

微量分析における質量分析計の感度指標

芹野 武

1 はじめに

一般に、分析化学における微量分析では、検出限界 (LOD) の確認が必要である。検出限界とは、物質がない状態のシステムノイズ (ブランク値) と物質がある状態のシグナルが区別できる物質の最低量のことを指す。液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) やガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) などのクロマトグラフと質量分析計を組み合わせたクロマトグラフ質量分析計システムは環境試料や食品試料中の微量に含まれる規制化合物の分析などに使用されている。そのような規制化合物の微量分析の分野では、質量分析計やクロマトグラフ、試料の前処理技術などが進化することで分析に適用される分野が拡張されたり、高感度化に伴い規制値の見直しが行われたりすることがある。一般にこれらクロマトグラフ質量分析計の感度性能を表す指標としては、シグナル・ノイズ比 (SN 比)、装置検出下限 (IDL)、メソッド検出下限 (MDL)、定量下限 (LOQ) などが使用されている。従来は SN 比が質量分析計の感度指標として用いられてきた。しかし、質量分析技術の進歩と、微量分析への適用が広まる中で、SN 比による感度指標の限界があり、統計的なアプローチを取り入れた IDL という考え方が広まりつつある。本稿では微量分析におけるクロマトグラフ質量分析計システムの感度指標としての SN 比とその限界、IDL によるクロマトグラフ質量分析計の微量分析の感度評価について解説する。

2 機器の進化と SN 比

2.1 SN 比とは

GC-MS や LC-MS の感度指標としては SN 比が一般的に使われてきた。SN 比は標準物質を注入したときのノイズに対する標準物質のピークの高さの比率を表される。SN 比で使用される標準物質は安定してクロマトグラフの影響を受けにくく、入手しやすい化合物が選択され、現在では GC-MS であればオクタフルオロナフタレン (OFN)、LC-MS であればレセルピンが、質量分析機器メーカーの感度確認の標準物質として広く用いられている。

SN 比の分子の部分の「シグナル」は、ベースライン以上のクロマトグラムのシグナルでもっとも高い部分の高さである。図 1 に示したように、カラムで分離されて検出されたクロマトグラムの高さとなり、クロマトグラフによって得られる分析対象成分のシグナルは、時間の関数としてほぼガウス分布に近い形状になる (図 1)。

一方の SN 比の分母の「ノイズ」は、大きく分けて装置の検出器や電気回路由来のエレクトロニクスノイズと、分離カラムのブリードや GC, LC の流路、標準物質の溶媒や保存している容器、バイアルに由来するケミカルノイズからなる。

GC-MS や LC-MS の感度性能を評価するための指標として SN 比が長く用いられており、SN 比の算出のためのノイズを計測する様々なアプローチが適用されてきた。

古くはストリップチャートレコーダーや定規を用いて手作業でノイズが計測されていた¹⁾。ノイズの一般的な基準はピークの端から前の 60 秒、または前後それぞれ 30 秒のベースラインノイズの Peak-to-peak (最大と最少の差) で評価されていた。(図 1)

その後、インテグレータやデータシステムが、手作業によるノイズ測定と SN 比の算出に取って代わると、ノイズのベースライン部分がクロマトグラム上で自動的に選択されるようになった。SN 比算出のためのノイズは、質量分析データの解析ソフトウェアなどで、あらかじめ設定された時間枠におけるベースラインの変動の標

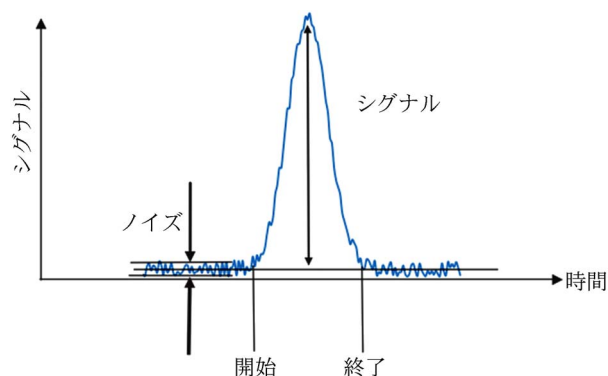


図 1 クロマトグラムのシグナルとノイズ

準偏差 (STD) または二乗平均平方根 (RMS) が算出され SN 比の計算に使用されるようになった。

2.2 SN 比の問題点

SN 比の計算の自動化によって、計算の手間を省くことができたメリットがある一方で、ノイズの基準がブラックボックス化した。ノイズの時間枠を自由に選択できることにより、同じデータでもノイズの取り方によって SN 比の分母の N の値が変わってしまうことになり、SN 比が MS の感度を表す指標として曖昧さを含んでしまうことになった。

図 2 はトリプル四重極 GC-MS で OFN を測定した抽出クロマトグラムである。ベースラインの異なる三つの領域の RMS ノイズ値を示している²⁾。a, b, c の範囲におけるノイズの値はそれぞれ 54, 6, 120 である。同じ測定データでも RMS ノイズが 20 倍も変動し、それらはベースラインの変動に起因するものであるが、これらの SN 比が変動しても、このシステムの実際の検出下限 LOD や機器検出下限 IDL は変わらない。このように、ベースラインの位置を主観的に選択すると、ノイズの大きが大きく変動することから、SN 比では、機器の検出下限を有効に評価できないことがある。

さらに、図 3 のタンデム四重極 MS (MS/MS) クロ

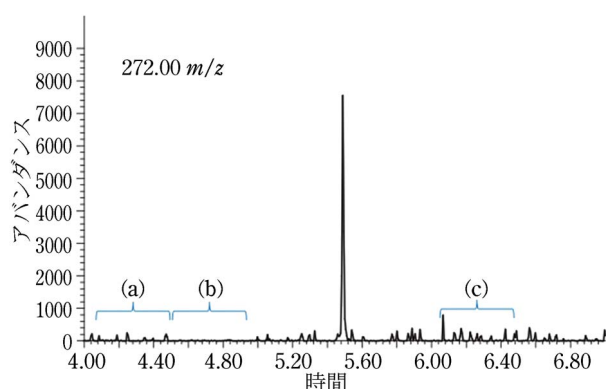


図 2 SN 比の計算のために測定された OFN の抽出イオンクロマトグラム

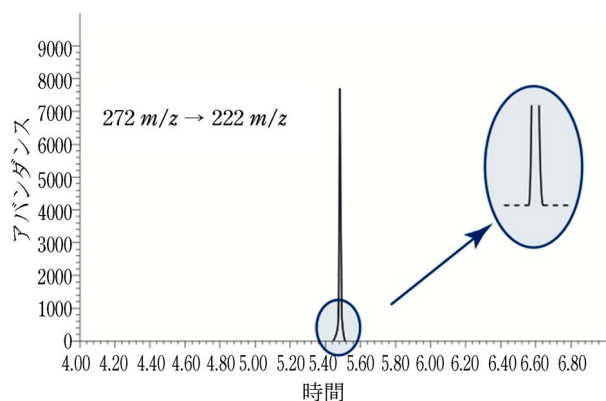


図 3 トリプル四重極 GC/MS による OFN の SRM イオンクロマトグラム (トランジション $m/z272 \rightarrow m/z222$)

マトグラムのように、MS の選択性が非常に高く、バックグラウンドノイズがゼロである場合には、SN 比による評価の不確定要素がいつそう大きくなる。この場合、ノイズがほぼ完全にゼロとなってしまうので、SN 比は非常に大きな値になる。MS/MS の選択性によりケミカルノイズが除去されてしまい、観察されるノイズは、エレクトロニクスノイズに限られる。

このエレクトロニクスノイズは、一般的にケミカルノイズと比べて数桁も小さいものである。このような状況では、イオン検出器のゲインを上げることで、バックグラウンドノイズを上げることなくシグナルのレベルを上げることが可能である。分析対象物のシグナルは増大するが、ノイズは変化がなく、SN 比はイオン検出器のゲインを上げるだけでいくらか大きくなる。この場合、検出器のシグナルは大きくなるが、検出されるイオンの数は変わらないため、実際のこのシステムの検出下限に変化はない。この方法を用いれば、実際の検出下限を変えずに SN 比を任意の値に調整することが可能となってしまう。

ここで MS/MS のデータについて、「感度」という言葉の定義についてあらためて確認をしてみると、国際純正応用化学連合 (IUPAC) では、感度を「特定の分析対象物に対する検量線の傾き」と定義している³⁾。MS/MS の技術では、その高い質量選択性のためにイオンをフィルタリングする。そのため、実際に検出器に到達するイオンの量は MS に比べて少なくなり、図 3 のようにベースラインはほぼゼロとなる。結果として、MS/MS の SN 比は大きくなるが、IUPAC で定義された感度は低くなってしまふ。一方で MS/MS は質量選択性が上がっており、MS と比較するとさらに微量の分析対象物を検出することが可能である。

先述の通り、検出器のゲインを上げることで、どのような分析物であっても、検量線の傾きを任意に変えることが技術的に可能である。そのため、MS/MS のような質量分析計の感度指標としては、IUPAC の定義する検量線の傾きでは限界があると言える。

2.3 SN 比に代わる指標

このような理由により、クロマトグラフ質量分析計システムの SN 比に代わる感度指標として、IDL が複数の質量分析計メーカーから提供されている。IDL の測定法は米国環境保護局 (EPA)⁴⁾ や EU のジャーナル⁵⁾、日本の環境省化学物質環境実態調査実施の手引き⁶⁾などに記載されている。これらはいずれも予想される検出下限に近い濃度の同一試料を繰り返し (5~10 回) 測定して IDL を計算する⁶⁾。

分析装置は低濃度になると、装置の検出限界に近づくにつれてピーク面積の精度が急速に悪化する。そのことを食品中の対象成分の濃度と変動で図示したのが図 4

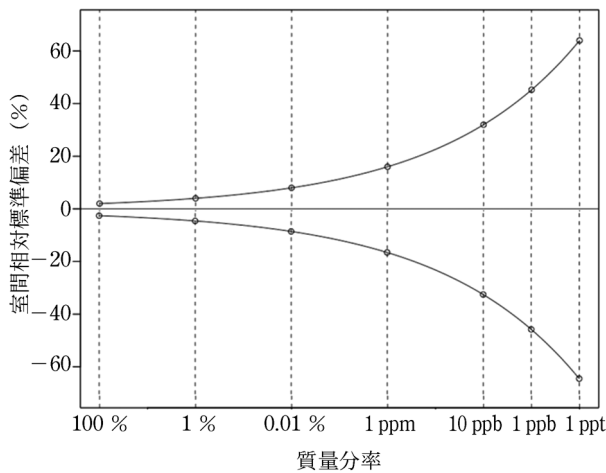


図4 Horwitz 曲線

縦軸は分析の室間相対標準偏差 (%), 横軸は測定対象化合物の試料中の濃度 (質量分率) を示す。縦方向に中心線から離れるほど変動が大きくなり, 横方向に右に行くほど低濃度となる。

の Horwitz 曲線である。この曲線は室間再現性に関して AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) によって実施された多くの室間共同試験の結果から, 室間再現精度を表す式として次の Horwitz で示されることが報告されている⁷⁾。

$$\text{室間相対標準偏差 (\%)} = 2 \times c^{-0.15}$$

この式の中で, c は分析対象物の質量分率, すなわち濃度である。この分析対象物の濃度が低くなると指数関数的に変動する。

図4の右側の低濃度の検出限界に近づくにつれ, 検出の変動が指数関数的に増加する。そのような低い濃度域では, スパイクノイズやランダムなエレクトロニクスノイズ, シグナルの大きな変動によって, シグナルがバックグラウンドノイズとほとんど区別がつかない状態となる。

IDL による感度指標は, このような不確実な領域において, シグナルとノイズを統計的なアプローチで最低濃度を決定することを目指している。

3 統計的手法による IDL の算出

3.1 IDL の算出方法

IDL を計算するには, 低濃度域における測定の不確かさを調べるために, 対象となる化合物のシグナルに対して, ベースライン・ノイズの変動と区別する Student の t -検定を用いる。すなわち IDL は, t -検定の t 値を用いて以下の通り計算することができる。

$$IDL = \frac{t_{(n-1, \alpha)} \times RSD \times C_{inj}}{100}$$

ここでは,

$t_{(n-1, \alpha)}$: 自由度 $n-1$, 危険率 $\alpha\%$ の Student t -分布

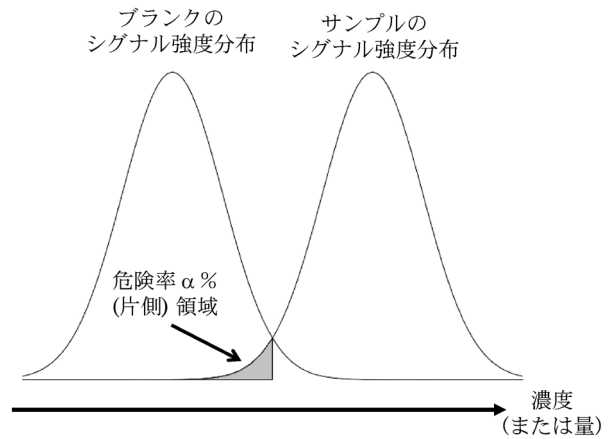


図5 IDL 計算のイメージ図

の片側検定における t 値

RSD : n 回注入の相対標準偏差 (%)

C_{inj} : 注入した試料の濃度

とする。

IDL のイメージを図5に示す。ブランクの強度 (システムノイズ) と定量下限のサンプルのシグナルの強度が正規分布であると仮定し, 複数回のサンプル測定でサンプルとブランクが危険率 $\alpha\%$ の統計的有意差で同一でないと推定される濃度を計算する。

IDL はこの注入濃度 C_{inj} において, ランダムなブランクによるものではないと統計的に推定される濃度となる。

以上のように, IDL は定量下限付近の濃度の試料を繰り返し測定した結果を用いて, Student の t -検定による仮説検定で計算されるので, SN 比のようにノイズの取り方や検出器のゲインで変動するような曖昧な指標ではないことがわかる。

3.2 IDL の計算例

実際のサンプルで IDL を算出した例を示す。

図6は Agilent 6470 トリプル四重極 LC/MS にて, 定量下限 5 pg/mL のエストリオール溶液 5 μ L を 7 回繰り返し測定した抽出イオンクロマトグラムである。

この測定をまとめたものが表1である。

この場合, 注入したエストリオールの濃度は 5 pg/mL = 5 fg/ μ L となる。

その溶液を 1 μ L を注入した場合の注入量 C_{inj} は

$$C_{inj} = 5 \text{ fg}/\mu\text{L} \times 1 \mu\text{L} = 5 \text{ fg}$$

となる。7 回注入の平均面積値は 48.76, 標準偏差は 5.06 となることから,

$$RSD = \text{標準偏差}/\text{平均} = 10.38\%$$

となる。この測定の自由度は $7-1=6$ となるので, 1% の危険率の IDL は, 自由度 6 における 99% 信頼性 ($\alpha=1\%$) の Student t -分布の片側検定における t -値

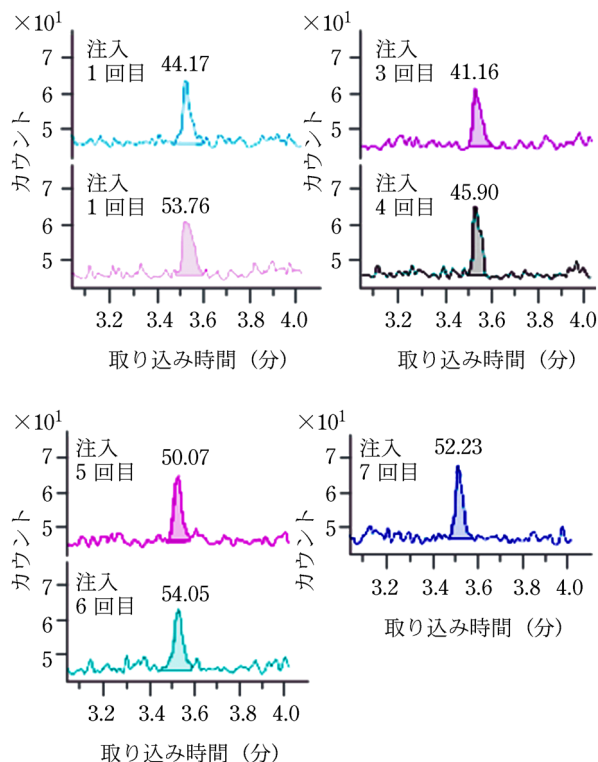


図6 5 pg/mLのエストジオールを7回連続注入した抽出イオンクロマトグラムと面積値

表1 エストジオール測定結果

注入回数	面積値
1	44.17
2	53.76
3	41.16
4	45.90
5	50.07
6	54.05
7	52.23

となり3.143となる。

このエストジオールのIDLは、これらの値から以下の通り算出できる。

$$\begin{aligned}
 IDL_{\text{エストジオール}} &= \frac{t_{(n-1, \alpha)} \times RSD \times C_{\text{inj}}}{100} \\
 &= 3.143 \times 10.38/100 \times 5 \\
 &= 1.6 \text{ fg}/\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

4 まとめ

微量分析における質量分析では目的化合物を高感度で検出するためにMS/MSによる選択性が必須となっている。ノイズレベルが妥当な方法で測定されるデータであれば質量分析計の感度性能を表す指標の一つとしてSN比は有用であったが、MSの技術の進歩によりリアルタイムの信号処理でノイズゼロのベースラインが得られるまでに進化した。

質量分析計のメーカーは従来のベースライン・ノイズ測定によるSN比だけではなく、装置の検出下限に近い濃度で複数回測定した結果から算出されるIDLを、適切な質量分析計の感度性能指標として提案している。

このIDLは長年にわたりGC-MSの環境分析で用いられてきたEPAの方法によるメソッド検出下限MDLの算出方法とも整合性が取られている。

質量分析の技術は半導体やイオン化技術、タンデムMSの技術の進化などにより劇的に変化してきている。微量分析に質量分析計が今後も広く用いられることから、感度性能の基準もそれに合わせて対応する必要があると考えられる。

文献

- 1) アジレント・テクノロジー株式会社：技術概要，5990-8341JAJP.
- 2) アジレント・テクノロジー株式会社：技術概要，5990-7651JAJP.
- 3) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, (Oxford), (1997).
- 4) EPA Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants.
- 5) Official Journal of the European Communities, Commission Decision of 12 August 2002; Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- 6) 環境省ウェブサイト (2021年1月にアクセス), <https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/tebiki/mat01.pdf>.
- 7) *J. AOAC Int.*, **89**, 1095 (2006). DE44213.9948263889.



芹野 武 (Takeshi SERINO)

アジレント・テクノロジー株式会社 (〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1)。奈良先端科学技術大学院大学後期博士課程修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》質量分析データの定量的構造物性相関分析(QSPR)。《趣味》高尾山散策。
E-mail: takeshi_serino@agilent.com

会社ホームページ URL :

<https://www.chem-agilent.com>

関連製品ページ URL :

<https://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1004145>