには、ベースラインが期待される状態に戻ったかどうかの判断は含まれません。8890 GC に搭載されているものなど、従来の空気浴式オーブンは、高温に達した後に低いオーブン設定値に戻って平衡化するまでに長い時間がかかるため、サイクル間の時間が長くなる可能性があります。空気浴式オーブンを使用するシステムで、ベースラインが戻る前に分析が開始される状況がそれほど頻繁に見られないのは、そのためです。一方、Intuvo 9000 GC の高速加熱/冷却サイクルでは、潜在的なサイ

クル間の時間が短縮されるため、カラムのベースラインが期待される設定値に戻る前に、GC が「分析可能」と見なされる可能性があります。これを図 7 に示します。

図7Aは、Agilent J&W DB-5ms UIで分析した、UBER 混合物というルーチンテスト混合物の1回目の注入結果を示しています。すべての化合物が溶出した後に、オーブンを350°Cまで昇温し、30分間維持しました。この分析の完了後、シーケンスは次の行に進み、分析可能と判断された時点でGCが開始され、次の注入が行われてデータが採取されました。図7Bに示すように、ベースラインは分析開始時点でまだ下降過程にあります。これは、高温での維持後にカラムのベースラインがまだ通常の状態に戻っていないことを示しています。この変化するベースラインにより、化合物の積分に誤差が生じ、早期に溶出する化合物について定量が不正確になり、不良なピーク形状が観察される結果となります。

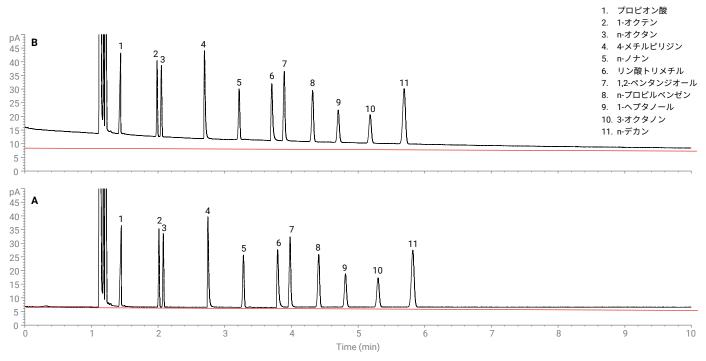


図 7. (A) Agilent J&W DB-5ms Intuvo GC カラムで分析した、1 回目の UBER テスト混合物の注入結果、(B) 350 ℃へのオーブン昇温サイクル後に分析した、2 回目の UBER テスト混合物の注入結果

図8は、同じテストをDB-5Q Intuvo GC カラムで実施した結果です。優れた熱安定性と超低カラムブリードにより、後続のテスト混合物の注入開始時にも、ベースラインの上昇はありません。これは、DB-5Q Intuvoカラムの優れた熱安定性により、全体的にカラムブリードが低く保たれるだけでなく、Intuvo 9000 GC の高速冷却オプション機能の使用時にも最適な低ブリードが実現されることを示しています。

結論

カラムブリードはごく一般的な現象ですが、それによる分析および使用検出器の感度への影響を抑える方法があります。Agilent J&W DB-5Q およびHP-5Q GC カラムが備える高度なカラム技術により、熱安定性が向上し、カラムブリードが大幅に低減します。高温でのカラムブリードを低減することで、カラム相のバックバイティングに起因するイオンによるスペクトル干渉が抑えられ、質量分析計の感度が高まります。これは、DB-5Q および HP-5Q GC カラムが、GC/MS、トリプル四重極 GC/MS、GC/Q-TOFなどの高感度検出器を使用する場合に最適であることを示しています。

参考文献

 Reese, A.; Vickers, A.; George, C. GC Column Bleed: A Mass PerSPECtive, Agilent Technologies, publication number B-0442, 2001.

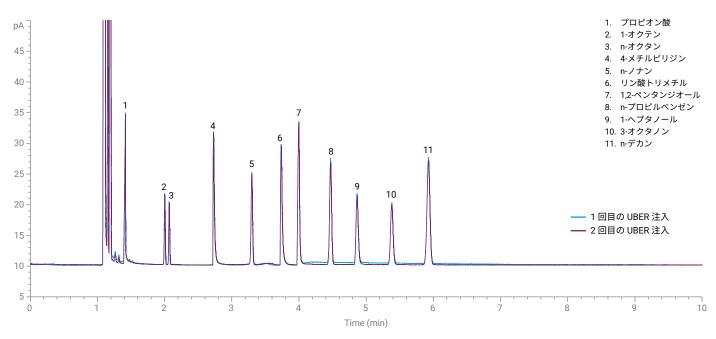


図 8. Agilent J&W DB-5Q Intuvo GC カラムで分析した、1回目の UBER テスト混合物の結果と最高温度 350 ℃で 30 分間維持した後の結果

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。 本文書に記載の情報、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。

DE63295737

アジレント・テクノロジー株式会社 © Agilent Technologies, Inc. 2024 Printed in Japan, June 25, 2024 5994-7586JAJP

