

質量分析
QTRAP® シリーズ LC/MS/MS システム

中級定量トレーニングテキスト

～QTRAP を使用した測定モード～

MRM-EPI 測定

MS3 測定

株式会社 エービー・サイエックス
アプリケーションサポート



2020 年 2 月

QTRAP® シリーズ LC/MS/MS システム

～QTRAP を使用した測定モード～

1	IDA 法による MRM-EPI 測定	3
1.1	EPI (Enhanced Product Ion) モード	5
1.2	IDA (Information Dependent Acquisition)	7
1.3	MRM-EPI Method 作成方法	8
1.4	MRM-EPI により測定したデータの解析	17
2	ライブラリーへの登録および検索	19
2.1	ライブラリーデータベースの選択方法	20
2.2	ライブラリーへの登録	21
2.3	ライブラリーへの追加と編集	22
2.4	ライブラリーの検索	23
2.5	新規にライブラリーデータベースを作成する方法	25
3	MRM3 を用いた定量	26
3.1	MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について	27
3.1.1	MS/MS/MS とは	27
3.1.2	MRM3 による定量とは	28
3.1.3	MRM3 測定の流れ	29
3.2	MRM3 Optimization Script を用いた自動最適化	30
3.2.1	MRM3 Optimization Script のインストール	30
3.2.2	MRM3 Optimization Script のメソッド作成工程	30
3.2.3	MRM3 Optimization (自動最適化プログラム) を Run する前の準備-1	31
3.2.4	MRM3 Optimization (自動最適化プログラム) を Run する前の準備-2	34
3.2.5	MRM3 Optimization (自動最適化プログラム) の Running	35
3.3	マニュアルでの最適化	40
3.4	イオンソースの最適化	44
3.5	Acquisition Method の作成	45
3.5.1	複数 Experiment による MS3 メソッドの作成	45
3.5.2	HPLC の条件設定	48
3.5.3	MS3 の Max Fill Time の Default 値の変更	50
3.5.4	MRM3 メソッド作成	51
3.6	Explore モードでのデータ確認方法	53
3.7	MS/MS/MS の定量解析	55

3.7.1	Build Quantitation Method を用いる方法.....	55
3.7.2	Quantitation Wizard を用いる方法	59
4	参考資料.....	66
4.1	参考資料 1 トラップ機能の ER 測定と EPI 測定	66
4.2	参考資料 2 スキャンスピード	67
4.3	参考資料 3 スキャン範囲	68
4.4	参考資料 4 データポイントの目安について	69
4.5	参考資料 5 LIT にイオンを溜める方法.....	72
4.6	参考資料 6 Q0 Trapping 機能.....	73

1 IDA 法による MRM-EPI 測定

この章で学べること

Analyst® software の IDA 機能について解説します。

IDA 法による MRM-EPI 測定とは、サーベイスキャン(MRM)を行い、リアルタイムで取得した MRM のシグナルから最も強度の強いイオンを選択し、EPI(MS/MS 測定)を取得する測定方法です。

MRM 測定で検出されたピークについて MS/MS スペクトルを取得することにより、MRM 測定で検出されたピークが目的物質であるかどうかを、MS/MS スペクトルのフラグメントのパターンを比較することにより、確認することができます。

MRM のみでも化合物の同定はできますが、さらに MS/MS スペクトルを取得することによって、MRM による同定結果の信頼性を高めることができます。

この高度な同定の確認を行うと、MRM のみの分析によって生じるおそれがある偽陽性または偽陰性の検出結果を極力減らすことができます。

※ 偽陽性 - 本当は陰性であるのに検査結果は誤って陽性と出ること

※ 偽陰性 - 本当は陽性であるのに検査結果は誤って陰性と出ること。

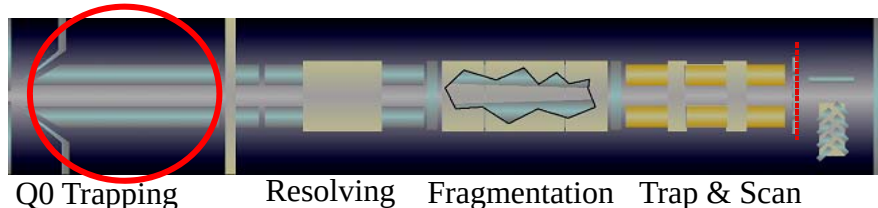
- 1-1 EPI (Enhanced Product Ion) モード
- 1-2 IDA (Information Dependent Acquisition)
- 1-3 MRM-EPI Method 作成方法
- 1-4 MRM-EPI により測定したデータの解析

＜補足＞ Linear Ion Trap(LIT)モードと四重極モードのスキンの種類

Scan Type	Q3 のスキンモード
Enhanced MS (EMS)	LIT
Enhanced Resolution (ER)	LIT
Enhanced Product Ion (EPI)	LIT
MS/MS/MS (MS3)	LIT
Enhanced Multiple Charged (EMC)	LIT
Time Delayed Fragmentation (TDF)	LIT
Single MS scan modes: Q1/Q3 MS	四重極
Precursor Ion (Prec)	四重極
Product Ion (PI)	四重極
Neutral Loss (NL)	四重極
Multiple Reaction Monitoring (MRM)	四重極

- QTRAP® システムシリーズは、Q3 に四重極と LIT を搭載しています。四重極と LIT は任意の時間で切り替えて使用することができます(Acquisition Method で設定します)。
 - 定量をメインに使用する場合、LIT モードで使用するスキンは EPI のみになります。
 - EPI 以外の LIT スキンモードの説明や具体的な操作方法に関しては、本トレーニングには含まれておりません。
 - 下記の資料をご覧ください、ご不明な点、ご質問などございましたら、アプリケーションサポート宛までご連絡ください。
 - もしくは定性トレーニング(弊社内で実施)も開催しておりますので、そちらのご参加をご検討ください。詳細はホームページをご覧ください。
- ※ LIT スキンモードの説明については、QTRAP®システムシリーズ定性用説明資料 (QT-4N QTRAP 定性分析用説明資料_リーガル済 20160324_newLogo.pdf) をご参照ください。
- ※ 具体的な使用方法については、QTRAP® System シリーズ定性分析用マニュアル(QT-102 QTRAP シリーズ ver1.5.2_1.6_定性_リーガル済_20160101_newLogo.pdf) をご参照ください。

1.1 EPI (Enhanced Product Ion) モード



QTRAP® システムシリーズのスキャンタイプには Trap 機能を用いる Enhanced mode があります。

EPI (Enhanced Product Ion) はこのスキャンタイプのひとつで、MS/MS フラグメントイオンを感度良く測定することが可能です。Q2 でフラグメンテーションされたイオンは Q3 にある時間溜められた後に検出器に吐き出されます。また、Q3 でスキャンしている間に Q0 でイオンを溜め (Q0 Trapping)、より感度を上げることも出来ます。Trap モードの設定は、メソッドの Advanced MS タブの中で行います。

Q3(Liner Ion trap)にイオンを溜める方法を選択します。2つの方法があります。

① Fixed LIT fill time でイオンを溜める時間を指定する

* 通常 Q0 Trapping を使用します。

② Dynamic fill time(DFT)をチェックする

* DFT とはサーベイスキャンのイオン量に応じて溜める時間を自動計算させる方法です。
(Advanced MS タブの中にはイオン量の設定はありません。ユーザーで変更する必要もありません)。最適値がわからない場合には Dynamic fill time を使用します。

PI(四重極)スキャンモードと EPI(LIT)スキャンモードの違い

EPI スキャンモードはイオンをトラップすることが出来るので、PI スキャンモードよりも感度が良く、質の高いスペクトルを取得することが可能です。

PI スキャンモードの場合

※ RF1 < RF2 < RF3

Q3 は四重極モードとして機能します。

A+のイオンを検出するとき、四重極にはA+のイオンを通過させるための電圧 RF1 が設定されます。A+のイオンは四重極を通過し、検出器へ導入されます。A+を検出している時間は他の m/z のイオン B+ や C+は電圧が適切でないため、四重極の外へ排出されます。

イオン	Q3 の設定電圧
A+ m/z 100	RF1
B+ m/z 200	RF2
C+ m/z 300	RF3

次に B+ のイオンを取り込むため、四重極には B+ のイオンを通過させるための電圧 RF2 が設定されます。B+ のイオンは四重極を通過し、検出器へ導入されます。B+ を検出している時間は他の m/z のイオン A+ や C+ は電圧が適切でないため、四重極の外へ排出されます。

EPI スキャンモードの場合

※ RF1x < RF 2x < RF3x

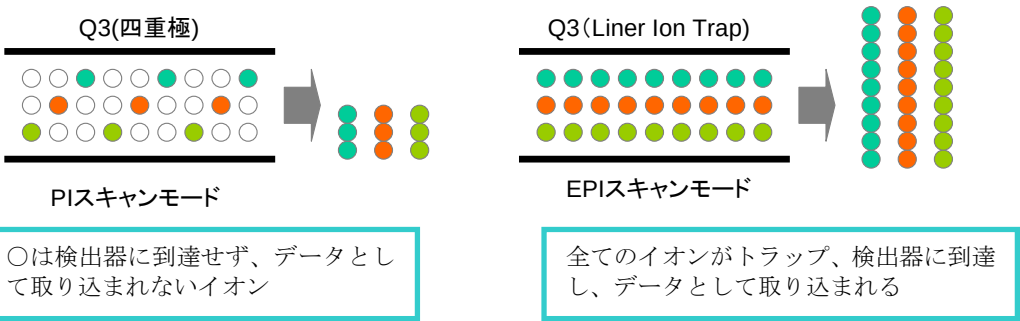
Q3 は Linear Ion Trap(LIT)モードとして機能します。A+、B+、C+ のイオンの全てが、Q3(LIT)に溜められます。

イオン	Q3 の設定電圧
A+ m/z 100 	RF1x
B+ m/z 200 	RF2x
C+ m/z 300 	RF3x

A+ のイオンを検出するとき、LIT には A+ のイオンを検出器へ吐き出すための電圧 RF1x が設定され、A+ のイオンは検出器へ導入されます。A+ を検出している時間は、他の m/z のイオン B+ や C+ は Q3(LIT)に溜められたままです。

次に B+ のイオンを検出器へ吐き出すための電圧 RF2x が設定され、B+ のイオンは検出器へ導入されます。B+ を検出している時間は他の m/z のイオン C+ は Q3(LIT)に溜められたままです。

また、Q3 でスキャンしている間に Q0 でイオンを溜め (Q0 Trapping)、より感度を上げることも出来ます。

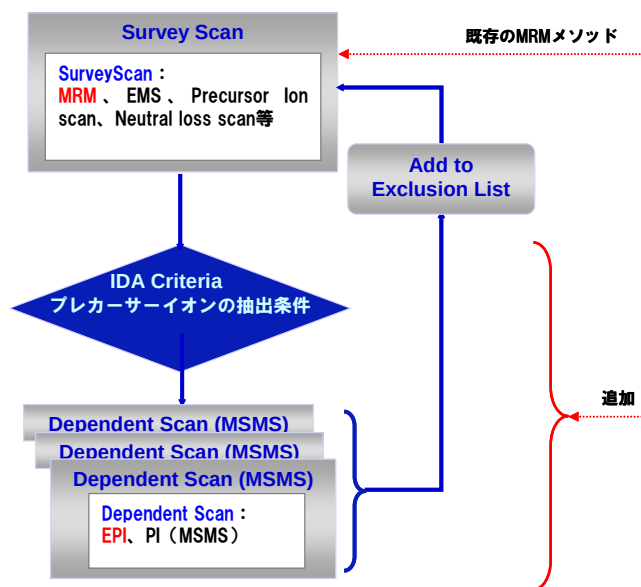


1.2 IDA (Information Dependent Acquisition)

IDA とは、サーベイスキャンを行い、リアルタイムで取得した MS スペクトルから強度の強いイオンを選択し、プロダクトイオンスキャン(MS/MS)のデータを取得する測定方法です。ここではサーベイスキャンに MRM、プロダクトイオンスキャンに EPI のモードを使用します。

* MRM の他に、サーベイスキャンには、Q3scan、EMS、Prec、NL を利用することもできます。

MRM・EPI のメソッドは、①既存の MRM メソッドにプレカーサーイオンの選択条件 (IDA criteria) と EPI を追加して作成する方法と、②IDA Method Wizard を用いて作成する 2 つの方法があります。このマニュアルでは①のみ記載してあります。



* 既存の MRM メソッドは、このトレーニングで作成したものを使用します。

作成したメソッドを使用して標準品の測定を行い、得られた MS/MS スペクトルを次項「ライブラリーへの登録および検索」を参照し、ライブラリーに登録します。

次に作成したメソッドを使用して実サンプルの測定を行い、得られた MS/MS スペクトルを次項「データベースの検索」を参照し、検索を行います。

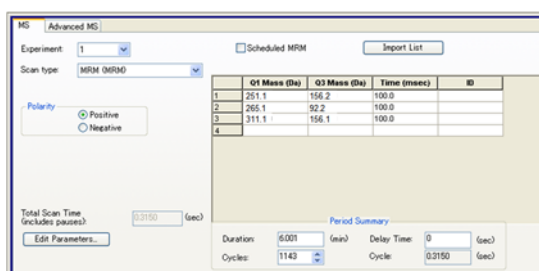
また、標準品と実サンプルで観測されたフラグメントパターンを比較することにより目的物の確認ができます。

* フラグメントパターンとは、フラグメントイオンの m/z 値とそれらの強度比のことです。

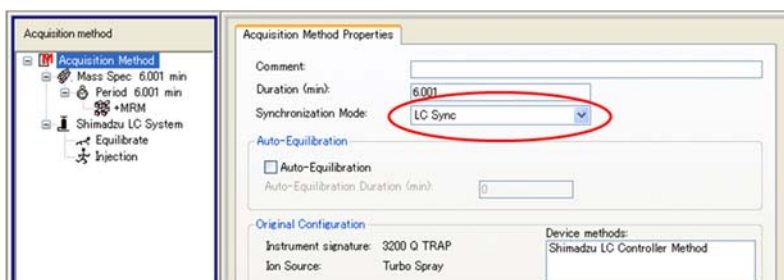
1.3 MRM-EPI Method 作成方法

1. 既存の MRM のメソッドを開きます。

* 今回のトレーニングで作成した Acquisition Method、LC-MRM.dam を開きます

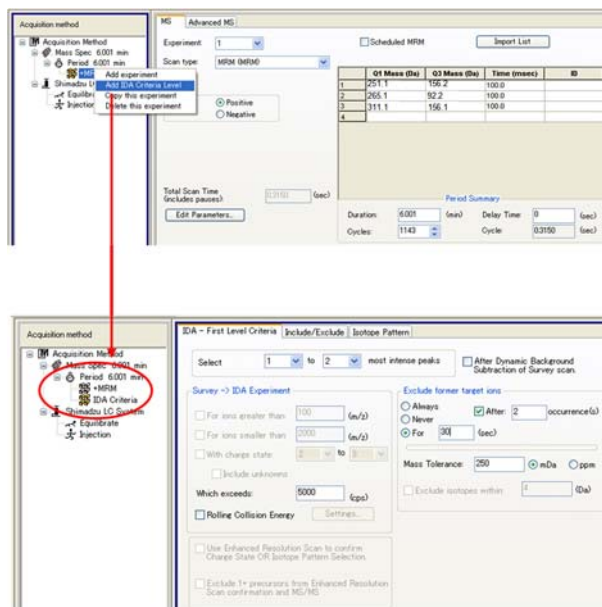


2. Acquisition Method をクリックし Synchronization Mode に LC Sync を選択します。



3. Acquisition Method で experiment (MRM) を右クリックし Add IDA Criteria Level を選択します。

* MRM がサーベイスキャンがとなります。(Experiment1)



ここで IDA Criteria の設定を行います。

(1) Select “1” to “1” most intense peaks とします。

- * これにより 1 番目に強いイオンを自動的に選択し、3 つの異なる CE で EPI を測定することができます。

(2) Which exceeds には、イオンを選択する最低強度を入力します。ここでは 500 を入力します。

- * 500cps を超えた場合にのみ、EPI を取得できます。

(3) Rolling Collision Energy のチェックをはずします

- * Rolling Collision Energy はペプチド分析に有効な機能です。Intercept と m/z 値と価数に応じて CE が自動的に設定できます。ここでは使用しません。

(4) Exclude former target ions の設定を行います

- **Always** : 1 度だけ EPI 測定をし、その後同じ m/z のイオンは EPI 測定をしない。
- **Never** : 同じ m/z でも何度も EPI 測定を行う。

For 10(sec)、After 1 repeat occurrences : 同じ m/z のプレカーサーイオンについて 1 回 EPI 測定したら、その後 10 秒間は同じ m/z のイオンを選択しない。)

IDA 法による MRM-EPI 測定の推奨値は 2 つあります

- **Never** : MRM 測定の結果、検出された各化合物のピークの Retention Time(保持時間)が重なっていない場合
- **For 10(sec)、After 1 repeat occurrences** : MRM 測定の結果、検出された各化合物のピークの Retention Time(保持時間)が近接している (または重なる) 場合。For と After にチェックを入れ、設定します。時間や回数設定は目的物質の溶出時間や IDA Method の Cycle time で判断します。

* 推奨値は For 10(sec)、After 1repeat occurrences になります。

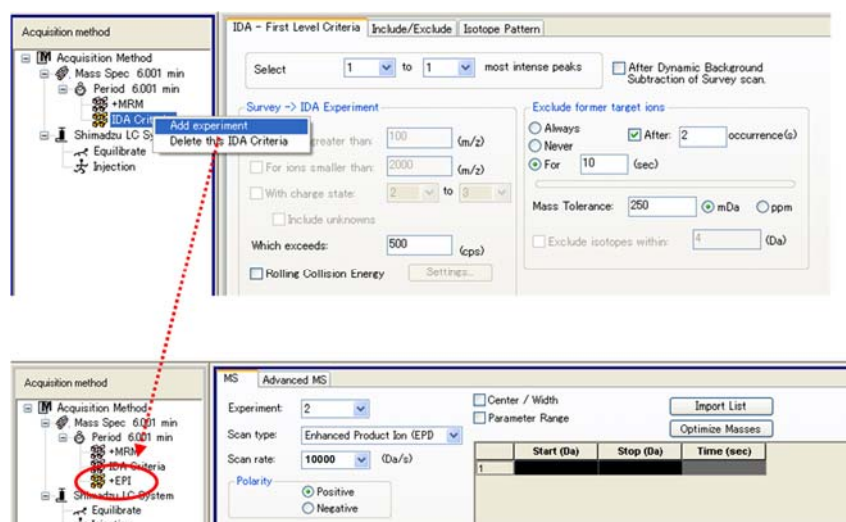
参考) For は目的物質のピーク幅の半分の値を入力します。推奨値はピーク幅が 20 秒間の場合を想定しています。

(5) **After Dynamic Background Subtraction of Survey scan :** ベースラインイオンを排除することでバックグラウンドに埋もれている、イオンの MS/MS スペクトルが取得できるようになります。

* チェックを入れます (詳しくは、質量分析 APIQTRAP 定量トレーニング参考資料の「参考資料 9 Dynamic Background Subtraction (DBS)」を参照ください。

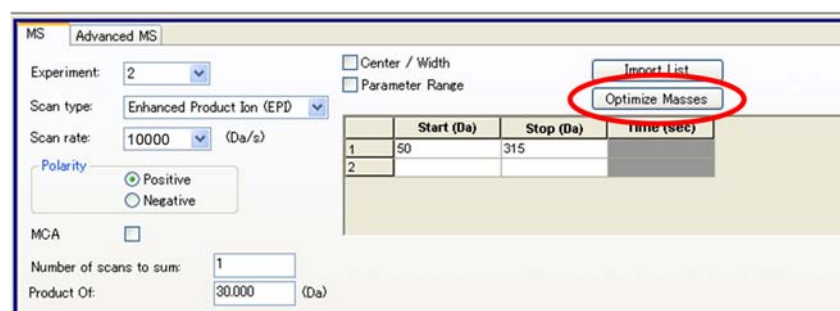
4. 次に IDA Criteria 上を右クリックして Add experiment を選択し、Experiment を 1 つ追加します。

* Experiment2 が追加されます



5. Experiment の Scan Type に EPI を選択し、設定を行います。Start (amu)と Stop(amu)に測定したい範囲を入力し、Optimize Masses をクリックします。ここでは Start 50、Stop 315 を入力します。

* Stop は、MRM トランジションのうち最も大きい Q1 mass + 5 の値を入力します



6. 下図のように表示されます。Scan rate を 10000Da/sec、Number of scans to sum を 1 と入力します。

※Scan rate は装置毎に異なります。下表をご参照ください。

装置	使用する ScanRate	使用する CAD
QTRAP® LC/MS/MS System 3200 QTRAP® LC/MS/MS System 4000 QTRAP® LC/MS/MS System	4000	10
AB SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS System AB SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS System AB SCIEX QTRAP® 6500 LC/MS/MS System	10000	12

7. 次に Advanced MS タブを選択し、Dynamic fill time を選択します。

8. MS タブに戻り、Edit Parameters... ボタンをクリックして、Source/Gas タブの CA の値を設定し直します。Experiment1(MRM)と Experiment2(EPI)の両方について行います。

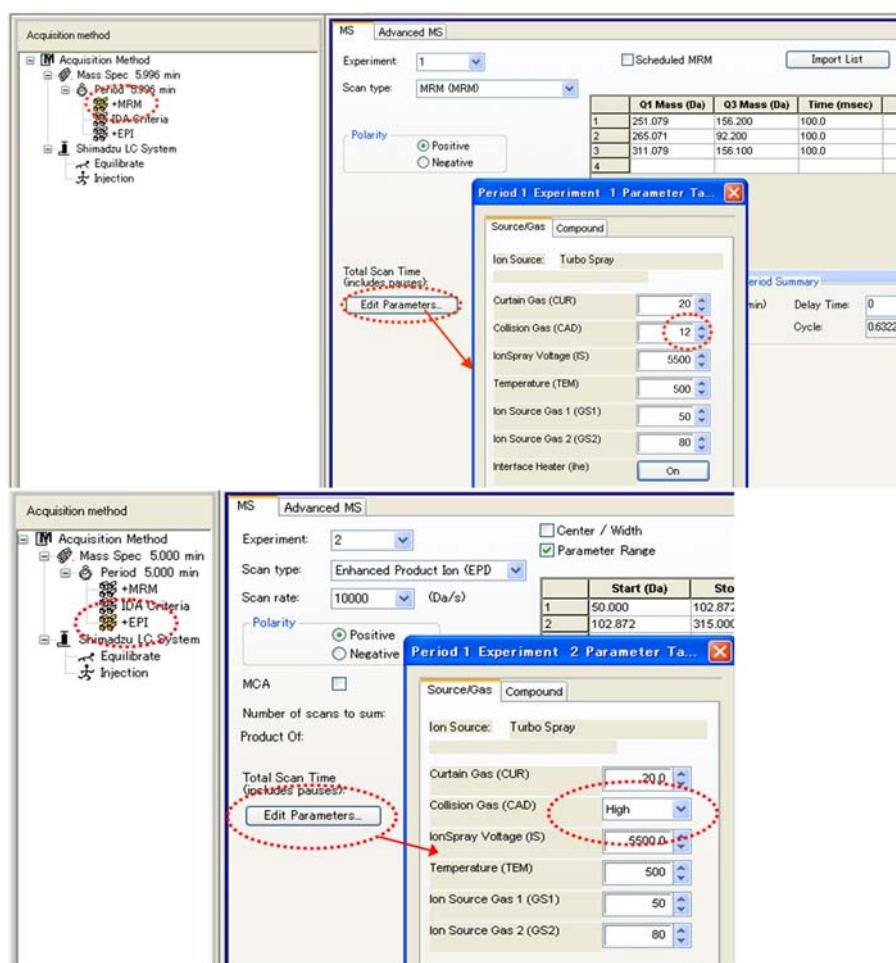
Experiment1(MRM)の CAD は装置毎に異なります。上記表をご参照ください。

Experiment2(EPI)の CAD は High または 12 (10)

* CAD 以外のパラメータには、FIA で最適化した値、もしくは Default の値を入力してください。

Experiment1(MRM)と Experiment2(EPI)とも CAD 以外は同じ値を入力します。

* 農薬の場合、TEM の Default 値は 500℃になります。ただし、熱に弱い化合物を含む場合には、350℃を推奨します。



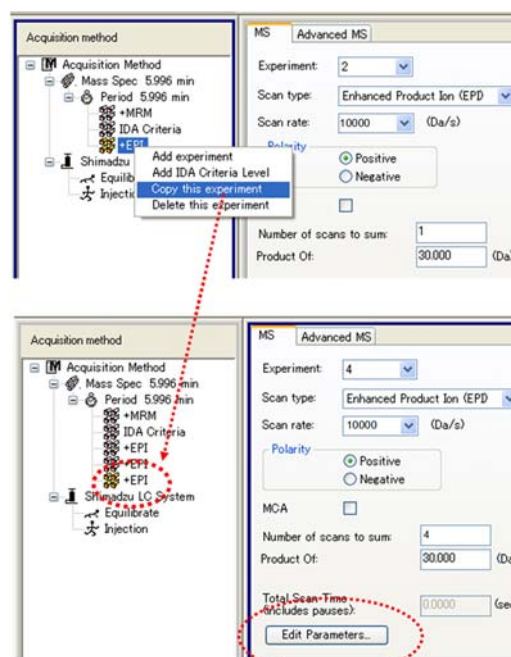
9. Experiment 2 上を右クリックして Copy this experiment を選択し、Experiment3 を追加します。さらにもう一度、Copy this experiment を選択し、Experiment4 を追加します。

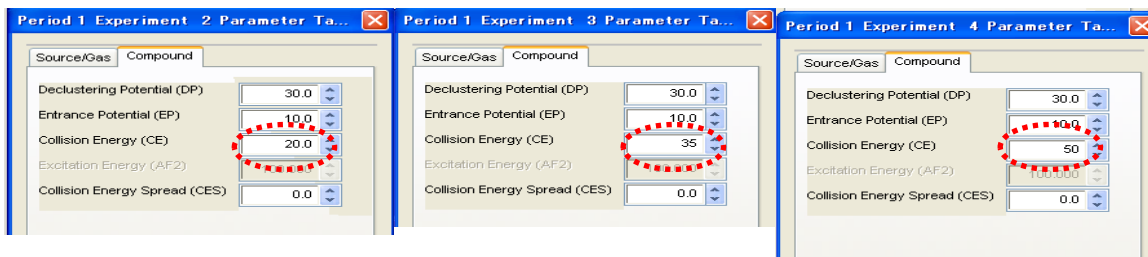
10. EPI の Experiment2~4 の MS タブの Edit Parameters... ボタンをクリックし、Compound タブの DP および CE を入力します。

DP は初期値の 30、もしくは適切な値を入力します。

CE は Experiment 2、3、4 にそれぞれ 20、35、50 と、異なる値を入力します。

CES には「0」を入力します。

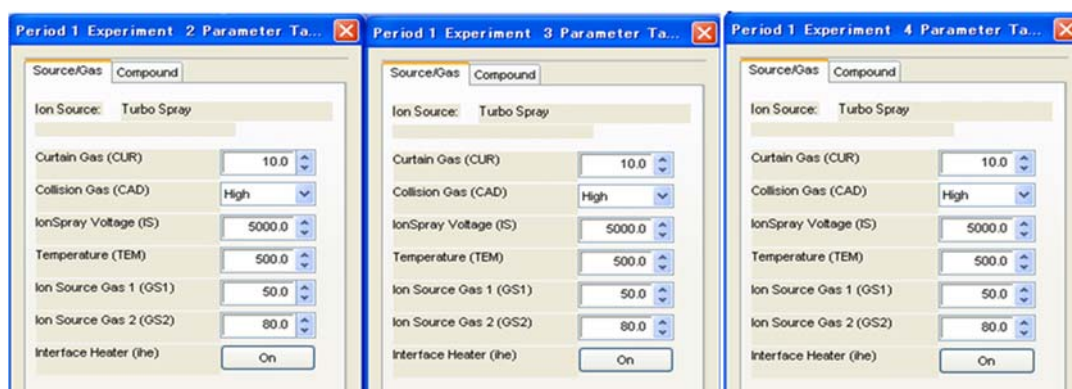




- * CES : CES を入力すると Scan time を 3 分割し、3 種類の CE で測定したデータを足し合わせた形でスペクトルが表示されます。例えば CE に 30 を入力し、CES に 5 を入力すると CE は 30±5 となります。

11. 各 Experiment の、Source/Gas タブをクリックし、Experiment2～4(EPI)とも全てのパラメータについて同じ値が入力されていることを確認します。

- * Experiment2～4(EPI)の CAD は High
- * Experiment1(MRM)と Experiment2～4(EPI)は、CAD 以外は同じ値になります。



12. LC ポンプ、オートサンプラー等の設定を行います。

13. File Menu から Save As を選択し、名称に MRM・EPI を入力して Method を保存します。

14. LC のラインを MS に接続し、測定を開始します。

- * データの閲覧方法は、この後に記載があります

MRM-EPI 測定結果にて、MS/MS スペクトルが取得できなかった場合

MRM クロマトグラムで観測されたピーク約 1000cps が EPI での検出下限値のめやすとなります。(感度は化合物に依存します。)

濃度が低いと、質の悪いスペクトルになる、または全くフラグメントイオンが観測されない場合もあります。その場合は、手順①を下記の設定にして、再度分析してみてください。

Advanced MS タブを選択し、Fixedfill time 100(ms)を入力し、Q0Trapping にチェックをいれます。

※Fixedfill time の値は装置によって異なります。下記表をご参照ください。

MS Advanced MS

Scan mode: Profile

Step size: 0.12 (Da)

Resolution Q1: Unit

Intensity threshold (total count): 0

Q3 Entry Barrier: 8 (V)

Settling time: 0 (ms)

Pause between mass ranges: 1.5 (ms)

Q0 Trapping ☒

Fixed LIT fill time 100 (ms)

Dynamic fill time

装置	Fixed LIT Fill time
QTRAP® LC/MS/MS System 3200 QTRAP® LC/MS/MS System 4000 QTRAP® LC/MS/MS System AB SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS System	250
AB SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS System AB SCIEX QTRAP® 6500 LC/MS/MS System	100

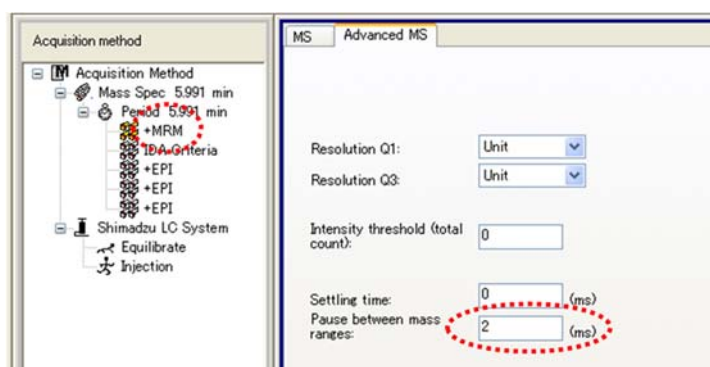
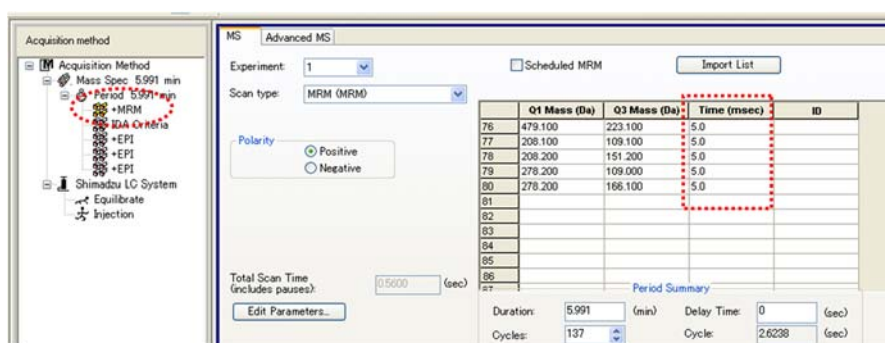
MRM-EPI 多成分一斉分析の推奨設定

サーベイスキャン(MRM)でモニターする成分数が多い場合、Experiment1 (MRM) について、下記の設定をされることをお勧めします。

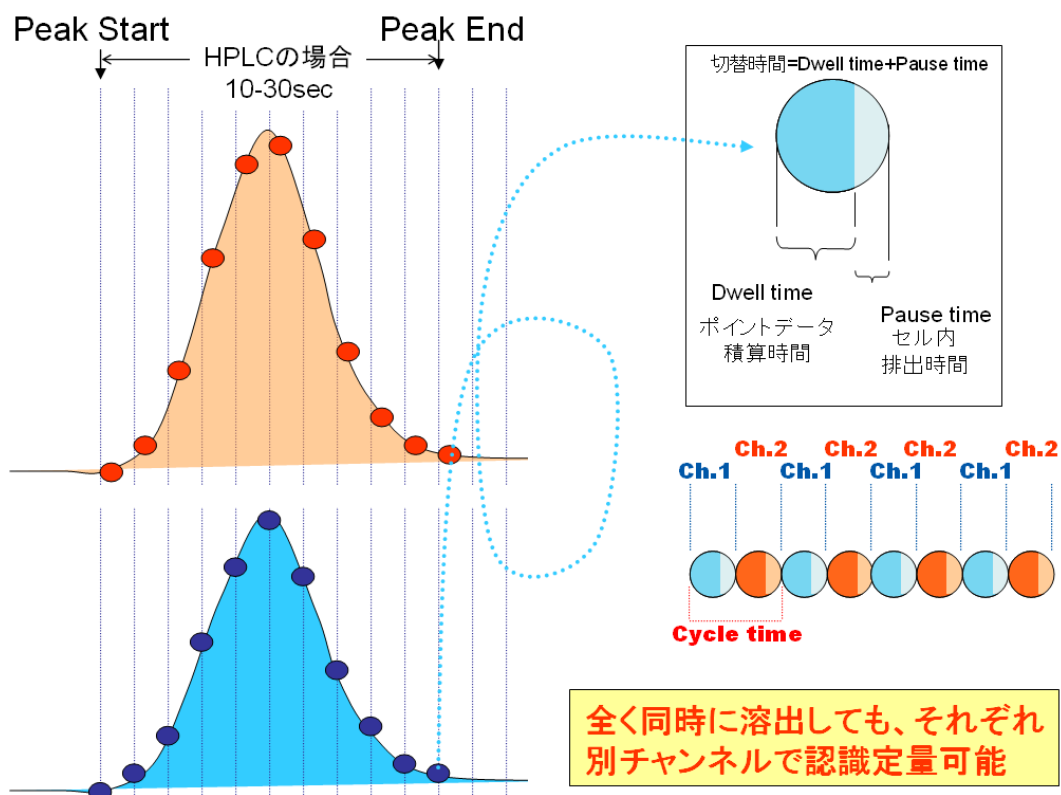
※いずれの設定も、Cycle time を減らすために行っています

- 各 MRM トランジションの dwell time(msec)を合計して、約 500msec になるように dwell time(msec)を設定します。
- dwell time(msec)は、QTRAP®, 3200QTRAP®, 4000QTRAP®では、1 成分あたり 5msec 以上で、QTRAP®4500, QTRAP®5500, QTRAP®6500 では、1 成分あたり 2msec 以上でお使いください。
 - * 10 成分の場合は、 $500\text{msec}/10 = 50 \text{ msec}$
 - * 100 成分の場合は、 $500\text{msec}/100 = 5\text{msec}$
 - * 下記の例) 80 成分の場合、 $500\text{msec}/80 = 6.5\text{msec} \div 5\text{msec}$
- 40 成分を超えるような場合は、Advanced MS タブをクリックします。

Pause time(pause between mass range) を 5msec から 2msec に変更します。



Cycle time、Pause time、Dwell Time とは



Dwell Time とは	1 成分を測定する時間(msec)
Pause time とは	pause between mass range のこと。 1 成分を測定した後、Q2 (コリジョンセル)に残ったイオンを排出し、次の成分を測定する条件に電圧を切り替える時間(msec)。 Default 値は 5msec。
1 成分について 1 ポイント測定するのに要する時間(msec)	= Dwell Time + Pause time
Cycle time とは	MRM・EPI の場合 1 Cycle Time = MRM (msec) + EPI(msec) + EPI(msec) + EPI(msec)

1.4 MRM-EPI により測定したデータの解析

1. IDA Explore の表示

Menu Bar の Tools/Setting/Appearance Options を選択します。IDA Explore のタブをクリックし、Use IDA Explorer to Display IDA Samples にチェックをすると IDA Explore の形式で表示されます。



2. Explore の形式で画面が表示されることを確認してください。

※ トレーニングでは先ほど取得した IDA のデータ (MRM-EPI.wiff) を使用します

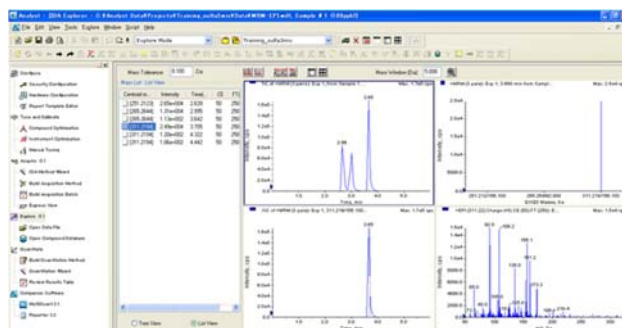
3. データの確認

Window 左側の Mass List View で、イオン (m/z) をクリックして選択してください。

Window 右側に、選択したイオンのクロマトグラム、スペクトルが表示されます。

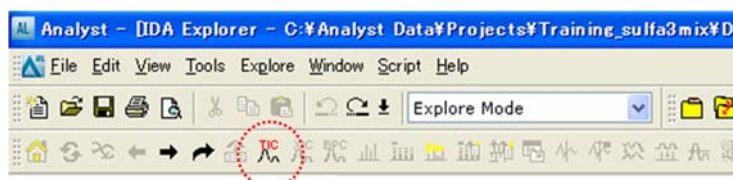
IDA Explore で表示した画面

- Mass List View の Time(min)、 m/z 、Intensity のタイトルをクリックすると、昇順・降順で並べ替えることができます。
4. クロマトグラムの表示



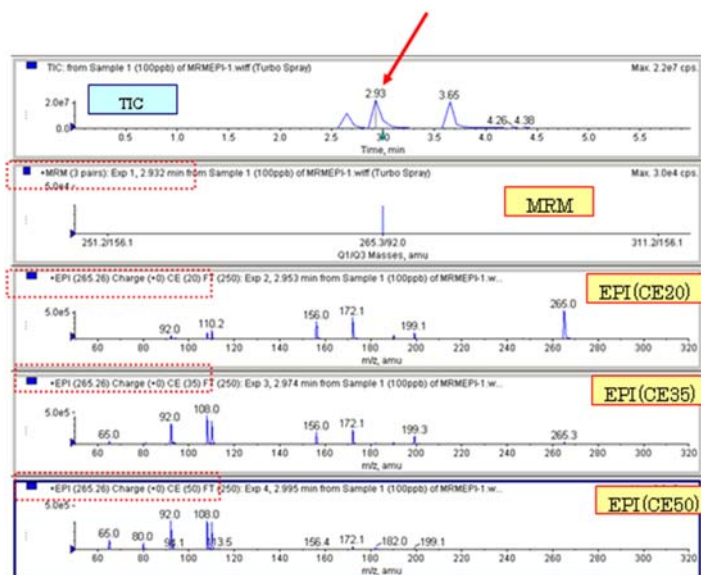
より詳細なデータを確認するために、TIC 上での操作を行います。

TIC を画面に表示するには、Tool Bar の *Show TIC* icon  をクリックします。



5. TIC の画面が開きます。ピーク上 (2.9 分) をダブルクリックすると、その時間の MRM スペクトルと 3 つの EPI MS/MS スペクトル (m/z 265) が表示されます。

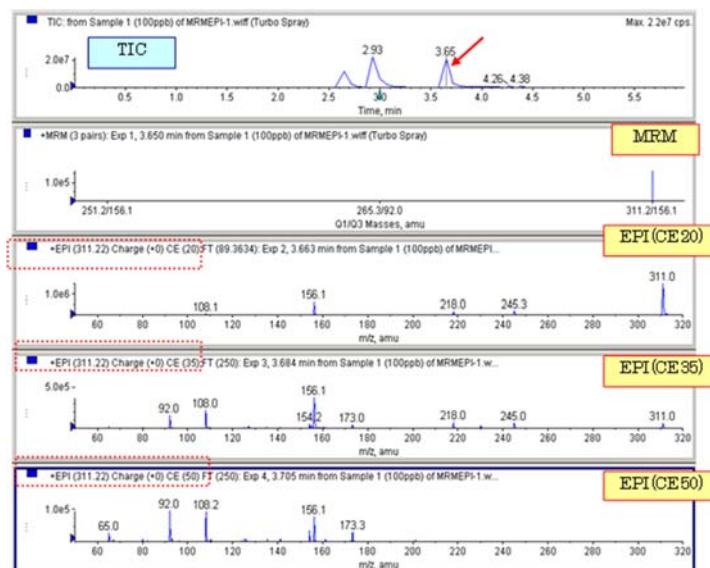
※ 上から順番に MRM、EPI(CE20)、EPI(CE35)、EPI(CE50)と並びます



6. その他のピークの確認

TIC の 2.9 分付近のピーク上の点線をドラッグして別のピーク (3.7 分) へと移動させます。移動後の 3.7 分の MRM スペクトルと 3 つの EPI MS/MS スペクトル(m/z 311)が表示されます。

※ 表示させた MS/MS スペクトルのライブラリー登録方法につきましては、「2.ライブラリーへの登録および検索」をご参照ください。



2 ライブラリーへの登録および検索

この章で学べること

Analyst® software のライブラリー機能について解説します。

ライブラリーとは、MS/MS スペクトルデータベースのことです。化合物情報や MS/MS スペクトルの登録、追加、編集、検索を行うことができます。

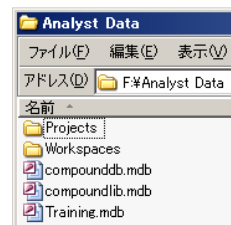
MRM で検出、同定された化合物について、前章の方法で EPI MS/MS スペクトルを取得し、ライブラリー検索を行うことによって、MRM の同定結果の信頼性を高めることができます。

- 2-1 ライブラリーデータベースの選択方法
- 2-2 ライブラリーの登録
- 2-3 ライブラリーへの追加と編集
- 2-4 ライブラリーの検索
- 2-5 新規にライブラリーデータベースを作成する方法

2.1 ライブラリーデータベースの選択方法

使用するデータベースを選択して使い分けることにより、目的のデータベースを構築、検索することができます。

例えば、農薬のデータベース、ドラッグのデータベースと複数のファイル(*.mdb)が存在する場合、ライブラリーに利用するデータベースを切り替えて使用できます。

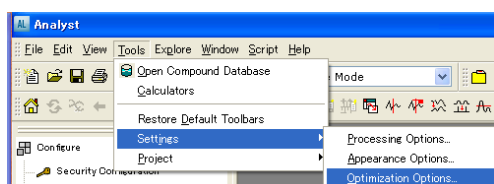


※ 注意！) 2つのデータベースを作成した後、1つに合併させることはできません。

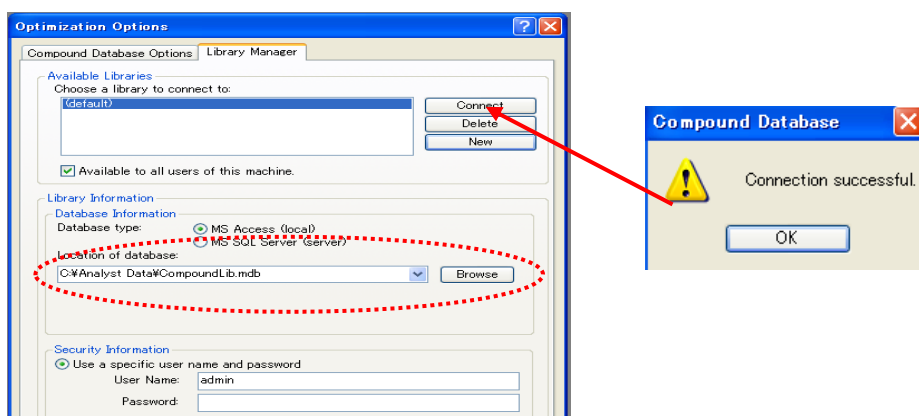
操作方法

Training.mdb を使用して、操作を行ってください。

1. Analyst®ソフトウェアの Explorer モードにて、Tools メニュー > Settings > Optimization Options... を選択し、右の画面を表示させます。



2. Library Manager タブの Browse ボタンで、使用するデータベースを選択します。
3. Connection を押して、Connection Successful のメッセージが出ることを確認します。
4. OK をクリックします。

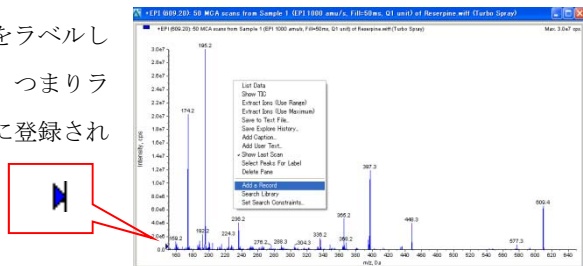


2.2 ライブラリーへの登録

※ Training では Project : Example、LIT フォルダ中の Reserpine の EPI データを使用します。

1. Explore の Open Data File をダブルクリックし、EPI で取得したデータを開きます。クロマトグラムを左ドラッグでピークを選択し、続いて選択部分をダブルクリックして MS/MS スペクトルを表示します。

* 青三角印を上下させ、ノイズの m/z をラベルしないようにします。この矢印より上、つまりラベルされた m/z 情報がライブラリーに登録されます。



2. 画面上を右クリックし、Add a Record を選択します。(または Tool Bar の Explore/Library Search/Add...を選択します。)
3. 以下のウィンドウが開きますので、Mass Spectral Information タブにて、Compound Name、Formula、CAS Number などを入力します。

* Mass Spectrum と Molecular Weight、 m/z 、Intensity、Mass Spec Data 等は自動で入力されます。

* Formula を入力すると、精密質量が計算され、Molecular Weight に表示されます。

スペクトルの m/z の情報と共に、分析した際の条件が自動的に反映されます。

4. **General Information** タブにて、Mol File で作成した構造式や UV スペクトル等の情報を登録します。 構造式を登録する場合は、**Open Molecular Structure File Name** の **Browse...**をクリックします。ファイルを選択して **Open** をクリックすると構造式が **Import** されます。

* 構造式は **ISIS Draw** もしくは **Chem Draw** などの市販のソフトウェアを用いて作成し、あらかじめ.mol の形式で保存します。

* **Analyst®**ソフトウェアは.mol の形式で保存された構造式のみ読み込み可能です。

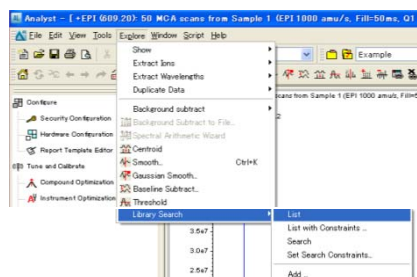
必要に応じて **Other Information** に情報を入力します。

5. **OK** をクリックすると、登録は完了です。

2.3 ライブラリーへの追加と編集

既に登録されている化合物に対し、スペクトルの追加や登録情報の変更ができます。

1. **Explorer** モードで、追加したい MS/MS スペクトルを表示します。



* 青三角印を上下させ、ノイズの m/z をラベルしないようにします。

この青三角印より上、つまりラベルされた m/z 情報がライブラリーに登録されます。

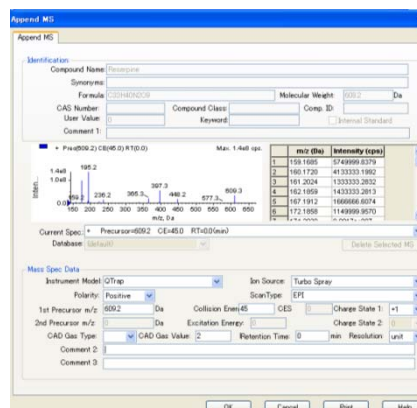
2. **Tool Bar** の **Explore/Library Search/List** を選択します。

スペクトルを追加する

3. 下図のデータベースが開きますので、追加する化合物の行を選択し、**Append MS** をクリックします。

	Compound Name	Formula	Molecular Weight (Da)	CAS Number	Num of S
1	Glutelin	C19H17O1	372.0877	3820-67-5	3
2	Prefenide	C17H18N	362.0936	55637-27-9	1
3	Lorazepam	C15H10Cl2	320.0119	846-49-1	1
4	Simvastatin	C25H38O2	418.2719	79902-63-9	1
5	Milrinone	C12H8N2	211.0746	78415-72-2	1
6	Warfarin	C19H15O2	307.0870	81-81-2	2
7	Phenobarbital	C12H11N	231.0770	50-06-6	1
8	Epinephrine	C9H13NO	183.0895	51-43-4	2
9	Metanephrine	C10H15N	197.1052		2
10	Normetanephrine	C9H13NO	183.0895		2
11	Bromocriptine	C20H20BrN	353.2213	25614-03-3	4
12	Ergonovine	C23H34N2	354.2608		1
13	Risperidone	C23H27F3N5	437.2000		1

Total: 13 records in: (default)



m/z 、Intensity、Mass
Spec Data等は自動的に
に入力されます。

4. 登録情報を確認し、OK をクリックします。

登録情報を変更する

5. 変更する化合物の行を選択し、Edit をクリックします。続いて登録情報を変更します。

2.4 ライブラリーの検索

1. Explorer モードで、検索したい MS/MS スペクトルを表示します。

※ トレーニングでは、Reserpine の EPI MS/MS スペクトルを使用します。

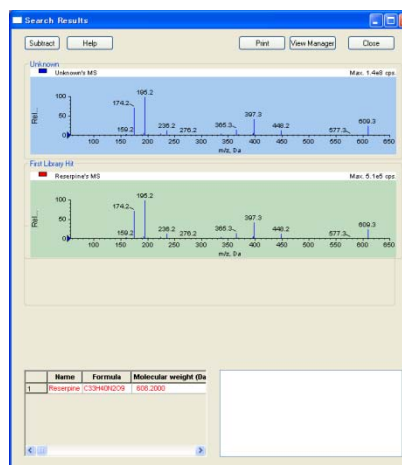
※ 青三角印を上下させ、ノイズの m/z をラベルしないようにします。この矢印より上、つまりラベルされた m/z 情報でライブラリーを検索します。

2. 画面上で右クリックし、Search Library を選択します。(または Tool Bar の Explore/Library Search を選択します。)

3. 検索結果が表示されます。

4. 一番上の段は Unknown's MS (測定した MS/MS スペクトル)、2 番目の段は検索結果で 1 番目に Hit した化合物のライブラリースペクトルです。

5. また View Manager をクリックし Show UVs にチェックをすると UV のクロマトグラムが表示されます。



※ UV のデータが登録されている場合にのみ表示されます。

※ Fit : Unknown スペクトルに対して、ライブラリーのスペクトルが何%一致しているか

※ Revfit : ライブラリーのスペクトルに対して、Unknown スペクトルが何%一致しているか

※ Purity : Fit、Revfit の結果を総合的に評価した一致率

検索条件を指定する

※ フラグメントイオンの m/z だけでなく、登録情報の項目を指定して検索ができます。

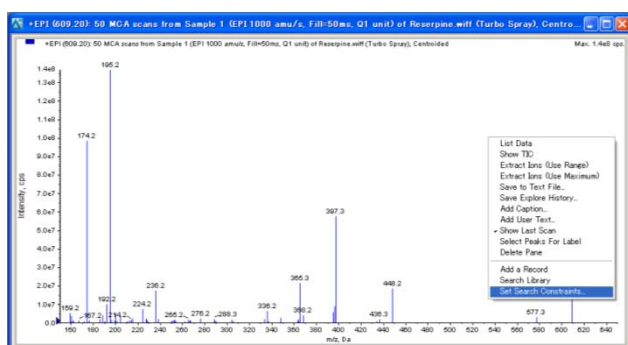
検索するデータを絞り込むことができるため、検索の精度が向上します。

推奨は、CE および 1st Precursor m/z の検索条件を指定することです。

トレーニングでは、Reserpine の EPI MS/MS スペクトルを使用します。

※ CE=45、1st Precursor は m/z 609.2 です。

6. MS/MS スペクトル上を右クリックし、Search with Constrains...を選択します。



CE の検索条件設定

7. Collision Energy にチェックを入れ、+/-に 0 を入力します。

※ 測定データの CE の値は自動で認識されます。

※ Reserpine の EPI MS/MS スペクトルは、Collision Energy (CE) =45 で測定を行ったので、CE=45 で登録されたデータのみ検索を行います

1st Precursor m/z の検索条件設定

8. 1st Precursor m/z にチェックを入れ、+/-に 1 を入力します。

※ 測定データの Precursor m/z の値は自動で認識されます。

※ Reserpine の Precursor ion は m/z 609.2 なので、Precursor ion が m/z 608.95~609.45 で登録されたデータのみ検索を行います

9. Search をクリックします。

2.5 新規にライブラリーデータベースを作成する方法

Analyst から新規にライブラリーデータベースを作成することはできません。既存の Compoundlib.mdb を複製後、名前を変更して利用します。

1. Windows の Explore で、X:\AnalystData フォルダを開きます。

2. compoundlib.mdb ファイルをコピー&ペーストします。

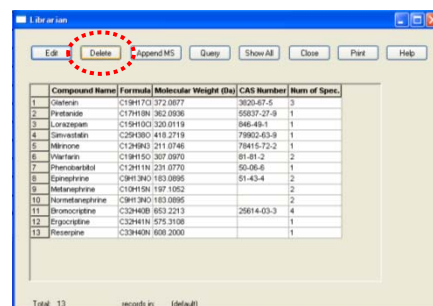
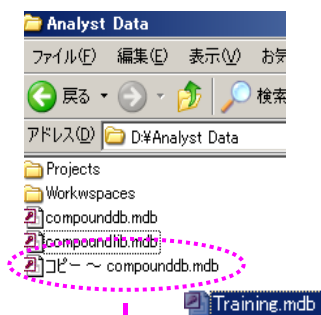
* compoundlib.mdb 上を右クリック> ポップアップメニューから Copy を選択し、続いてフォルダ中の空欄部分を右クリック> ポップアップメニューから paste を選択します。

3. copy ~compoundlib.mdb が作成されますので、名前を変更してください。

* copy ~compoundlib.mdb 上を右クリック> ポップアップメニューから Rename を選択します。
(例 : Training.mdb と命名)

4. Training.mdb には、前者で使用した Compoundlib.mdb のデータが含まれていますので、適宜データを削除して使用してください。

* データの削除方法につきましては、Tool Bar の Explore/Library Search/List を選択し、左記ウィンドウの Delete ボタンで実行できます



この操作により、名称は異なりますが内容がまったく同じデータベースが2つ存在することになります。この時点で

は Analyst®ソフトウェアは compoundlib.mdb を認識しています。今回、新規作成した Training.mdb を使用する場合は、21 ページ「2.1 ライブラリーデータベースの選択方法」をご参照ください。

以上で、MRM-EPI 測定～ライブラリートレーニングは終了です。

3 MRM3 を用いた定量

この章で学べること

Analyst® software の MRM3 機能について解説します。

MRM3 とは、LIT (Linear Ion Trap) スキャンモードの一つ、MS/MS/MS を用いた定量分析法です。

検出された 2nd Product Ion のスキャンデータからマスキロマトグラムを作成することにより、MRM モードよりも高い選択性を示すことができます。

MRM モードの測定において複雑なマトリックスや溶媒由来の影響でバックグラウンドが高くなる場合に、選択性の高い MRM3 による定量は非常に有効な手段です。

※ QTRAP4500、5500、6500LC/MS/MS システムに有効な測定モードです。

- 3-1 MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について
- 3-2 MRM3 Optimization Script を用いた自動最適化
- 3-3 マニュアルでの最適化
- 3-4 イオンソースの最適化
- 3-5 Acquisition Method の作成
- 3-6 Explore モードでのデータ確認方法
- 3-7 MS/MS/MS の定量解析

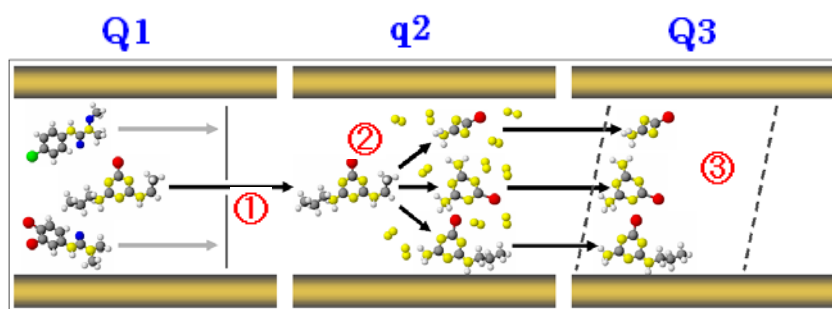
3.1 MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について

3.1.1 MS/MS/MS とは

LIT(Linear Ion Trap)スキャンモードの一つです。

Q1: Precursor Ion の選択 → q2 Collision Cell: Fragmentation → Q3 (LIT のモード): 2nd Precursor Ion の選択 → Fragmentation → Scan になります。

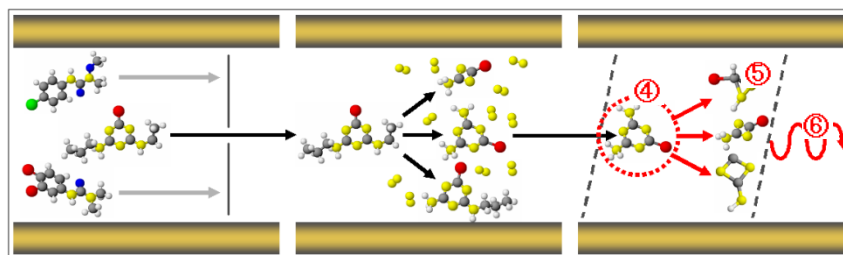
MS/MS/MS (MS3)は、q2 で生成したフラグメントイオンのうち、特定のフラグメントイオンをイオントラップ内で単離し、さらにフラグメンテーションするスキャンモードです。



➤Q1 で 1st Precursor Ion が選択されます。

➤1st Precursor Ion は、q2(Qurve® LINAC® Collision Cell)でフラグメンテーションを受け、1st Product Ion を生成します。

➤1st Product Ion は、Q3(Linear Accelerator™Ion Trap)に導入され、トラップされます。



➤Q3 でトラップされた 1st Product Ion から、2nd Precursor Ion が分離されます。

➤ 2nd Precursor Ion は、Q3 において単一周波数で励起され、フラグメンテーションを受け、2nd Product Ion が生成されます。

➤ 生成された 2nd Product Ion が Q3 でトラップされた後、スキャンされ検出されます。

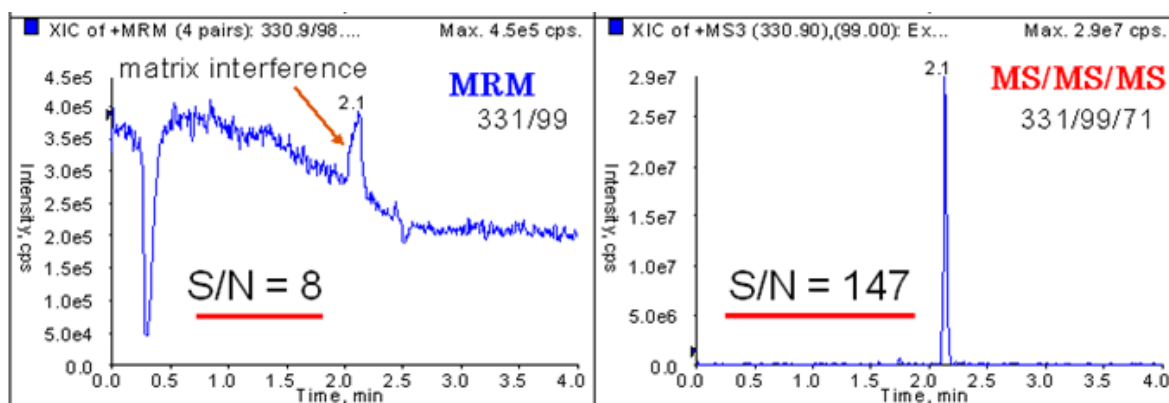
3.1.2 MRM3 による定量とは

MS/MS/MS(MS3)スキャンを使用し、検出された 2nd Product Ion のスキャンデータからマスキロマトグラムを作成することにより、MRM モードよりも高い選択性を示すことができます。

MRM モードの測定において複雑なマトリックスや溶媒由来の影響でバックグラウンドが高くなる場合に、選択性の高い MRM3 による定量は非常に有効な手段です。

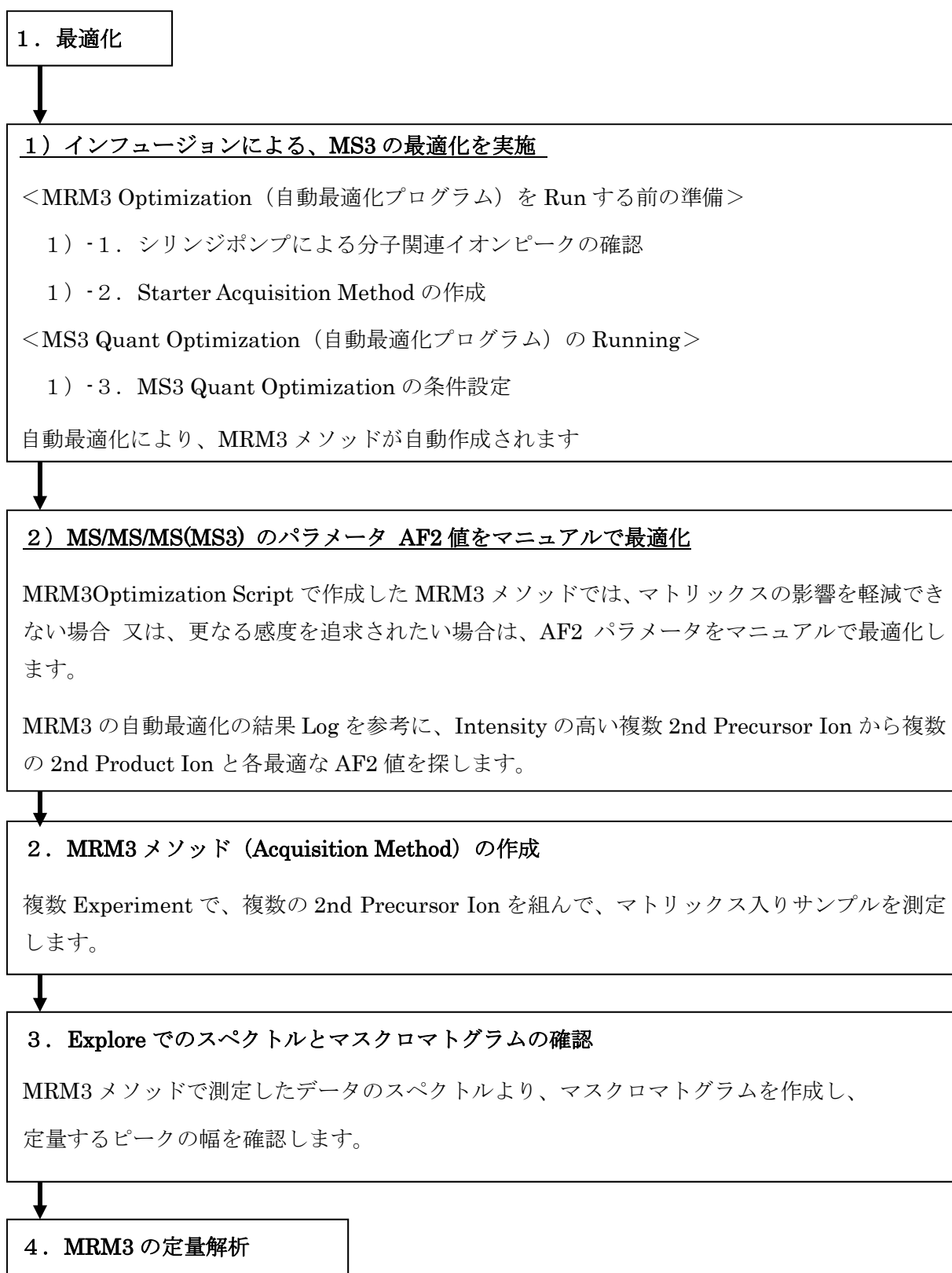
バックグラウンドが低い場合には、MRM モードでの測定が有効です。

＜りんご中の Malathion を MRM モード及び MRM3 で測定した、クロマトグラムです＞



MRM3 の選択性の高さがわかります。

3.1.3 MRM3 測定の流れ



3.2 MRM3 Optimization Script を用いた自動最適化

- * Training ではレセルピン及びプロモクリプチン標準溶液を用いて、最適化～定量までを説明します。他の成分でも同様の手順にて測定を行うことが出来ます。

3.2.1 MRM3 Optimization Script のインストール

Analyst® Software のインストール時にインストールされます。

3.2.2 MRM3 Optimization Script のメソッド作成工程

MRM3 メソッドは以下の順に種々のスキャンモードを用いて、自動最適化を行ないます。

1. 1st Precursor Ion の測定

Enhanced Resolution (ER)スキャンを使用します。

- * ER は分解能を上げ、イオンの価数またはアイソトープパターンの確認を行うスキャンモードです。詳細は定性マニュアル「QTRAP システムシリーズ定性用説明資料」を参照下さい。

2. DP および EP 電圧の最適化

Q1 Multiple Ion (SIM)スキャンを使用します。

3. 2nd Precursor Ion の測定と 定量メソッドに用いる 2nd Precursor Ion の選択

Enhanced Product Ion (EPI)スキャン CE = 45V±20V を使用します。

4. CE 電圧の最適化

Multiple Reaction Monitoring (MRM)を使用します。

5. 2nd Product Ion の測定と定量メソッドに用いる 2nd Product Ion の選択と AF2 電圧の最適化

MS/MS/MS (MS3) スキャンを使用します。

AF2 の値は、電圧を上げていき、2nd Precursor Ion が 5% 残存する電圧を採用します。

- * AF2 は LIT 内で 2nd Precursor Ion を壊すエネルギーです。(QT5500 の場合、0v から 0.3v を 0.015v 刻みで Ramp していきます)

決定した AF2 電圧を用いて MS3 スキャンを測定し、生成した 2nd Product Ion のうち、強度の強い 2 個を選択します。

ただし、2nd Precursor Ion のカウント数が、総カウント数（2nd Precursor Ion のカウント数 + 生成した 2nd Product Ion のカウント総数）の 10%以上であった場合、“フラグメントイオンなし（no fragments）”として判断され、メソッドは作成されません。

6. 定量用 MRM3 メソッドの自動作成

最適化した結果、最も強い Intensity が観察された 2nd Product Ion を定量用 MRM3 メソッドとして採用します。

3.2.3 MRM3 Optimization（自動最適化プログラム）を Run する前の準備-1

シリンジポンプを用いて 5~10 μ L/min 流速で標準溶液を連続注入し、Q1 スキャンで分子関連イオンを確認します。

1. 標準溶液を調製します。

QTRAP® 5500、6500 LC/MS/MS System では 100ng/mL 程度、QTRAP® 4500 LC/MS/MS System では 500ng/mL 程度を用意します。ただし、測定対象の感度に応じて、濃度を調製する必要があります。

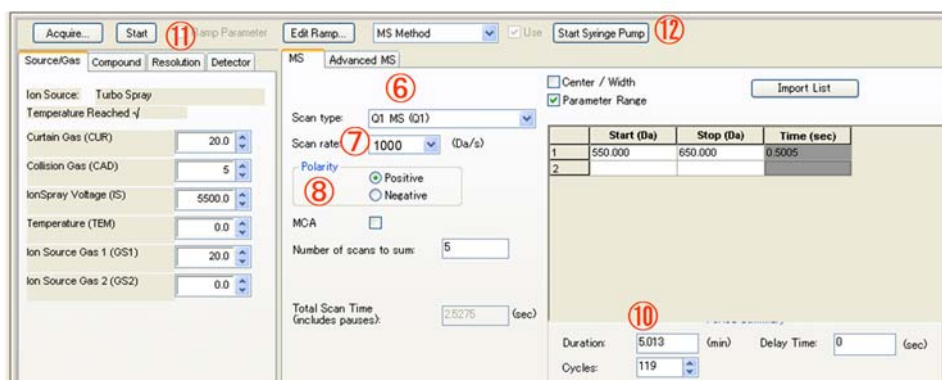
2. 標準溶液をシリンジに詰め、シリンジポンプにセットします。

3. ターボイオンスプレーが装着されていることを確認します。

イオンソースのタイプは Analyst®software 画面の右下マスのアイコンをダブルクリックすると表示されます。

4. シリンジとイオンソースを接続します。

5. Tune モードの Manual Tuning をダブルクリックします（画面が開きます）。



6. 左側は初期値のままとし、右側の **Scan type** が **Q1MS(Q1)**になっていることを確認します。

7. **Scan rate** を選択します。

- * **Scan rate** は、10、200、1000、2000Da/s を選択できます。

- * **Training** では、1000Da/s を選択します。

8. **Positive** モードあるいは **Negative** モードを選択します。

- * **Training** では、**Positive** を選択します。

9. **Scan type** の右側の **Start** および **Stop** に測定したい範囲を入力します。

通常、目的化合物の分子量の **10Da** 程度小さい値から、**50Da** 程度大きい値(アダクトを確認するため)を入力します。複数の化合物を同時に最適化する場合、すべての化合物が観測される範囲に設定します。**Time** はこの **Scan** の 1 サイクルあたりの時間(秒)で、自動で入力されます。

- * レセルピンの場合は、**Start-Stop** に 550 から 650 までを入力します。

- * ブロモクリプチンの場合、**Start-Stop** には 600 から 700 までを入力します。

10. 画面中央下部の **Duration** に測定時間を入力します。

- * シリンジでの連続注入が安定しているかどうかを確認するために、5～10 分程度を入力します。

11. 左上の **Start** をクリックし、測定を開始します。

- * **Acquire...** ボタンをクリックして測定を開始しない場合は、測定データは保存されません。

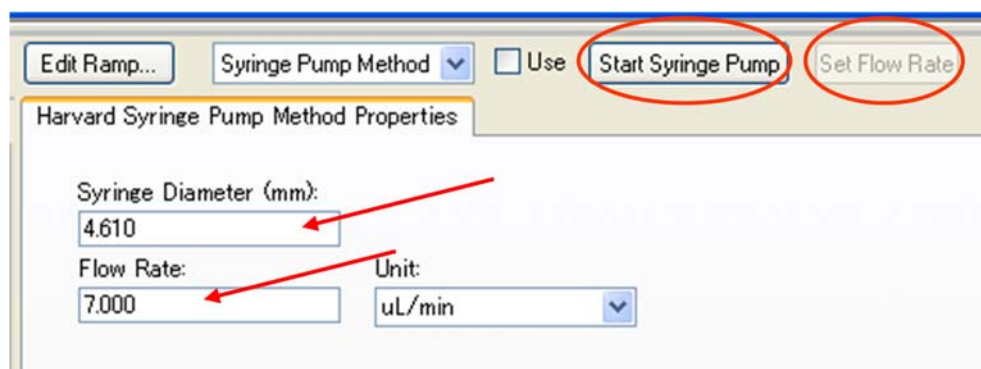
12. シリンジポンプをスタートします。流速は、5～10 μ L/min 程度とします。

- * 最初、チューブの中にエアが入っていると、スペクトルが不安定になることがあります。

- * しばらく経つと安定します。急いでいる場合は、少し手で押すか、流速を最初のうちだけ上げて測定します。

<シリンジポンプのスタート方法>

QTRAP® 5500 LC/MS/MS System はシリンジポンプが内蔵されていますので、Manual Tuning 画面から制御できます。



- (1) Syringe Pump Method を選択し、Syringe Diameter にシリンジの内径を、Flow rate に流速を入力後、Start Syringe Pump ボタンをクリックします。

* ボタンは Stop Syringe Pump に変わります。

- (2) 測定途中で流速を変更したいときは、Flow rate に流速を入力後、Set Flow rate ボタンをクリックします。

- (3) シリンジポンプを止めたいときは、Stop Syringe Pump ボタンをクリックします。

13. 以下の 4 項目をチェックしてください。自動最適化を実行するにあたり、以下の条件を満たしておく必要があります。

- * 左下のクロマトグラム画面にて TIC が安定していること
- * Positive、Negative のどちらでイオン化するか確認すること
レセルピン及びプロモクリプチンの場合、Positive モードの方がよりイオン強度が強くなります。
- * 目的化合物の分子関連イオンが観測されていること (m/z 609 及び m/z 654)
- * 分子関連イオンの強度が低くても、高くてもソフトは止まりません。
- * 少し濃い $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cps 濃度を使うと夾雑と間違える可能性が低くなります。

14. 確認した後、左上の Stop をクリックし測定を止め、Manual tuning 画面を閉じます。

画面を閉じる前に保存するかどうかの警告がでますので、No で閉じます。

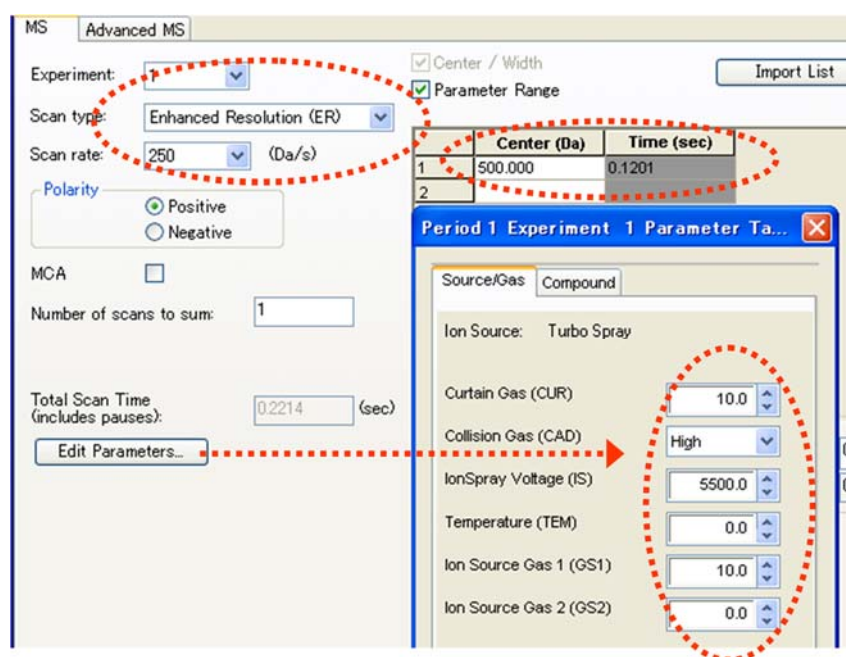
このときシリンジポンプは動いたままにしておいてください。

3.2.4 MRM3 Optimization（自動最適化プログラム）を Run する前の準備-2

全自動 MS/MS/MS メソッドを作成するための Starter Acquisition Method を作成します。このメソッドにて分子イオンの m/z を自動的に確認し、その後、その分子のフラグメントイオンの評価を行いません。

1. Analyst®software の Acquire モードから、Build Acquisition Method をダブルクリックします。
2. 次の図のような仮の Method を作成します。

Scan Type は Enhanced Resolution(ER)を選択し、Center には適当な数字を入力します。Scan rate は、250Da/s のままにしてください。この段階ではイオン源パラメータは、TEM が「0」の Default 値のままにします。



3. Syringe Pump の Diameter を 4.61、Flow rate を 5~10ul/min に設定します。
4. Method の名前をつけて Save します。

* トレーニングでは Starter method. dam という名前で保存します。

3.2.5 MRM3 Optimization (自動最適化プログラム) の Running

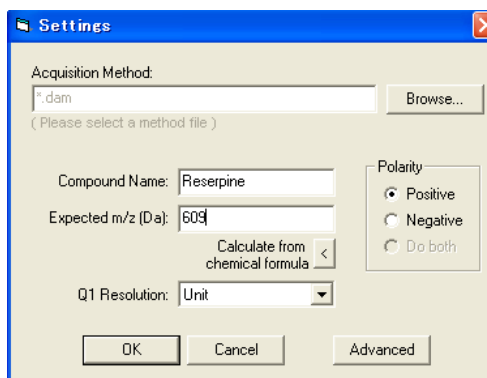
MRM3 Optimization の条件設定を行います。

1. メニューバーの **Script** > **MRM3 Optimization** を選択します。

右記のような画面が表示されます。

- * この画面はメイン画面の **Setting** ボタンをクリックすることでも表示できます。

2. **Acquisition Method** の **Browse...** ボタンをクリックし、34 ページで作成した **Starter** メソッドを指定します。



- * トレーニングでは **Starter method. dam** を選択します。

3. **Compound Name** に化合物の名前を入力します。

- * トレーニングでは **Reserpine** と入力します。

4. **Q1 Resolution** から **MS/MS** や **MRM3** を測定する際の **Q1** の分解能を選択します。

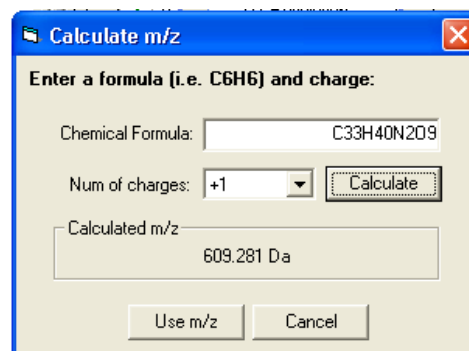
- * トレーニングでは **Unit** を選択します。

5. **Expected m/z (amu)** に最適化したい **MS** 値を入力します。

- * トレーニングでは **609amu** と入力します。
- * 分子量などわからない場合は、**Calculate from chemical formula** ボタンをクリックし、組成式から計算することができます。

6. **Polarity** から標準物質がイオン化する **Polarity** を選択します。

- * トレーニングでは **Positive** を選択します。



7. **Setting** 画面の **Advanced** ボタンをクリックします。

次頁のような画面が表示されます。

Advanced Settings

Enhanced Resolution
Finds the most intense peak within a 2 Da window of expected 1st precursor molecular weight. Mass range window defaulted to 30 Da around expected mass to charge ratio.
Scan Rate: 10000 (Da/s)
Cycles: 20

Q1 Multiple Ion
Optimizes DP and EP. DP re-optimized if -10<EP<10. CEP is optimized only when applicable. Smooths TIC 2 times and finds voltage yielding greatest ion count.
DP Ramp: Start 0, Stop 200, Step 5 (0-200V)
Dwell Time: 100 (ms)

Enhanced Product Ion
Finds the most intense 2nd precursor peaks, excluding any peaks within a 5 Da window of 1st precursor.
Scan Rate: 10000 (Da/s)
2nd Precursors: 5 (1-10)
Mass range: 225 to 1000
CE: 40 CES: 15
Cycles: 3

Multiple Reaction Monitoring
Optimizes CE values for the most intense 2nd precursor peaks by cycling through each XIC overlay. XIC graph smoothed 2 times and voltage yielding greatest ion count is determined. (CE is ramped for its entire range with a 2V step size)
Dwell Time: 50 (ms)

MS/MS/MS
XIC graph smoothed 2 times. Finds 2 most intense 3rd precursors at 5% max intensity. Exclude peaks within 2 Da window of 2nd precursor (parent must be <10% total ion count). (AF2 is ramped for optimal sensitivity.)
Scan Rate: 10000 (Da/s)
☒ Use Q0 Trapping
Fixed Fill Time: 20 (ms)
Mass range: 100 to 1000

Generate Final Methods
Creates final MS/MS/MS methods with mass range of 50 Da to 2nd precursor + 0.8 Da for each top 2nd precursor. Creates optimal MS/MS/MS method with 20 Da mass range window around most intense 3rd precursor.
☒ Save All Final Methods
☐ Save Optimal Method Only

OK Cancel

(1) Enhanced Resolution

Scan rate : ER スキャンのスキャンスピードを選択します。

- * トレーニングでは 10000Da/sec にします

(2) Q1 Multiple Ion

DP Ramp : 最適化を行なう DP のレンジを設定します。

- * トレーニングでは Start に 0V、Stop に 200V、Step に 5V を入力します。

(3) Enhanced Product Ion

Scan rate : EPI スキャンのスキャンスピードを選択します。

- * トレーニングでは 10000Da/sec にします。

2nd Precursors : 生成したフラグメント(2nd Precursors)のうち強度の高い方から何番目までを候補とするかを設定します。

- * トレーニングでは「5」にします。

Mass range : 2nd Precursor イオンのスキャン範囲を設定します。

(4) MS/MS/MS

Scan rate : MS/MS/MS スキャンのスキャンスピードを選択します。

* トレーニングでは 10000Da/sec にします。

Mass rage : 3 rd precursor (2nd Precursor) イオンのスキャン範囲を設定します。

(5) General Final Method

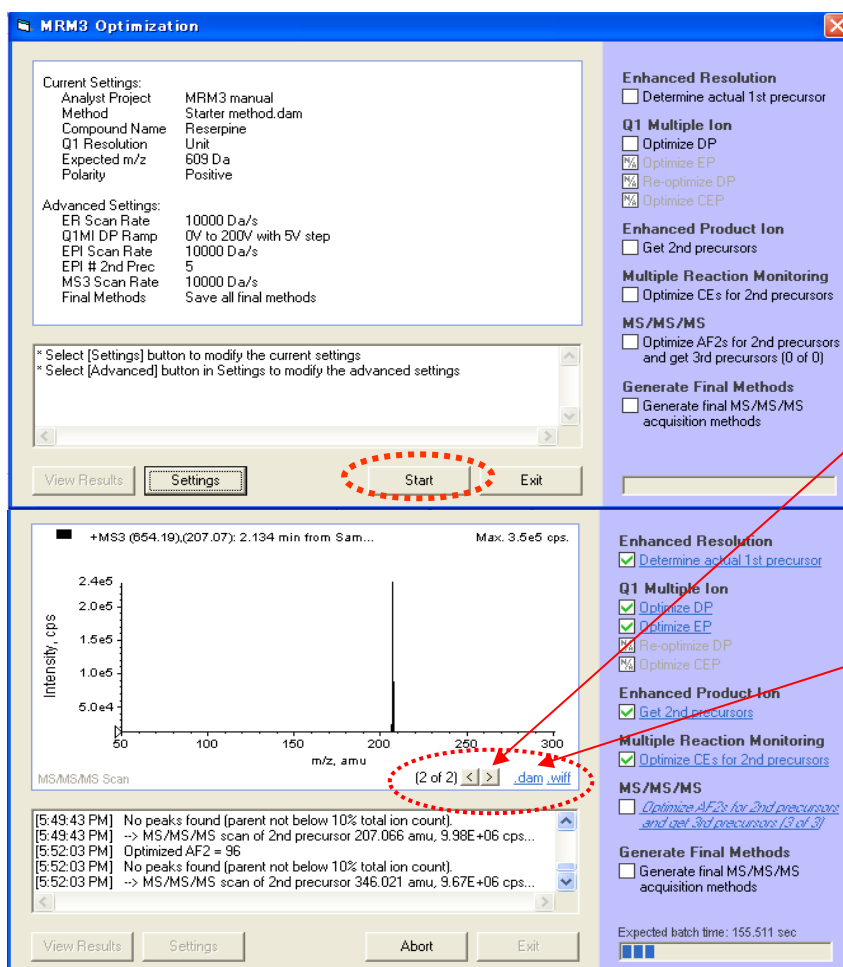
Save All Final Methods : 最終的に作成される、定量用の MS/MS/MS メソッドだけでなく、最適化途中のメソッドも保存します。

Save Optimal Method Only : 最終的に作成される、定量用の MS/MS/MS メソッドのみを保存します。

* トレーニングでは Save All Final Methods を選択します。

8. OK ボタンをクリックし、メイン画面に戻ります。

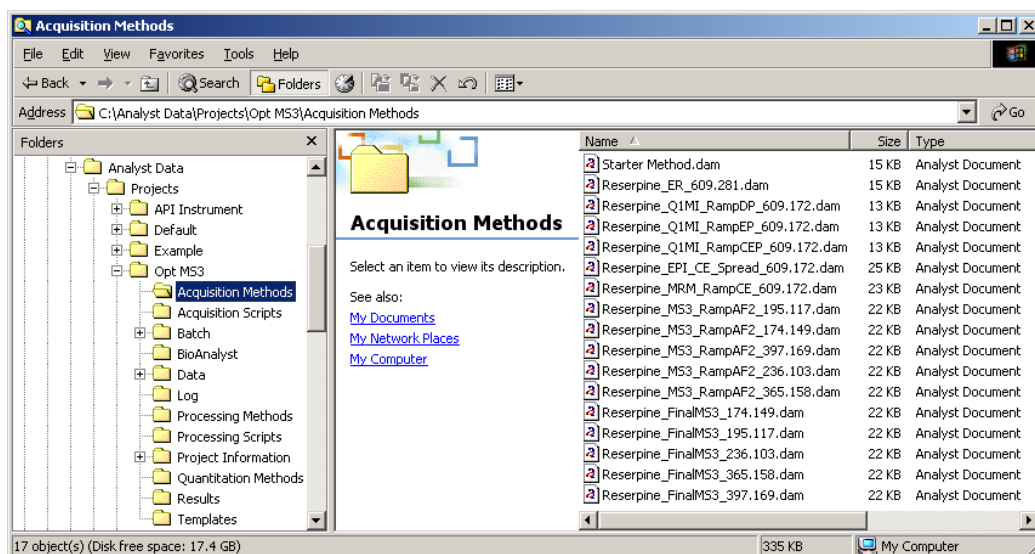
9. Start ボタンをクリックすると、最適化が始まります。



.dam の文字をクリックすると表示されているデータの測定メソッドを見ることができます。

.wiff の文字をクリックすると表示されているデータをAnalyst上で見ることができます。

<MRM3 Optimization (自動最適化プログラム) の結果>



1. 最適化された測定メソッド

最適化中、あるいは、最適化後に作成されたメソッドは、Starter method を保存したフォルダと同じ Acquisition methods フォルダに保存されます。

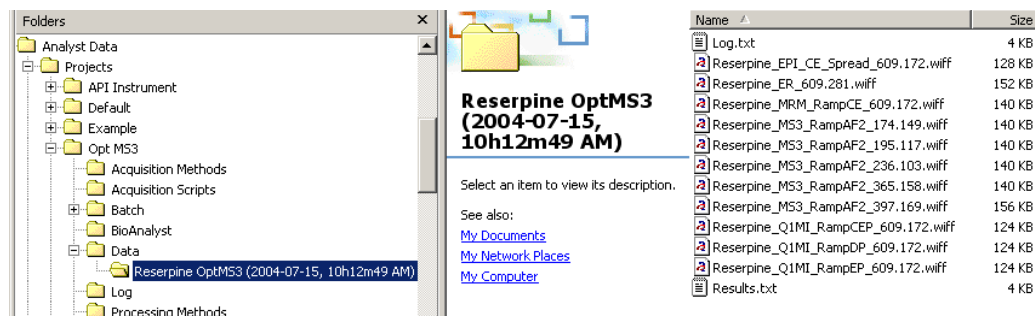
保存されたメソッドは “[化合物名] + [スキャンタイプ] + [m/z] + .dam”. という名前です。

- * トレーニングにて、最適化した結果、得られた定量用の MRM3 メソッド名は、“ Reserpine2_FinalOptimalMS3_174.076.dam “です。

※ 作成されたメソッドを用いて、検量線サンプルの測定などを行ないます。

2. 結果の Log ファイル

Analyst Data > Projects > Projects 名 > Data フォルダ内に Result.txt ファイルで保存されます。



Results.txt :

```
Results.txt - Notepad
File Edit Format Help
Quatitative Optimization for MS3
Thursday, July 15, 2004 (Start 10:12:49 AM, End 10:24:37 AM)

Starting Parameters
=====
Analyst Project: Opt MS3
Starting Method: Starter Method.dam
Compound Name: Reserpine
Resolution: Unit
Expected m/z: 609.281 amu
Polarity: Positive

ER Scan Rate: 250 amu/s
Q1MI DP Ramp: 0V to 200V with 5V step
EPI Scan Rate: 1000 amu/s
EPI # 2nd Prec: 5
MS3 Scan Rate: 1000 amu/s
Final Methods: Save all final methods

Optimization Results
=====
Actual m/z: 609.172 amu, 7.23E+07 cps
Optimized DP: 90 (30 initial value)
Optimized EP: 10 (10 initial value)
Optimized CEP: 24 (24.774 initial value)

[MS/MS Fragment 1] 195.117 amu (Loss of 414), 9.98E+06 cps
Optimized CE: 47 (10 initial value)
Optimized AF2: 70 (100 initial value)
MS3 Peak Centroid Mass(amu) 2nd Loss Centroid Intensity(cps)
-----
1 167.04 28 5.00E+04
2 152.82 42 1.67E+04
Final MS3 Method: Reserpine_FinalMS3_195.117.dam

[MS/MS Fragment 2] 174.149 amu (Loss of 435), 8.60E+06 cps
Optimized CE: 55 (10 initial value)
Optimized AF2: 70 (100 initial value)
MS3 Peak Centroid Mass(amu) 2nd Loss Centroid Intensity(cps)
-----
1 159.05 15 1.00E+05
2 142.209 32 5.00E+04
Final MS3 Method: Reserpine_FinalMS3_174.149.dam
```

測定した日時

最適化前に
設定した条件

1st Precursor
最適化の結果

最適化された
MS³ フラグメント

3.3 マニュアルでの最適化

MRM3 Optimization Script で自動最適化した MRM3 メソッドでは、マトリックスの影響を軽減できない場合又は、更なる感度を追求されたい場合は、MS/MS/MS のマニュアルでの最適化を行います。

MRM3 の自動最適化の結果 Log を参考に、Intensity の高い 2nd Precursor Ion を複数選び、有効な MRM3 メソッドを作成します。

AF2 値をマニュアルで最適化します。

1. Tune モードの Manual Tuning 画面を開きます。
2. Open File から自動最適化で作成された “[化合物名] + [スキャンタイプ] + [m/z] + .dam”.を開きます。

- * Training では Reserpine2_MS3_RampAF2_397.166.dam を開きます。

MRM3 の自動最適化では、1st Precursor / 2nd Precursor / 2nd Product = 609 / 174 /159 が選択されます。

3. Scan type に、MS/MS/MS(MS3)が選ばれていることを確認します。
4. Scan rate、Polarity を確認します。
 - * Scan rate は、1000、10000、20000Da/s が選択できます。
 - * Positive モードあるいは Negative モードを選択します。
 - * Training では、Scan rate=10000Da/s 、Positive を選択します。
5. 1st Precursor Ion, 2nd Precursor Ion に数値が入力されている事を確認します。
6. Center/Width のチェックを外し、測定する範囲、2nd Precursor Ion が見える範囲までとします。
7. Optimization Masses を押すと Time(sec)は自動で算出されます。
 - * その他のパラメータ(DP、EP、CE)は、自動最適化した値が Compound タブに入力されています。

MS Method configuration window, Advanced MS tab. Parameters shown include Scan type (MS/MS/MS (MS3)), Scan rate (10000 Da/s), Polarity (Positive), MCA (unchecked), Number of scans to sum (3), 1st Precursor (609.089 Da), 2nd Precursor (397.166 Da), Total Scan Time (0.5292 sec), Duration (0.097 min), Delay Time (0 sec), and Cycles (11). A table shows Start (Da) 50.000, Stop (Da) 400.000, and Time (sec) 0.0350. Buttons for Edit Ramp..., Import List, and Optimize Masses are visible.

8. Advanced Ms のタブへ移ります。

9. Fixed LIT fill time にチェックをいれます。溜める時間は、10msec 程度にします。

* Ramp を使用する時は、Dynamic fill time は使用できません。

MS Method configuration window, Advanced MS tab. Parameters shown include Scan mode (Profile), Step size (0.12 Da), Intensity threshold (total count) (0), Settling time (0 ms), Pause between mass ranges (1.5 ms), Q0 Trapping (unchecked), Q3 Entry Barrier (8 V), and MS/MS/MS Fragmentation Excitation Time (25 ms). The Fixed LIT fill time checkbox is checked, and the value is 10 ms.

10. MS タブに戻ります。

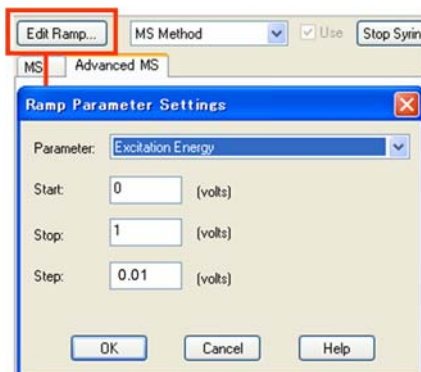
* Number of scans to sum を入力してください。Training では、「3」と入力します。

* Number of scans to sum の表示について、一度 Advanced MS のタブへ移動し、イオンを溜める時間 (Fixed LIT fill time と Dynamic fill time) を切り替えた後に MS タブへ移りますと、Number of scans to sum 欄の数字が「1」に戻ります。

11. Edit Ramp を押し、Ramp Parameter Settings の画面を開きます。

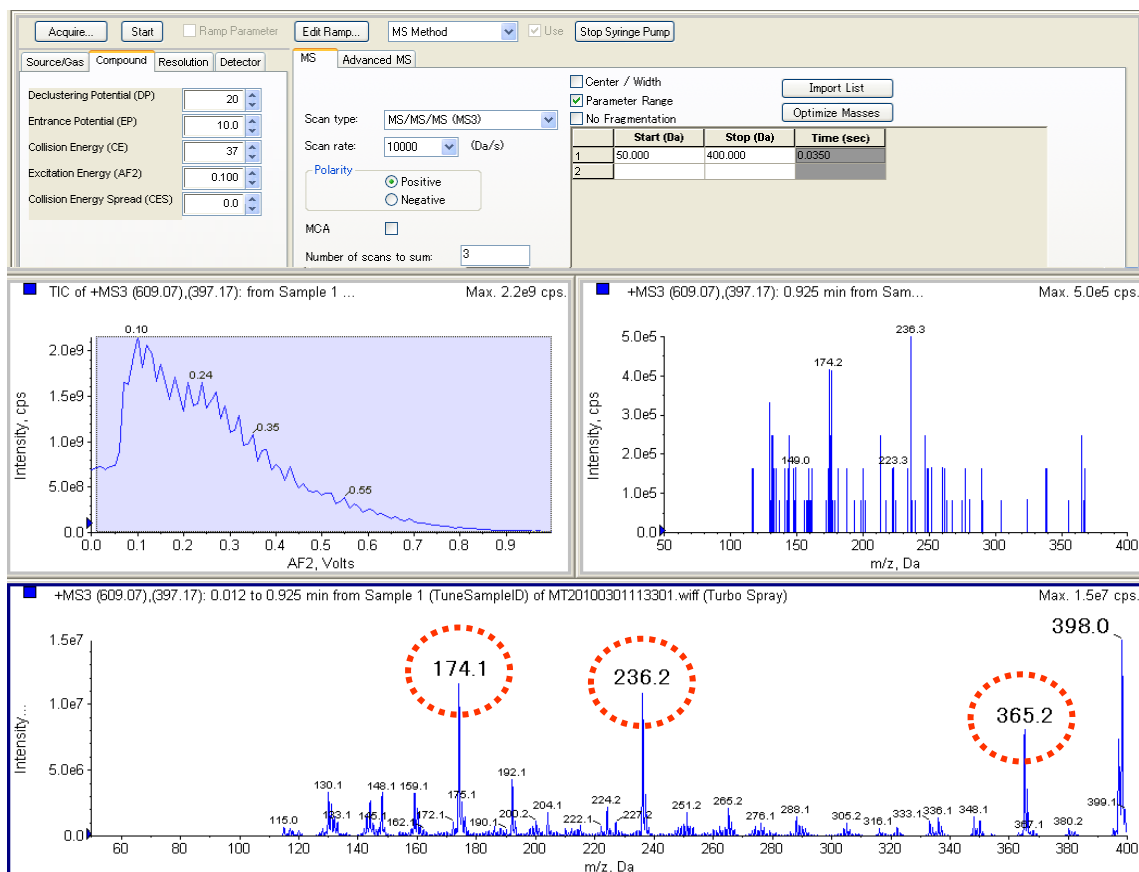
12. Parameter に、Excitation Energy をプルダウンメニューから選びます。

Step を 0.01 に設定し、OK を押します。



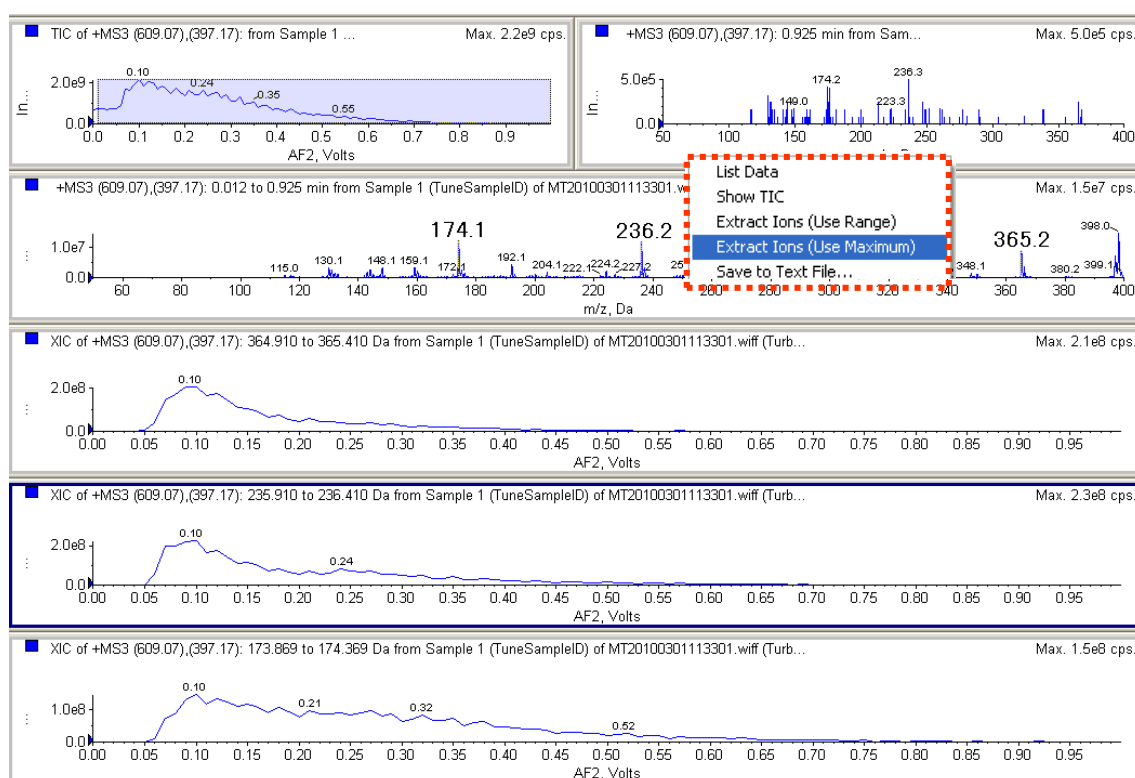
13. Start ボタンを押して測定を開始します。

14. TIC の画面全体をマウスで選択しダブルクリックします。平均されたスペクトルが下段に表示されます。その中で強度の高いマス値を 2nd Product Ion とします。



15. 13 で選択した 2nd Product Ion のマス値を選択し右クリックし、Extract Ions (Use Maximum)を選択します（下図中の赤点線枠内）。

- * 2nd Product Ion は、一つに絞らず、複数候補挙げておき、最適な各 AF2 をメモしてください。X 軸に AF2 をランプした XIC が下段に出てきます。クロマトグラムの一番強い値が、この 2nd Product Ion に最適な AF2 値となります。
- * 感度が低い場合は、Fixed LIT fill time の溜める時間を長くします。
- * Q0 トラッピングにチェックをいれることも有効です。



16. 内部標準物質も MRM3 で測定する場合は、2～15 と同様に操作し、2nd Product Ion とそれに最適な AF2 値を最適化します。

17. メニューの File>Save as でメソッドを保存します。

- * Training では、Reserpine_MRM3_609.397.dam で保存します

18. 複数の 2nd Precursor Ion について、2～17 の操作を行い、AF2 の値をメモします。

3.4 イオンソースの最適化

イオンソースの最適化は、まず以下の値を使用して頂き、感度が足りない場合に、必要に応じて行って下さい。

* MRM3 のメソッドでは、自動最適化はできませんので、MRM3 の定量は MRM で最適化した値を用います。

* Training では、イオンソースの最適化は行いません。

以下のパラメータ値を入れて下さい。

イオンソースパラメータ初期値 (QTRAP® 5500 LC/MS/MS System)

	設定範囲	ESI (5uL/min, Infusion)	ESI (200uL/min, Infusion)	APCI (1000uL/min)
CAD	0~12	12	12	12
CUR	10~50	20	30	45
Gas1	0~90	20	50	60
Gas2	0~90	0	80	N/A
IS	0~5500	5500(-4500)	5500(-4500)	N/A
NC	0~5	N/A	N/A	2(-2)
TEM	0~750	0	500	500

備考) カッコ () 内は Negative モード時の設定値を表します

< ! 注意! >-----

QTRAP® 5500 LC/MS/MS System

TISの設定温度は最大700度までにしてください

750℃でも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

3.5 Acquisition Method の作成

使用するマトリックスの影響を一番受けない MRM3 メソッドを作成する為に、複数 Experiment で複数の 2nd Precursor Ion の MRM3 メソッドを作成し、マトリックス入りサンプルを測定します。

測定結果より、S/N が一番良好な MRM3 を決定します。

3.5.1 複数 Experiment による MS3 メソッドの作成

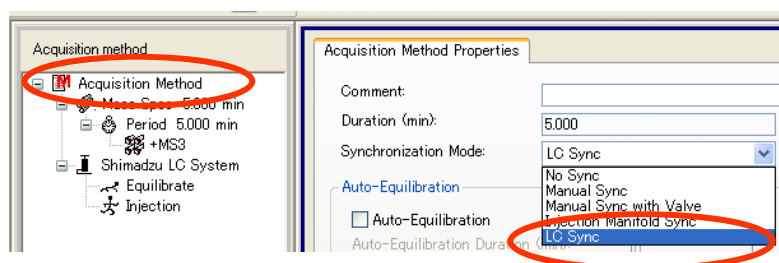
1. Hardware Configuration の Profile を MS+HPLC のものに変更します。

Acquire モードから、メニューの File>Open を開き、File type を Acquisition Method とし、40 ページで保存した最適化された MRM3 メソッドを開きます。

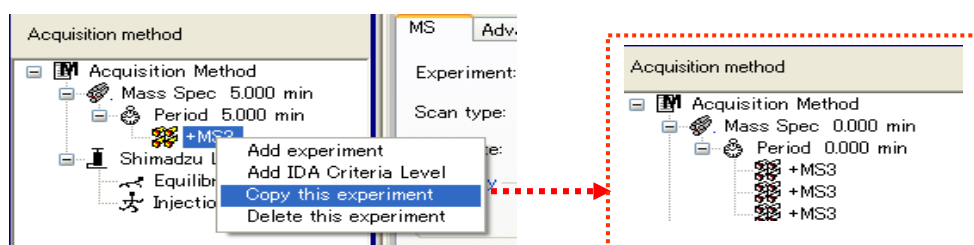
* Training では Reserpine_MRM3_609.397.dam を開きます。

* イオンソースの最適化を行った場合は、そのメソッドを開きます。

2. Acquisition Method で LC sync になっているかを確認します。



3. MS3 の Experiment を右クリックし、Copy this experiment で Experiment を追加します。



4. Experiment2、3 に、MRM3 Optimization で Intensity が高かった MS3 の 2nd Precursor Ion と AF2 を含む Compound タブのパラメータを入力します。

MS Advanced MS

Experiment: 1

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 10000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 2

1st Precursor: 609.069 (Da)

2nd Precursor: 397.166 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.3528 (sec)

Edit Parameters...

Center / Width ☐
 Parameter Range ☒
 No Fragmentation ☐

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	50.000	400.000	0.0350

Period 1 Experiment 1 Parameter Ta...

Source/Gas Compound

Declustering Potential (DP) 10.0

Entrance Potential (EP) 10.0

Collision Energy (CE) 37.0

Excitation Energy (AF2) 0.100

Collision Energy Spread (CES) 0.0

例) 609/397/236 の場合

2nd Precursor: 397.16

CE: 37

AF2: 0.1

MS Advanced MS

Experiment: 2

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 10000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 2

1st Precursor: 609.069 (Da)

2nd Precursor: 174 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.3528 (sec)

Edit Parameters...

Center / Width ☐
 Parameter Range ☒
 No Fragmentation ☐

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	50.000	400.000	0.0350

Period 1 Experiment 2 Parameter Ta...

Source/Gas Compound

Declustering Potential (DP) 10.0

Entrance Potential (EP) 10.0

Collision Energy (CE) 47.0

Excitation Energy (AF2) 0.075

Collision Energy Spread (CES) 0.0

例) 609/174/236 の場合

2nd Precursor: 174

CE: 47

AF2: 0.075

MS Advanced MS

Experiment: 3

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 10000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 2

1st Precursor: 609.069 (Da)

2nd Precursor: 195 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.3528 (sec)

Edit Parameters...

Center / Width ☐
 Parameter Range ☒
 No Fragmentation ☐

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	50.000	400.000	0.0350

Period 1 Experiment 3 Parameter Ta...

Source/Gas Compound

Declustering Potential (DP) 10.0

Entrance Potential (EP) 10.0

Collision Energy (CE) 45.0

Excitation Energy (AF2) 0.100

Collision Energy Spread (CES) 0.0

例) 609/195/173 の場合

2nd Precursor: 195

CE: 45

AF2: 0.1

5. 各 Experiment の Scan rate を設定します。

* Scan rate は、1000、10000、20000Da/s を選択できます。

* Training では、10000Da/s を選択します。

6. Number of scans sum に Experiment の積算回数を入力します。

* Experiment の数にもよりますが、Cycle time1 がピークの 1/10 程度の時間になることを目安に設定します。

* 一度 Advanced MS のタブへ移動し、イオンを溜める時間 (Fixed LIT fill time と Dynamic fill time) を切り替えた後に MS タブへ移ると、Number of scans to sum 欄の数字が「1」に戻ります

* Training では、「2」程度を入力します。

7. FIA でイオン源の最適化を行っていない場合は、Source/Gas のタブを開き、イオンソースの各パラメータを入力します。

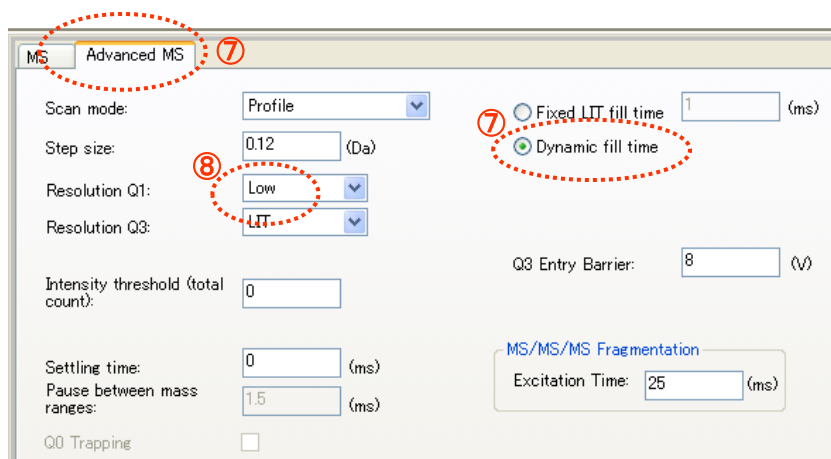
8. 各 Experiment の Advanced MS のタブを開き、Dynamic fill time に

9. チェックを入れます。

10. Resolution Q1 を選択します。

* MS/MS/MS は非常に選択性の高いスキャンですので、Q1 の Resolution を Low にすると、S/N が良好になる可能性があります。

* Training では、Low を選択します。

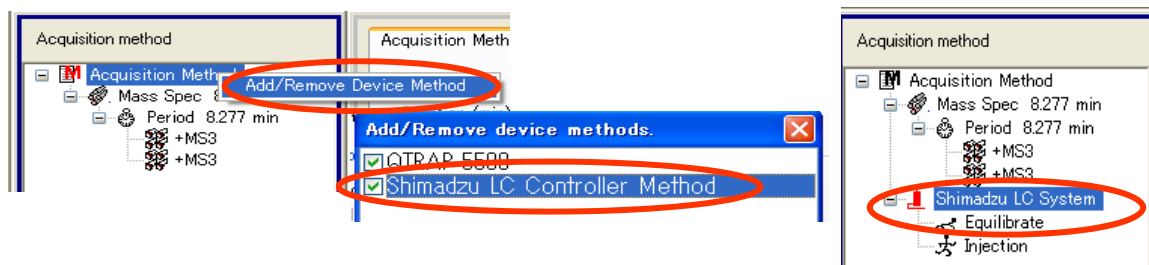


11. File>Save as でファイルを保存します。

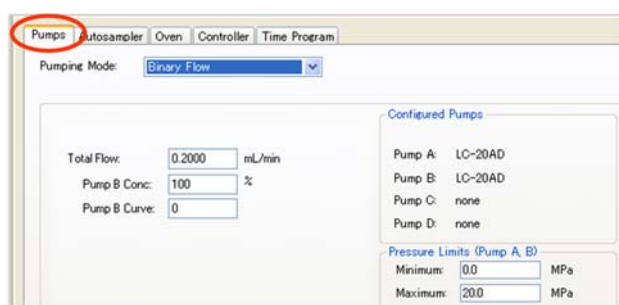
* Training では、Reserpine_MRM3.dam と保存します。

3.5.2 HPLC の条件設定

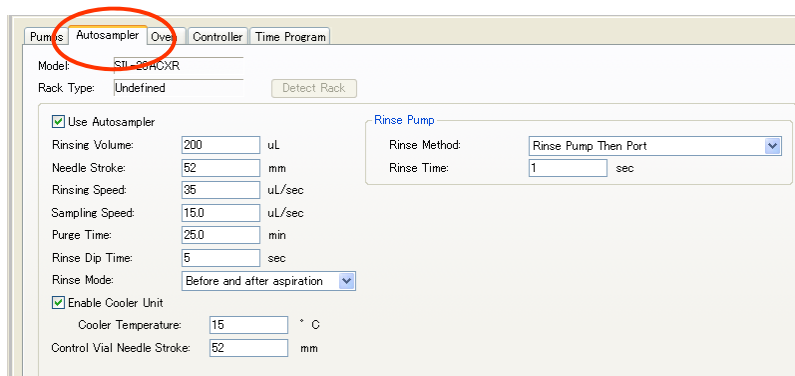
1. Acquisition Method の上を右クリックし、Add/Remove Device Method 画面にてチェックを入れ、HPLC が使用可能な状態にします。



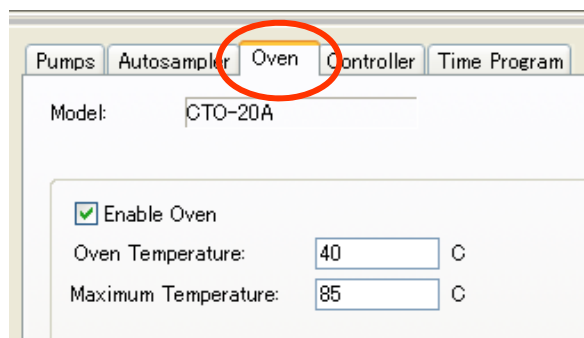
2. Shimadzu LC System のアイコンが出てきますので、をクリックします。
3. Pump のグラジエントや流速の条件を設定します。



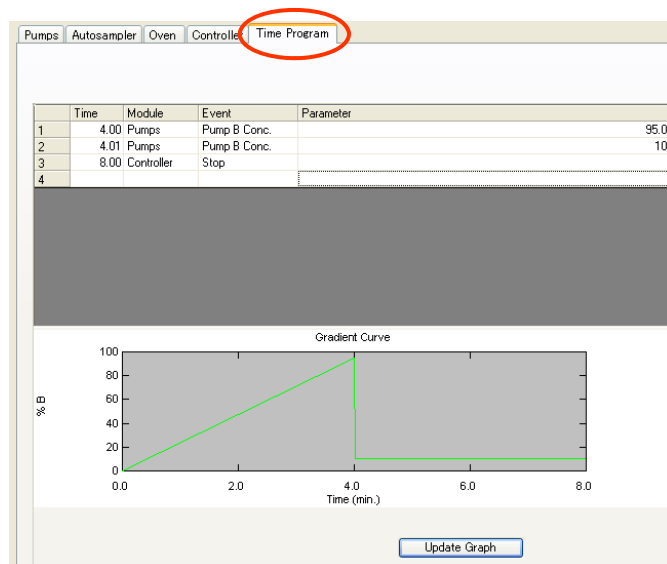
4. Autosampler のクーラーやリンスモードなどの条件を設定します。



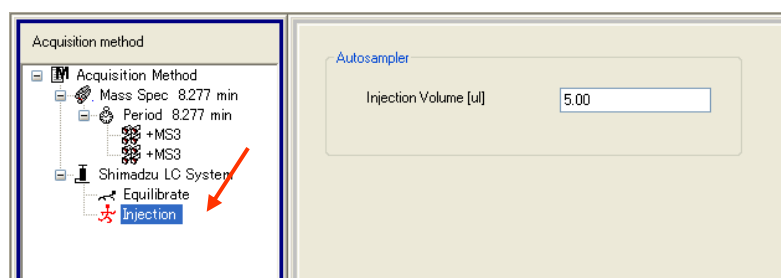
5. Oven の条件を設定します。



6. Time Program の条件を設定します。



7. 注入量の設定を行います。

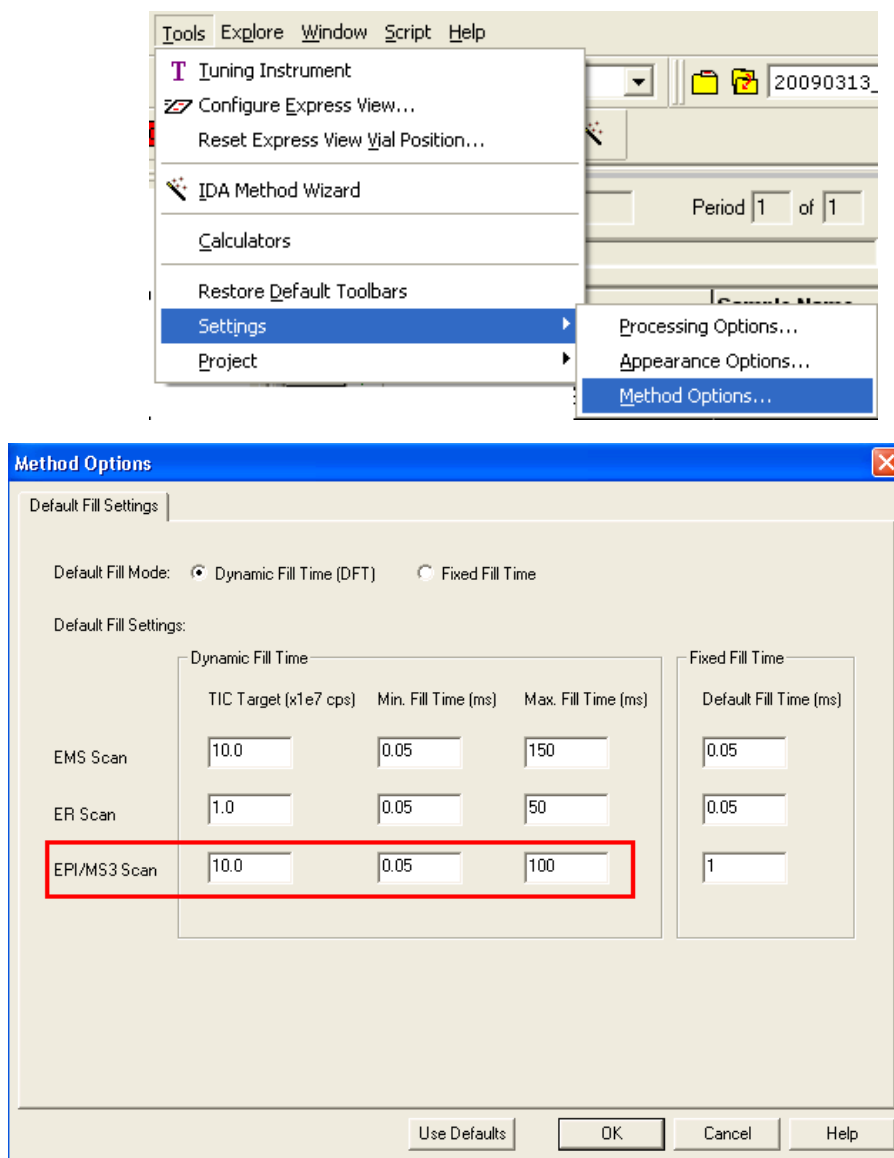


8. HPLC 条件を追加したメソッドを上書きする場合は、そのまま **Save** し、
名称を変える場合は、**File>Save as** を選択し保存します。

* Training では、Reserpine_MRM3.dam と上書き保存します。

3.5.3 MS3 の Max Fill Time の Default 値の変更

1. Acquireモードにカーソルを合わせ、メニューバーのTools→Settings→Method Optionを開きます。
2. EPI/MS2 Scan の Max Fill Time を Default 250 から 100 へ変更することを推奨します。



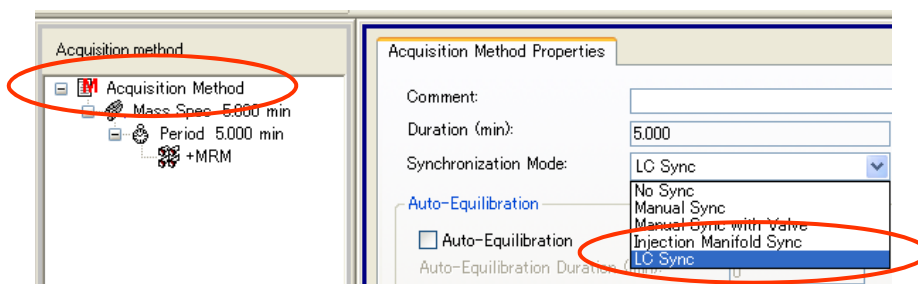
- System の平衡化、Batch の作成、測定の開始につきまして、「初級定量トレーニングテキスト」をご参照ください。

3.5.4 MRM3 メソッド作成

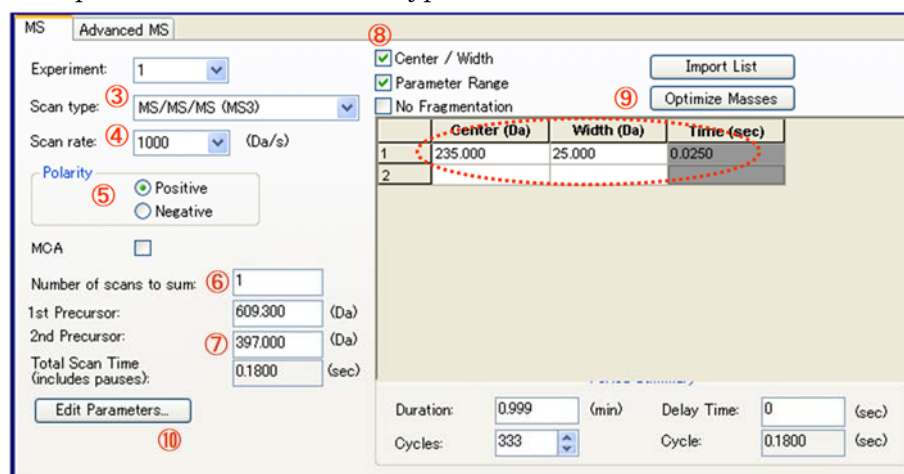
1. メニューの File>Open から画面を開き、File type を Acquisition Method とし、
43 ページで保存した Acquisition Method 「Reserpine_MRM3_609.397.dam」 又は、
49 ページで保存した 「Reserpine_MRM3.dam」 を開きます。

* Training では Reserpine_MRM3_609.397.dam を開きます。

2. Acquisition Method で LC sync になっているかを確認します。



3. Mass Spec をクリックし、Scan Type が MS/MS/MS(MS3)であることを確認します。



4. Scan rate を設定します。
* Training では、1000 Da/sec を選択します
5. Polarity が Positive であることを確認します。

6. Number of scans to sum に数値を入れます。

- * 取得できるデータポイント数が 10 以上になる、できるだけ多い数字を入れます。
- * Number of scan to sum の表示について、一度 Advanced MS のタブへ移動し、イオンを溜める時間 (Fixed LIT fill time と Dynamic fill time) を切り替えた後に MS タブへ移りますと、Number of scans to sum 欄の数字が「1」に戻ります。
- * Training では、Number of scans to sum 「3」程度を入力します。

7. 測定化合物の 1st Precursor、2nd Precursor を確認します。

8. Center/Width にチェックを入れ、Center にご使用のマトリックスに有効な 2nd product Ion を入力、確認します。

9. Width を入力します。

- * Width の幅をあまり狭くすると、感度が悪くなることがあります。
- * Training では、Center=236.0(Da)、width=25(Da)と入力します。

10. Optimize Masses を押しますと、自動で Time(Scan Time)が計算されます。

11. Edit Parameters...を開き、Compound のタブのパラメータを確認します。

* Scan rate、見たい m/z の範囲、イオンを溜める時間、Number of scans to sum で積算する回数を総合的に考慮します。

* 目安は、Cycle time がピーク幅の 1/10 程度の時間になるようにします。

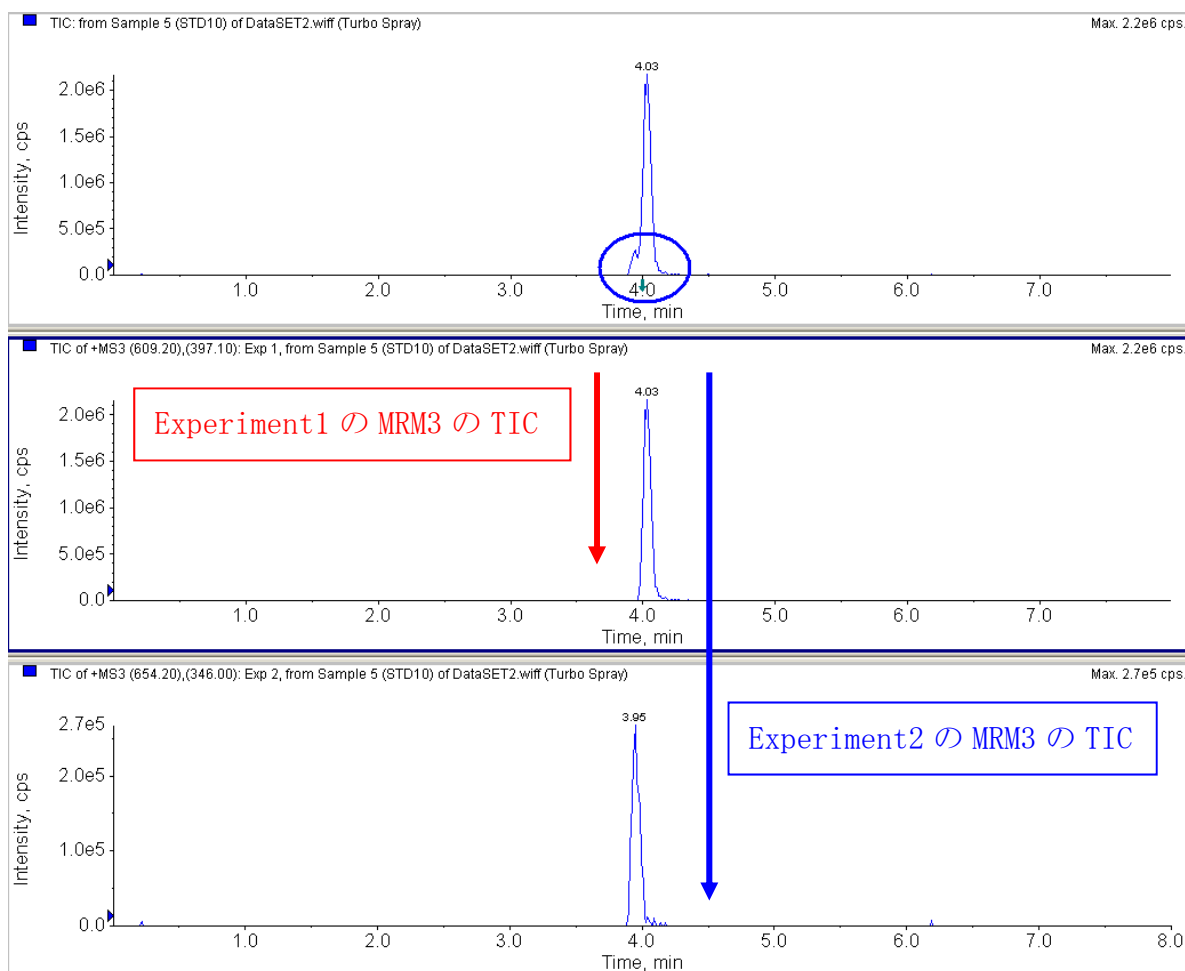
定量性を確保するために、最低 10 ポイント以上のデータポイントを取得することを推奨します

3.6 Explore モードでのデータ確認方法

作成した MRM3 メソッドで測定したデータの閲覧方法及び定量解析時のピークの幅を決定します。

1. Explore モードから MRM3 のデータを開きます。
2. TIC の X 軸にある緑矢印をダブルクリックします。

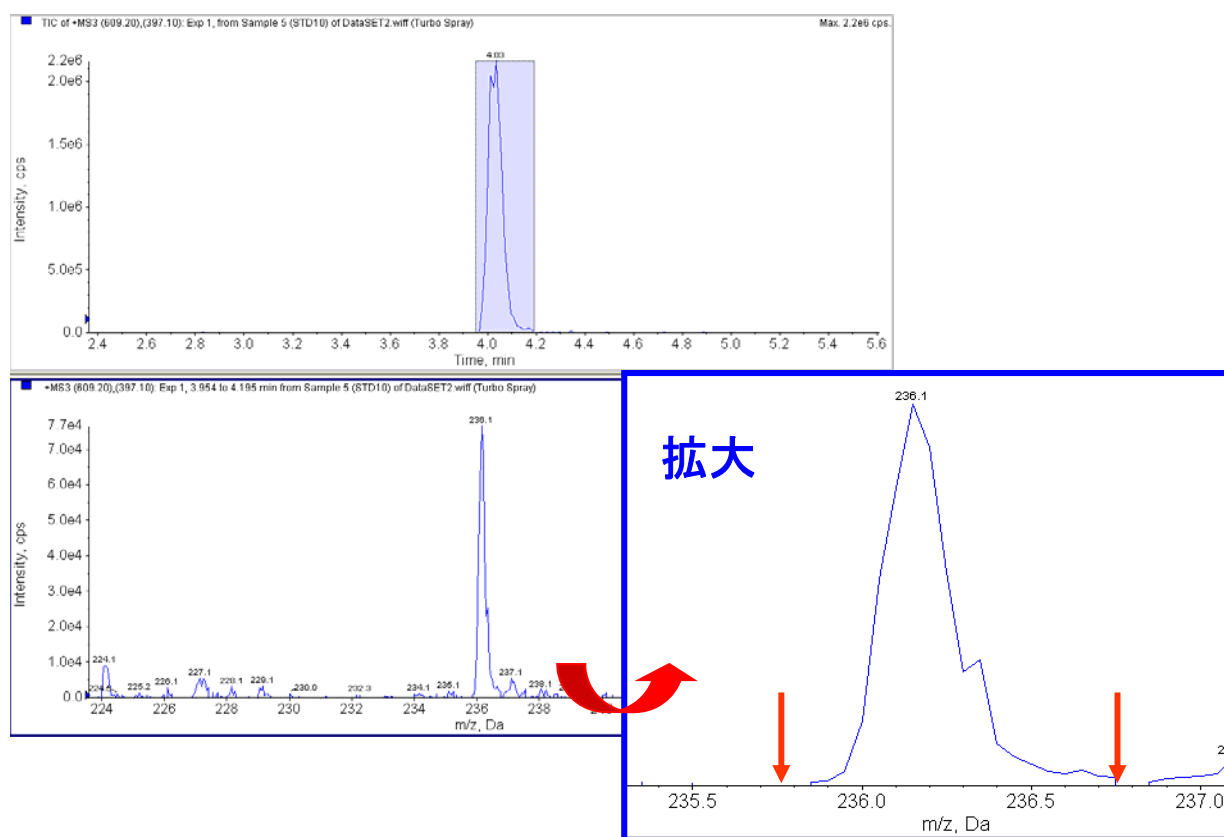
下図の場合は、2 つの Experiment で MRM3 を組んで測定したデータです。



3. Experiment1 の MRM3 データに絞って説明します。

MRM3 の TIC に検出されているピークをカバーするようにマウスでドラッグします。

4. ドラッグした帯をダブルクリックし、スペクトルを抽出します。
5. スペクトルの幅は、235.8 – 236.8 Da とわかります。この値をクロマトグラを作成する時の幅を決める参考にします。



3.7 MS/MS/MS の定量解析

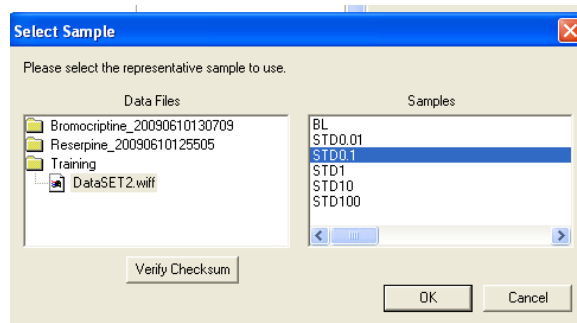
MS/MS/MS の定量解析には、「Build Quantitation Method を用いる方法」と「Quantitation Wizard を用いる方法」があります。

3.7.1 Build Quantitation Method を用いる方法

1. Quantitation Method をダブルクリックします。

Select Sample の画面が表示されます。

ここでは、MS3 で測定した解析メソッドを作成したいサンプルを 1 本選択し、OK を押します。

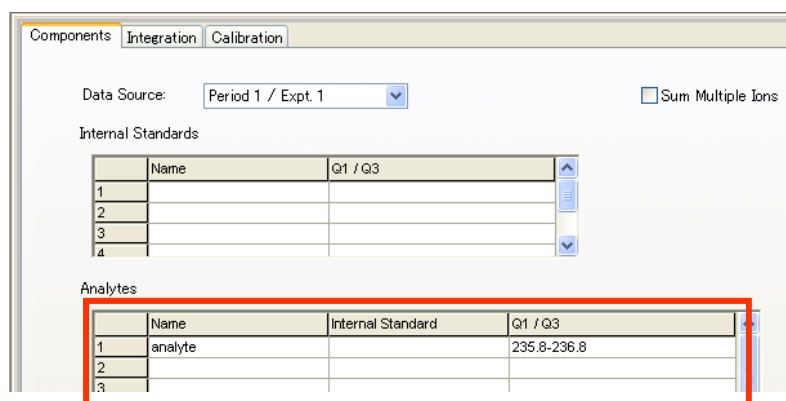


2. Create Quantitation Method – Define Peaks For MassSpec 画面が表示されます。

ここでは、定量計算したい化合物の MS3 の 2nd Product Ion(m/z)を入力します。Name 欄には適当な名前（化合物名等）を入力します。

* Analytes の Internal Standard 欄は何も設定しません。

Next をクリックして、次の画面に進みます。



3. Data Source のプルダウンより、Period1 / Expt2 を選択します。

ここでは、内部標準物質化合物の MS3 の 2nd Product Ion(m/z)を入力します。

Name 欄には適当な名前（内部標準物質名等）を入力します。

* Analytes の欄は何も設定しません。

Next をクリックして、次の画面に進みます。

Components | Integration | Calibration

Data Source: Period 1 / Expt. 1 ☐ Sum Multiple Ions

Internal Standards

	Name	Q1 / Q3
1	internal std.	300.8-301.5
2		
3		
4		

Analytes

	Name	Internal Standard	Q1 / Q3
1			
2			
3			
4			
5			

- 内部標準の 2nd Product Ion を入力した後、Data Source のプルダウンより、Period1 / Experiment1 のタブへ戻ります。Analytes の Internal Standard 欄をプルダウンから選択します。

Components | Integration | Calibration

Data Source: Period 1 / Expt. 1 ☐ Sum Multiple Ions

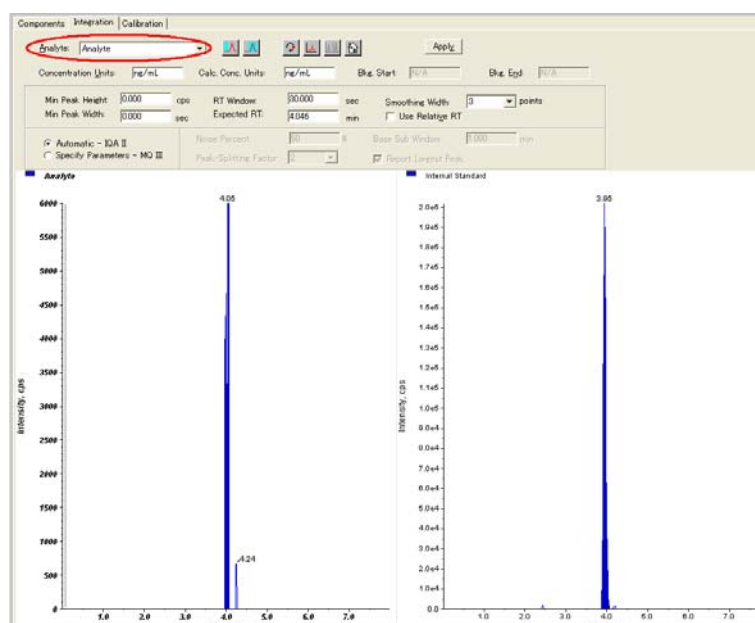
Internal Standards

	Name	Q1 / Q3
1	internal std.	300.8-301.5
2		
3		
4		

Analytes

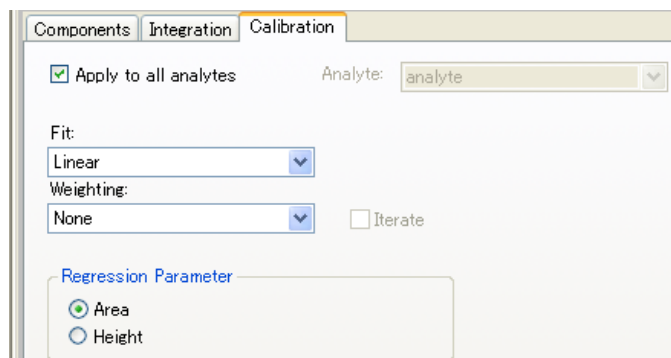
	Name	Internal Standard	Q1 / Q3
1	analyte	internal std.	2 5.800-236.800
2			

- Integration のタブへ進み、ピークやバックグラウンドの指定、スムージングの指定などを行って下さい。複数 Analyte がある場合は、Analyte をプルダウンで切り替えて下さい。



6. Calibration のタブへ進み、検量線の Fit 及び重み付けを設定して下さい。

- * Apply to all analytes にチェックを入れなければ、analyte ごとに検量線の Fit 及び重み付けを設定できます。



7. File > Save as で名前を付けて保存します。

- * Training では、Training と名前を付けます。

8. Create Quantitation Set で、Quantitation Wizard をダブルクリックします。

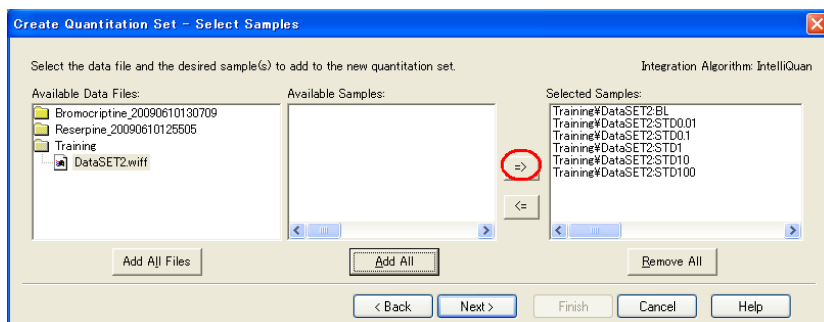
Create Quantitation Set – Select Sample 画面が表示されます。

9. ここでは定量するサンプルを選択します。

定量計算に用いる*.wiff ファイルを Available Data Files:欄から選択した後、該当のサンプルを Available Samples:欄から選択し、右矢印をクリックして Selected Samples:欄に移行させます。

この時、他のファイルのデータも同時に処理できますので、同じくファイルを選択した後にサンプルを右に移します。

定量したいデータを全て選択したら、Next をクリックし、次の画面に進みます。



10. Create Quantitation Set – Select Settings&Query 画面が表示されます。

Settings to Use:では、出力される Table Settings の設定を選択できます。

プルダウンより選択したら Next をクリックし、次の画面に進みます。

- * 初期設定の場合は Default のみが存在します。
- * 下部は QC サンプルなどが基準に入っているかどうかの条件を入力する場所です。

条件を設定する必要がない場合、None を選択します。

11. Create Quantitation Set – Select Method 画面が表示されます。

ここでは定量に用いる解析 Method (*.qmf ファイル) について設定を行います。

7 で名前を付けた解析メソッドを選択して Finish をクリックして下さい。

12. Result Table が作成されます。

「Sample Type」をプルダウンから、Blank、Standard、Unknown 等適切なタイプを選択して下さい。

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.00	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	0.0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.00	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.0	N/A
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	0.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	0.0	N/A
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	0.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	0.0	N/A
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	0.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	0.0	N/A

13. Result Table の「Analyte Concentration」に、検量線の各濃度を入力して下さい。

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.01	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	< 0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.10	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.2	227.8
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	1.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	2.1	208.6
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	10.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	19.5	195.0
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	100.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	89.3	89.3

14. Result Table の「IS Concentration」に、内部標準物質の濃度を入力して下さい。

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.01	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	< 0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.10	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.2	227.8
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	1.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	2.1	208.6
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	10.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	19.5	195.0
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	100.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	89.3	89.3

- Table Settings の設定方法は、「中級定量トレーニングテキスト」の「Results Table の編集と解析」を参照下さい。

3.7.2 Quantitation Wizard を用いる方法

1. Quantitation Wizard をダブルクリックします。

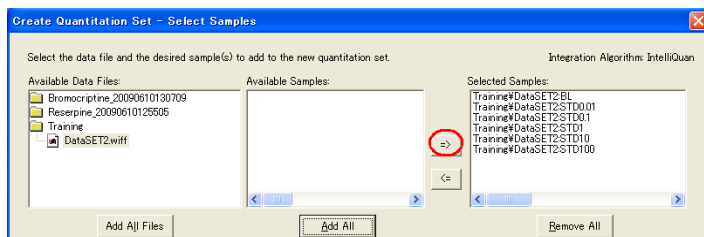
Create Quantitation Set – Select Sample 画面が表示されます。

2. 定量計算に用いる*.wiff ファイルを Available Data Files:欄から選択した後、

該当のサンプルを Available Samples:欄から選択し、右矢印をクリックして Selected Samples:欄に移行させます。

この時、他のファイルのデータも同時に処理できますので、同じくファイルを選択した後にサンプルを右に移します。

定量したいデータを全て選択したら、Next をクリックし、次の画面に進みます。



3. Create Quantitation Set – Select Settings&Query 画面が表示されます。

Settings to Use:では、出力される Table Settings の設定を選択できます。

プルダウンより選択したら Next をクリックし、次の画面に進みます。

- * 初期設定の場合は Default のみが存在します。
- * 下部は QC サンプルなどが基準に入っているかどうかの条件を入力する場所です。

条件を設定する必要がある場合、None を選択します。

4. Create Quantitation Set – Select Method 画面が表示されます

ここでは定量に用いる解析 Method (*.qmf ファイル) について設定を行います。

新規の解析 Method を作成するため、Create New Method の Method Name: に新規 Method 名を入力し、Next をクリックして次の画面に進みます。

- * 既存の解析 Method を使用する場合 (Batch 作成時に解析 Method を作成した場合等) は、Choose Existing Method を選択し、Method:のプルダウンより解析 Method を選択します。Finish をクリックすると、Result Table が作成されます。

Specify which method will be used for this quantitation set, or create a new method now. Integration Algorithm: IntelliQuan

☐ Choose Existing Method
Method: Training.qmf

☒ Create New Method
Method Name: Training2

☐ Create "Automatic" Method (to tabulate area for each available ion)

< Back Next > Finish Cancel Help

5. Create Quantitation Method – Select Representative Sample 画面が表示されます。

ここでは解析 Method を作成するための基準となる Sample を選択します。

ノイズとシグナルを適正に判別するため、できるだけ検出下限値付近の Sample を選択します。選択後、Next をクリックして次の画面に進みます。

Select the sample to use for building the quantitation method. Integration Algorithm: IntelliQuan

	Filename	Sample Name	Sample Type
1	Training#DataSET2.wii BL		Blank
2	Training#DataSET2.wii STD0.01		Standard
3	Training#DataSET2.wii STD0.1		Standard
4	Training#DataSET2.wii STD1		Standard
5	Training#DataSET2.wii STD1.0		Standard
6	Training#DataSET2.wii STD1.00		Standard

< Back Next > Finish Cancel Help

6. Create Quantitation Method – Define Peaks For MassSpec 画面が表示されます。ここでは、定量計算したい化合物の MS3 の 2nd product ion(m/z)を入力します。

➤ Name 欄には適当な名前（化合物名等）を入力します。

* Analytes の Internal Standard 欄は何も設定しません。

➤ Default Smoothing Width:では、クロマトグラムのスムージングを設定することができます。必要に応じて適当なスムージングポイントをプルダウンから選択して下さい。

Next をクリックして、次の画面に進みます。

Create Quantitation Method – Define Peaks For MassSpec

Please adjust the peak names and masses as necessary for period 1, experiment 1. Integration Algorithm: IntelliQuan

☐ Sum Multiple Ions Default Smoothing Width: 0 points.

	Name	Start – Stop
1		

	Name	Internal Standard	Start – Stop
1	Analyte		235.0-237.0
2			

< Back Next > Finish Cancel Help

7. Create Quantitation Method – Define Peaks For MassSpec 画面が表示されます。ここでは、定量計算したい内部標準物質化合物の MS3 の 2nd Product Ion(m/z)を入力します。

➤ Name 欄には適当な名前（内部標準物質名等）を入力します。

* Analytes の欄は何も設定しません。

➤ Default Smoothing Width:では、クロマトグラムのスムージングを設定することができます。必要に応じて適当なスムージングポイントをプルダウンから選択して下さい。

Next をクリックして、次の画面に進みます。

Create Quantitation Method – Define Peaks For MassSpec

Please adjust the peak names and masses as necessary for period 1, experiment 2. Integration Algorithm: IntelliQuan

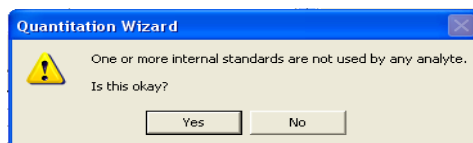
☐ Sum Multiple Ions Default Smoothing Width: 0 points.

	Name	Start – Stop
1	Internal Standard	300.0-302.0
2		

	Name	Internal Standard	Start – Stop
1			

< Back Next > Finish Cancel Help

8. 下記のようなメッセージが表示されますが、Yes をクリックして、次の画面に進みます。



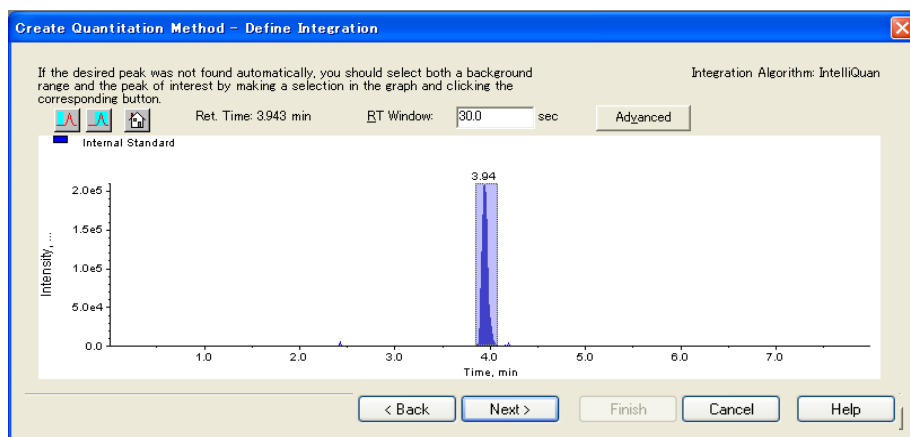
9. Create Quantitation Method – Define Integration 画面が表示されます。

ここでは定量計算したい化合物や内部標準物質におけるピークの積分条件の定義を行います。

Internal Standards、Analytes の順に画面上に表示され、各々の定義を行います。

バックグラウンドの範囲指定：表示されているクロマトグラフ上で、バックグラウンドに指定したい範囲をドラッグし、 アイコンをクリックすると、選択した範囲のノイズがバックグラウンドとして設定されます。

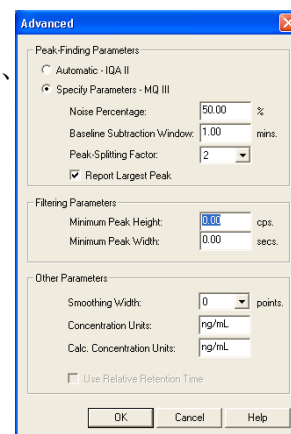
ピークの範囲指定：表示されているクロマトグラフ上で、ピークに指定したい範囲をドラッグし、 アイコンをクリックすると、そのピークの Retention Time が設定され、Ret Time: に Retention Time が表示されます。



その他のパラメーターの設定

Advanced をクリックしますと Advanced 画面が表示され、Filtering Parameters（ピークの積分に必要な最小のピーク高さや幅の設定）や Smoothing Width、Concentration Units（濃度単位の設定）等を設定することができます。

設定後、Next をクリックして次の画面に進みます。



* Filtering Parameters の推奨値は、

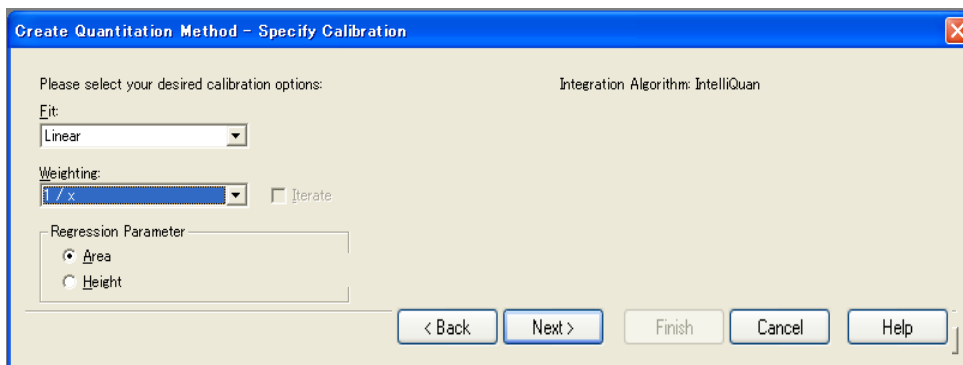
Minimum Peak Height : 10 cps

Minimum Peak Width : 3 secs

10. Create Quantitation Method – Specify Calibration 画面が表示されます。

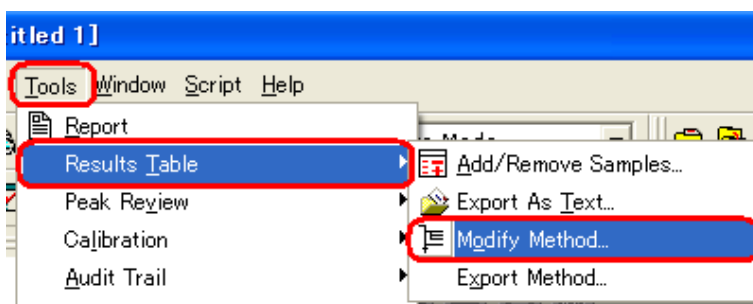
ここでは検量線に用いるパラメータの設定を行います。

- Fit:では、検量線のタイプが設定でき、プルダウンより選択することができます。
- Weighting:では、検量線の重み付けが設定でき、プルダウンより選択することができます。
- Regression Parameter では、作成される検量線のデータの種別を、Area（ピーク面積）あるいは Height（ピーク高さ）から選択します。



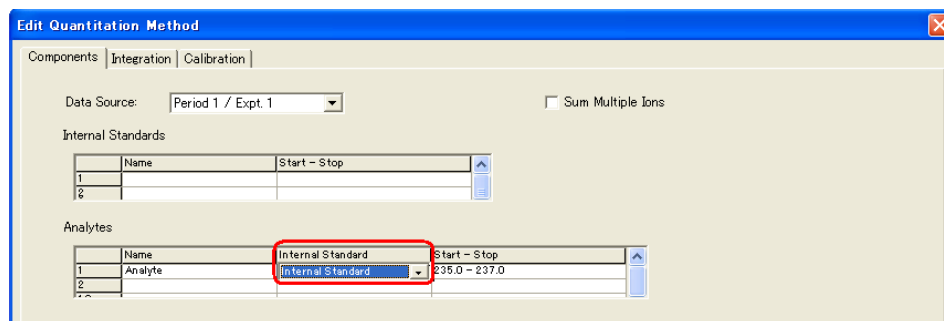
11. 設定した後、Finish をクリックすると Result Table が作成、表示されます。

12. Tools>Result Table>Modify Methods...より、Edit Quantitation Method を開きます。



13. Edit Quantitation Method の Components タブを開きます。

Analytes の Internal Standard 欄で、プルダウンより内部標準物質の名前を選択して下さい。

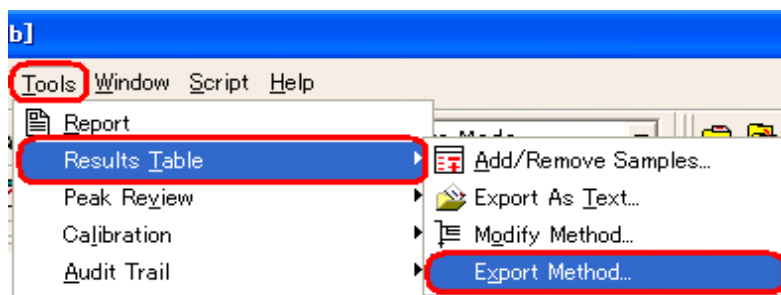


14. OK をクリックして、Result Table の画面に戻ります。

Modify Method を行った後、Tools>Results Table>Export Method を選択します。

ここで Quantitation Method を上書き保存、もしくは別名で保存して下さい。

* Modify Method は編集するのみで、保存は行われません。



15. Result Table が作成されます。

「Sample Type」をプルダウンから、Blank、Standard、Unknown 等適切なタイプを選択して下さい。

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.00	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	0.0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.00	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.0	N/A
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	0.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	0.0	N/A
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	0.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	0.0	N/A
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	0.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	0.0	N/A

16. Result Table の「Analyte Concentration」に、検量線の各濃度を入力して下さい。

	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.01	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	< 0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.10	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.2	227.8
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	1.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	2.1	208.6
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	10.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	19.5	195.0
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	100.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	89.3	89.3

17. Result Table の「IS Concentration」に、内部標準物質の濃度を入力して下さい。

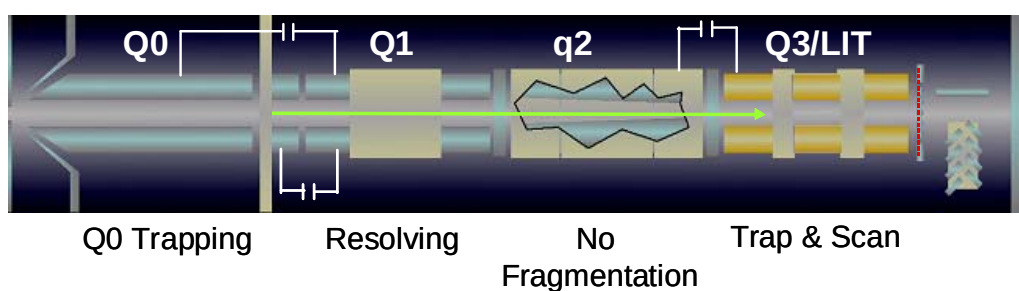
	Sample Name	Sample Type	Analyte Peak Name	Analyte Peak Area (counts)	Analyte Peak Height (cps)	Analyte Concentration (ng/mL)	Analyte Signal To Noise	IS Peak Area (counts)	IS Peak Height (cps)	IS Concentration (ng/mL)	Use Record	Record Modified	Calculated Concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
1	BL	Blank	Analyte	11852.0	8166.7	0.00	N/A	0.0	0.0	1.0		☐	N/A	N/A
2	STD0.01	Standard	Analyte	13329.0	18000.0	0.01	69.71	881000.0	211333.3	1.0	☒	☐	< 0	N/A
3	STD0.1	Standard	Analyte	88125.0	34125.0	0.10	33.04	836800.0	214716.1	1.0	☒	☐	0.2	227.8
4	STD1	Standard	Analyte	596900.0	131522.7	1.00	509.39	769219.0	207308.5	1.0	☒	☐	2.1	208.6
5	STD10	Standard	Analyte	5784906.9	1371579.5	10.00	870.72	819157.0	207704.5	1.0	☒	☐	19.5	195.0
6	STD100	Standard	Analyte	58229003.7	15612432.9	100.00	1094.69	1804806.8	463794.9	1.0	☒	☐	89.3	89.3

➤ その他 Table Settings の設定方法は、「中級定量トレーニングテキスト」の「Results Table の編集と解析」を参照下さい。

4 参考資料

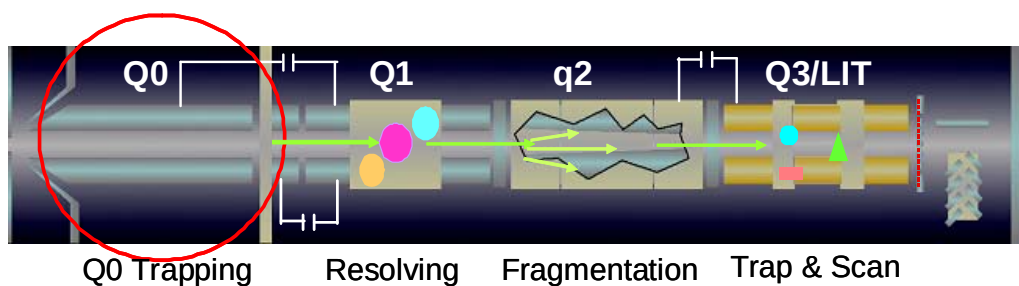
4.1 参考資料 1 トラップ機能の ER 測定と EPI 測定

Enhanced Resolution (ER)



1. Q1 でイオンが選別されます。(Open resolution, 5-7 Da)
2. 選別されたイオンはフラグメンテーションを起こすことなく q2 を通過します。
3. q2 を通過したイオンは、LIT(Q3)にためられます。
4. LIT(Q3)にためられたイオンは、ゆっくりスキャン(250 Da/sec)され検出されます。

Enhanced Product Ion (EPI)



1. Q1 でプレカーサーイオンが選択されます。
2. プレカーサーイオンは、q2 (LINAC® Collision Cell) で開裂します。
3. q2 (LINAC® Collision Cell) で生成したフラグメントイオンは、LIT(Q3)にためられます。
4. LIT(Q3)にためられたイオンは、スキャンされ検出されます。

4.2 参考資料2 スキャンスピード

- QTRAP® 4500、QTRAP® 5500 システムでは、MS/MS/MS のスキャンスピードは、1000, 10000, 20000 Da/sec の3種類が選択できます。

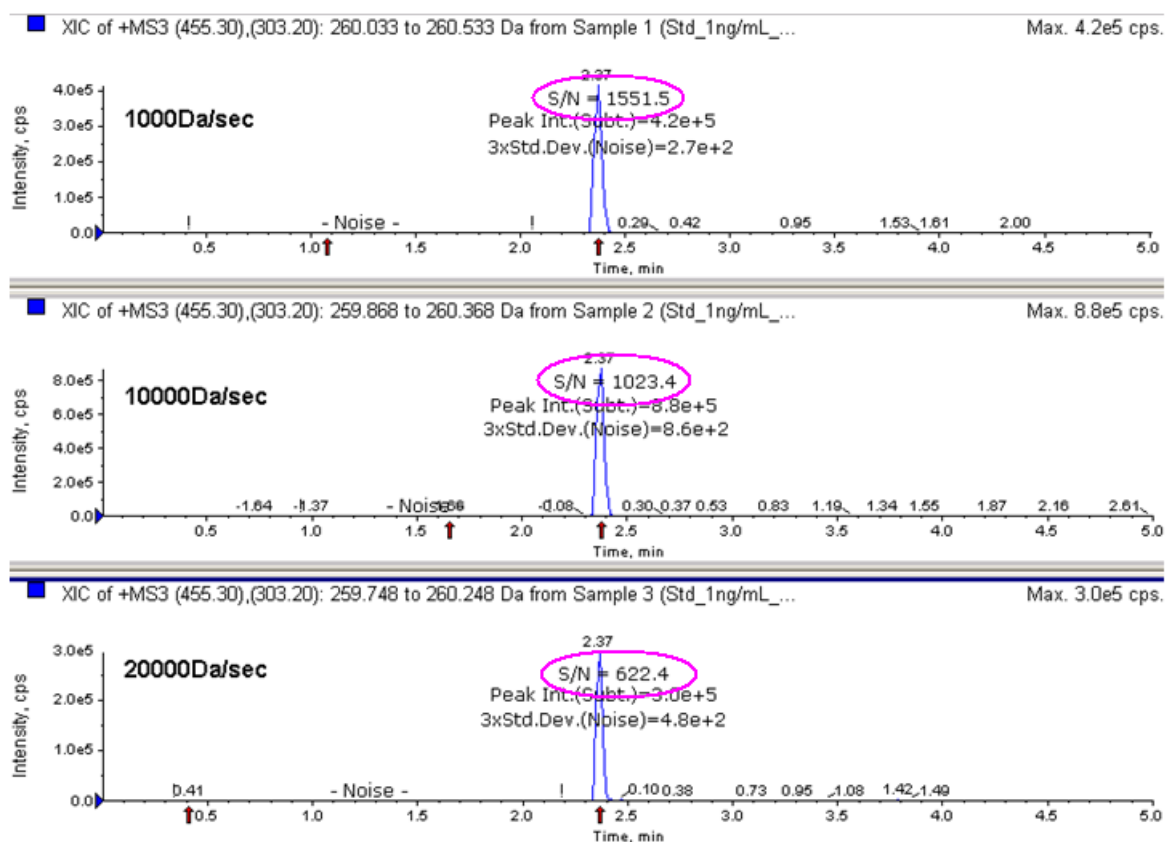
スキャンスピードに応じて、装置がイオンを溜める時間を自動で以下のように決めています。

取得するデータポイント数が10以上ある場合は、スキャンスピード 1000Da/sec をおすすめます。

● Ion statistics

- Dwell time at 20,000 Da/s = 6 μ s
- Dwell time at 10,000 Da/s = 12 μ s
- Dwell time at 1,000 Da/s = 50 μ s

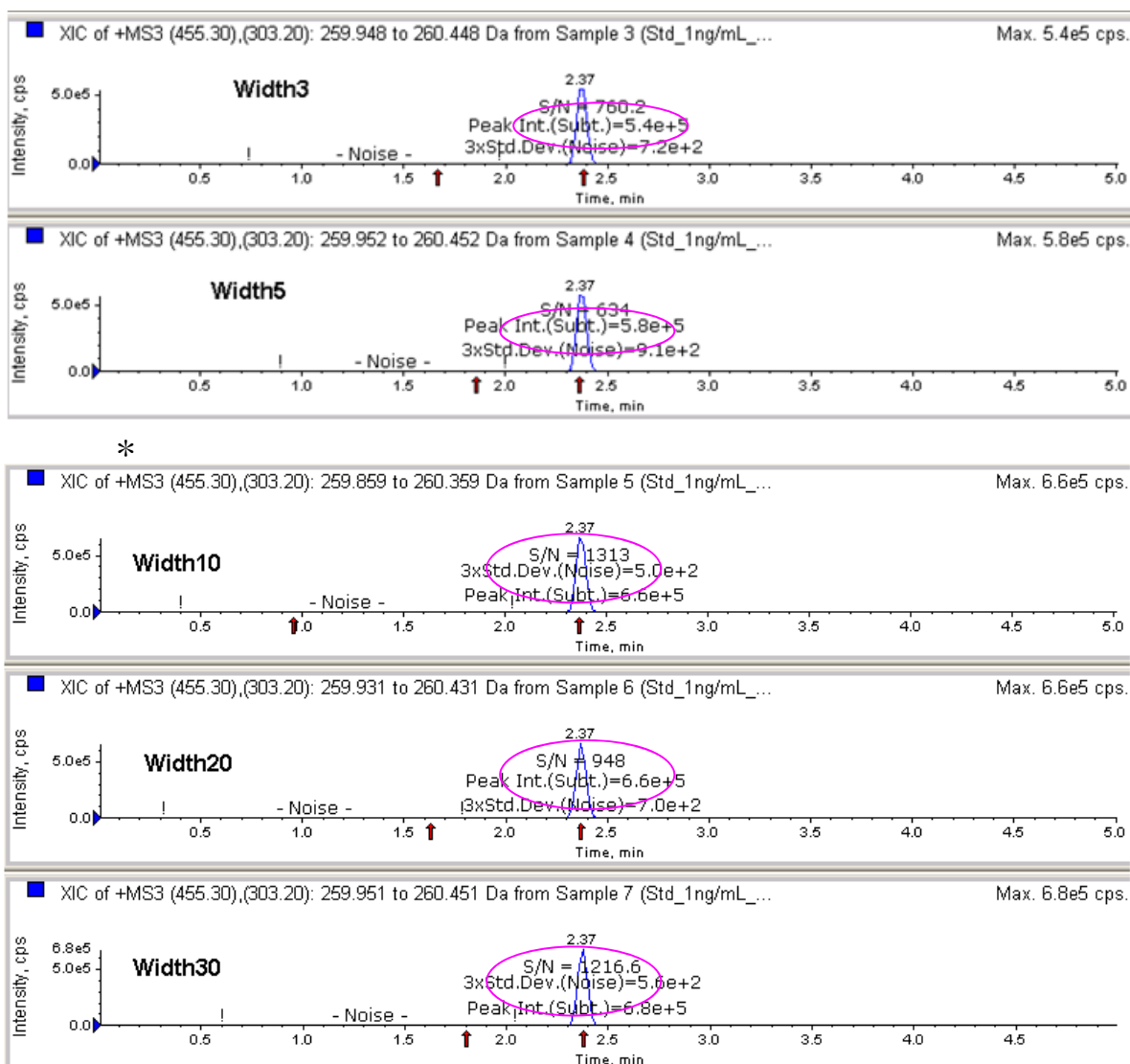
<スキャンスピードを変更した場合の S/N について>



4.3 参考資料 3 スキャン範囲

- MS/MS/MS 測定で Center/Width のチェックを入れると、Center のマスとスキャン範囲 (Width) を手動で入力できます。

その場合のスキャン範囲は、Width $\geq$ 10 をおすすめします。



4.4 参考資料 4 データポイントの目安について

例 1) Experiment1: m/z 609 由来の m/z 397.2 がフラグメンテーションして得られる スペクトルを、100-400Da のマスレンジでスキャンし Number of scans to sum を「1」にした場合

- 100-400Da のマスレンジをスキャンするために費やす時間=0.3001sec
- Total Scan Time=0.3001sec + Pause time + トラップ特有のパラメータ時間=0.4550sec
- Cycle time= Total Scan Time =0.4550sec

Analyte のピーク幅が 10sec だとすると、約 20 ポイントのデータポイントが取得できます。

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	100.000	400.000	0.3001
2			

例 2) Experiment1: m/z 609 由来の m/z 397.2 がフラグメンテーションして得られる スペクトルを、100-400Da のマスレンジでスキャンし、Number of scans to sum を「2」にした場合

- 100-400Da のマスレンジをスキャンするために費やす時間=0.3001sec
- Number of scans to sum=2
- Total Scan Time=(0.3001sec + Pause time + トラップ特有のパラメータ時間)x2=0.4550sec x 2=0.9099
- Cycle time= Total Scan Time =0.9099

Analyte のピーク幅が 10sec だとすると、約 10 ポイントのデータポイントが取得できます。

MS Advanced MS

Experiment: 1

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 1000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 2

1st Precursor: 609.229 (Da)

2nd Precursor: 207.099 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.0050 (sec)

Edit Parameters...

Center / Width ☐ Parameter Range ☒ No Fragmentation ☐

Import List

Optimize Masses

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	100.000	400.000	0.3001
2			

Period Summary

Duration: 25.902 (min) Delay Time: 0 (sec)

Cycles: 1708 Cycle: 0.9099 (sec)

例 3) Experiment1 は (例 1) とし、Experiment2: m/z 654.2 由来の m/z 346.0 がフラグメンテーションして得られるスペクトルを、100-400Da のマスレンジでスキャンし、Number of scans to sum を「1」にした場合

- 100-400Da のマスレンジをスキャンするために費やす時間=0.3001sec
- Total Scan Time=0.3001sec + Pause time + トラップ特有のパラメータ時間
=0.4550sec
- Cycle time=Experiment1 Total Scan Time + Experiment2 Total Scan Time
=0.4550sec + 0.4550sec=0.9099

Analyte のピーク幅が 10sec だとすると、約 10 ポイントのデータポイントが取得できます。

MS Advanced MS

Experiment: 1

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 1000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 1

1st Precursor: 609.229 (Da)

2nd Precursor: 207.099 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.4550 (sec)

Edit Parameters...

Center / Width ☐ Parameter Range ☒ No Fragmentation ☐

Import List

Optimize Masses

	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	100.000	400.000	0.3001
2			

Period Summary

Duration: 8.629 (min) Delay Time: 0 (sec)

Cycles: 569 Cycle: 0.9099 (sec)

例 4) Experiment1 は (例 1) とし、Experiment2: m/z 654.2 由来の m/z 346.0 がフラグメンテーションして得られるスペクトルを、100-400Da のマスレンジでスキャンし、Number of scans to sum を「2」にした場合

- 100-400Da のマスレンジをスキャンするために費やす時間=0.3001sec
- Total Scan Time=(0.3001sec + Pause time + トラップ特有のパラメータ時間)x2=0.4550sec x 2=0.9099
- Cycle time=Experiment1 Total Scan Time + Experiment2 Total Scan Time=0.4550sec + 0.9099sec=1.365sec

Analyte のピーク幅が 10sec だとすると、約 7 ポイントのデータポイントが取得できます。

Acquisition method

MS Advanced MS

Experiment: 2

Scan type: MS/MS/MS (MS3)

Scan rate: 1000 (Da/s)

Polarity: ☒ Positive ☐ Negative

MCA ☐

Number of scans to sum: 2

1st Precursor: 609.229 (Da)

2nd Precursor: 997.299 (Da)

Total Scan Time (includes pauses): 0.9099 (sec)

Center / Width ☐

Parameter Range ☒

No Fragmentation ☐

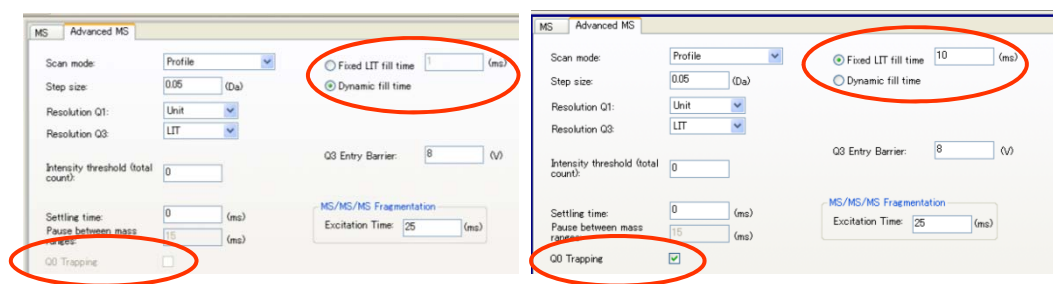
	Start (Da)	Stop (Da)	Time (sec)
1	100.000	400.000	0.3001
2			

Period Summary

Duration: 12.943 (min) Delay Time: 0 (sec)

Cycles: 569 Cycle: 1.3649 (sec)

4.5 参考資料 5 LIT にイオンを溜める方法



Q3(Liner Ion trap)にイオンを溜める方法は、2通りあります。

① Fixed LIT fill time

イオンを溜める時間を任意に指定する溜め方です。

* 通常 Q0 Trapping を使用することが多いです。

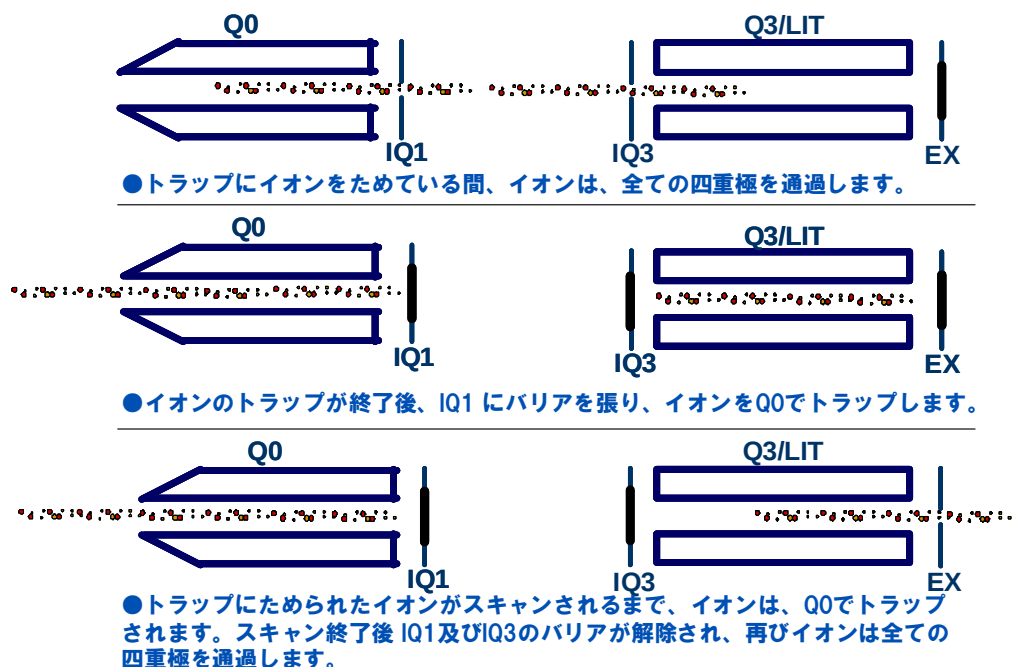
② Dynamic fill time(DFT)

サーベイスキャンのイオン量に応じて溜める時間を自動計算させる方法です。

* 溜める時間の最適値がわからない場合には、Dynamic fill time を使用します。

* Q0 Trapping は使用できません。

Q0 Trapping機能（2）



Q0 Trapping 機能とは？

LIT 特有の機能であり、イオンが LIT 内から検出器に吐き出されている間、次に入ってくるイオンを Q0 部分でためることができる機能です。

主に EPI や MS/MS/MS にて使用します。

イオントラップ内に溜めたイオンを検出器へ吐き出している間、イオントラップの入り口は閉じられた状態となり、流れてくるイオンはイオントラップに入ることなく、捨てられてしまいます。

Q0 Trapping 機能は、イオントラップの入り口が開放され、イオンが導入可能となるまで、Q0 のところでイオンを溜めておく機能です。

Q0 で溜めておいたイオンが一気に Q3 へと流れてくるため、更なる感度上昇が可能です。

研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners.

AB SCIEX™ is being used under license.

詳細な説明や知的所有権等に関しては付属のマニュアルを必ずご確認ください。

© 2020 K.K. AB SCIEX.