

TripleTOF<sup>®</sup> LC/MS/MS System シリーズ

# Getting Started Guide

Analyst<sup>®</sup> TF 1.8 Software / PeakView<sup>®</sup> 2.2 Software

2020 年 4 月版

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



## 本マニュアルについて

本マニュアルは、一般化合物の測定、解析のトレーニングを目的として日本で作成した簡易マニュアルになります。

操作法、パラメータなどの詳細につきましては、CD内にあります英文の **software guides** を参照ください。また、本マニュアルと英文のマニュアルに相違がある場合は、英文が優先されます。

## TripleTOF® LC/MS/MS System / Analyst® TF / PeakView® / MultiQuant™ ソフトウェアについて

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。

本文書は、SCIEX 製装置を購入した顧客が、本 SCIEX 製装置を操作するときに活用するものとして提供されています。本文書は著作権で保護されており、本文書の一部または全部を複製することは、SCIEX が書面で許可する場合を除き、厳しく禁止されています。本文書に記載の装置は、米国、カナダおよびその他の国で申請された単数または複数の特許のもとに保護されています。さらなる特許が出願中です。

本文書に記載のソフトウェアは、ライセンス契約のもとに提供されます。ライセンス契約で特別に許可される場合を除き、ソフトウェアの複製、変更または配布は、いかなる媒体においても法律に違反します。さらに、ライセンス契約では、ソフトウェアの逆アセンブル、リバースエンジニアリング、逆コンパイルを、いかなる目的においても禁止します。

## 目次

1	測定の準備.....	4
1.1	Analyst® TF software の起動.....	4
1.2	装置の Configuration (仕様の選択) .....	5
1.3	Project (フォルダ) の作成.....	5
1.4	分析のワークフロー.....	6
1.5	標準試薬とイオン源の準備.....	7
1.6	装置の起動と準備 .....	7
1.7	スペックチェックの実施 .....	9
1.8	Manual Calibration .....	11
1.9	CDS の準備.....	15
2	Tune Mode を用いた Manual 測定.....	16
2.1	測定モードおよび測定時の機能について.....	16
2.2	TOF MS.....	17
2.3	Product Ion Scan と Enhance .....	18
2.4	Enhance.....	20
2.5	測定の終了、流路の洗浄 .....	20
3	データ解析 (基本編: Analyst®TF Software) .....	21
3.1	Analyst の Explorer モードを用いた解析 .....	21
4	LC-MS、Acquire Mode での測定.....	23
4.1	装置の Configuration と準備 .....	23
4.2	Method Wizard を用いた Method 作成.....	24
4.3	Method の作成 -1 IDA.....	25
4.4	Method の確認、修正 -1 IDA.....	28
4.5	LC 条件の入力、修正 -1 島津社製 HPLC、PDA なしの場合.....	31
4.6	LC 条件の入力、修正 -2 島津社製 HPLC、PDA ありの場合.....	34
4.7	Method の作成 -2 TOF MS-MS/MS (定量用) .....	36
4.8	測定の準備 .....	38
4.9	Batch の作成.....	38
4.10	Batch を使用した測定 .....	40
4.11	測定の終了 .....	40
5	データ解析 (LC-MS, PeakView® Software) .....	41
5.1	PeakView® Software の起動.....	42
5.2	TIC からの解析.....	42
5.3	UV/ DAD / アナログ Data の表示とアライメント .....	43
5.4	Pane を隠す、削除する、全画面にする、拡大する .....	44
5.5	スペクトルの表示 .....	45
5.6	スペクトルからのマスクロマトグラム(XIC)の表示 .....	46
5.7	Background の指定、差引 .....	47
5.8	クロマトグラムからのマスクロマトグラム (XIC) の表示、ラベル、ハイライト .....	47
5.9	軸のリンク .....	48
5.10	重ね書きした Pane (クロマトグラム、スペクトル) の分離 .....	49
5.11	画面のコピー.....	49
5.12	IDA Explorer からの解析.....	50
5.13	組成解析 (Formula Finder) .....	56
5.14	フラグメントの帰属 (Fragments Pane).....	62
5.15	疑似 Precursor Ion Scan、Neutral Loss Scan (Fragment Matching).....	66

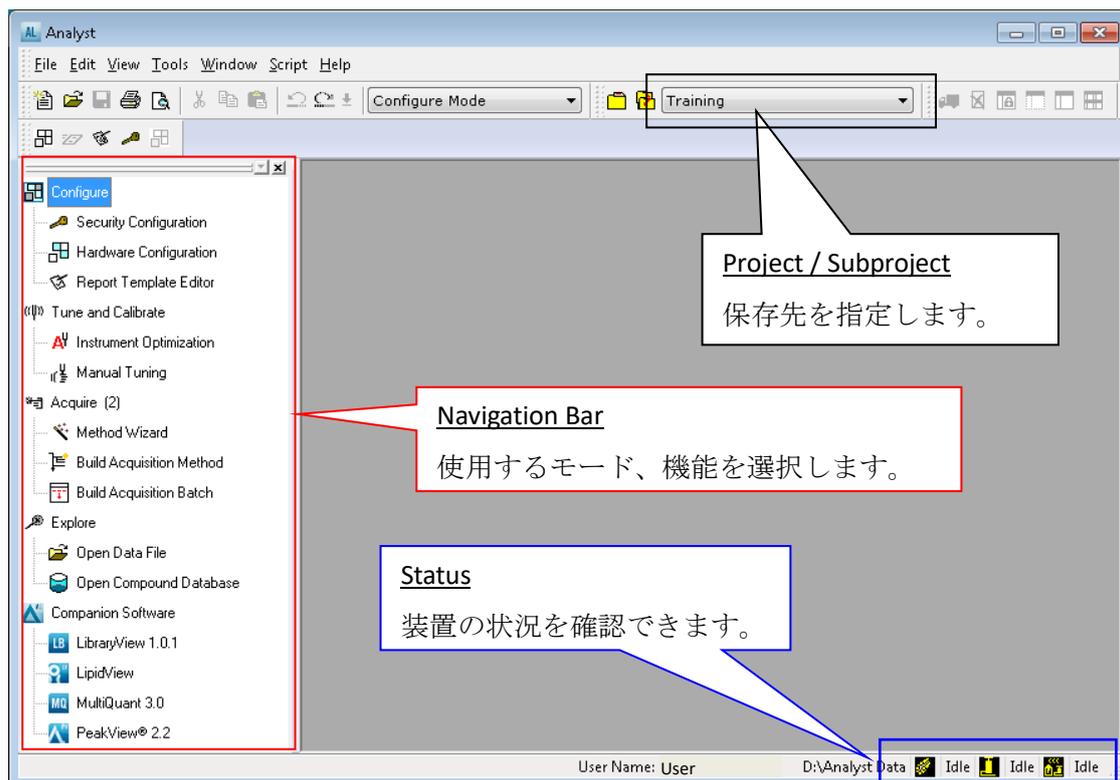
～ 類縁体、目的の骨格を有する化合物の検索 ～ .....	66
5.16 精密質量の計算 .....	68
5.17 同位体分布の計算と重ね書き .....	68
6 MasterView による解析 .....	69
6.1 新規 Library の登録 .....	69
6.2 目的、検索条件、結果の表示画面の設定 .....	69
6.3 目的化合物の情報を入力 .....	72
6.4 結果の確認 .....	73
6.5 保存と印刷 .....	76
7 定量解析 (MultiQuant™ Software) .....	77
7.1 ソフトウェアの起動 .....	77
7.2 初期設定 .....	77
7.3 定量解析 .....	78
8 装置のチューニング ～Instrument Optimization～ .....	82
9 メンテナンス (イオンソースおよびインターフェース) .....	85
10 装置の再起動、停止および起動 (Shutdown & Startup) .....	86
10.1 装置の再起動 .....	86
10.2 装置の停止 .....	86
10.3 装置の起動 .....	86
11 トラブルの回避と対処 .....	87
11.1 トラブルの回避 .....	87
11.2 トラブルの対処 1 .....	87
11.3 トラブルの対処 2 .....	87
12 添付資料 .....	88
12.1 Reference Table の編集・作成 .....	88
12.2 CDS の動作について .....	89
12.3 Library への登録 (LibraryView® Software) .....	90
12.4 MasterView を利用した MRM <sup>HR</sup> の定量解析メソッドの作成 .....	91
12.5 LC 条件の追加、修正 - ExionLC™ の場合 .....	93
12.6 LC 条件の追加、修正 - Waters 社製 HPLC (Acquity I-class) の場合 .....	95
12.7 LC 条件の追加、修正 - CTC PAL Autosampler を使用する場合 .....	97

# 測定の準備

## 1 測定の準備

### 1.1 Analyst® TF software の起動

- ① Desktop の  アイコンをダブルクリックし、Analyst® TF software を起動します。



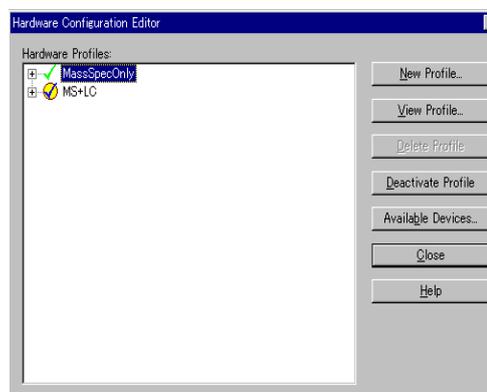
#### 【各種モードについて】

- Analyst® TF software は Configure、Tune、Acquire、Explorer の 4 種類のモードに分かれています。選択しているモードに応じて、Tool Bar などから表示される機能が変わります。
- Configure モード: 使用するユーザーの権限、接続する LC などの機器の選択、レポート形式を設定するモードです。
- Tune モード: 装置のチューニング、測定条件の最適化、マニュアルでの測定、質量分析器の質量補正（キャリブレーション）などを行うモードです。
- Acquire モード: 測定用のメソッドおよびバッチを作成し、データを取り込みます。
- Explore モード: 主に測定中のデータの閲覧や簡易解析に使用するモードです。
- Companion Software: Option Software などの追加コンポーネントの起動をこちらから行うことができます。

## 1.2 装置の Configuration（仕様の選択）

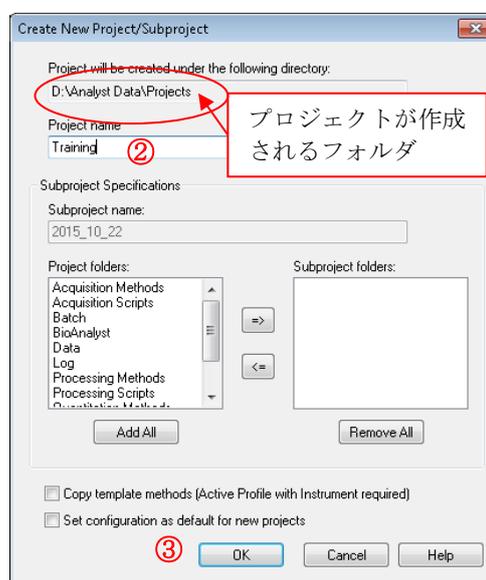
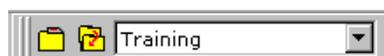
- ① 装置の Configuration を行います。  
Navigation Bar(画面左側)の Hardware Configuration をダブルクリックし Hardware Configuration Editor を開きます。
- ② 目的の Configuration（Training では MassSpecOnly）を選択して、Activate Profile をクリックし、Activate します。
- ③ 緑色のチェックがかかったことを確認後、Close をクリックし Hardware Configuration Editor を閉じます。

\* 新しい Profile を作成する場合は Analyst<sup>®</sup> software 操作ガイドの'Profile を作成する'をご参照下さい。



## 1.3 Project（フォルダ）の作成

- ① Tool Bar の Tools から Project -> Create Project...を選択します。
- ② Project Name に適当な名前を入力します。（Training では Training を入力します。）
- ③ OK をクリックすることで、Project が作成され、画面上に表示されます。



### 【Project / Subproject について】

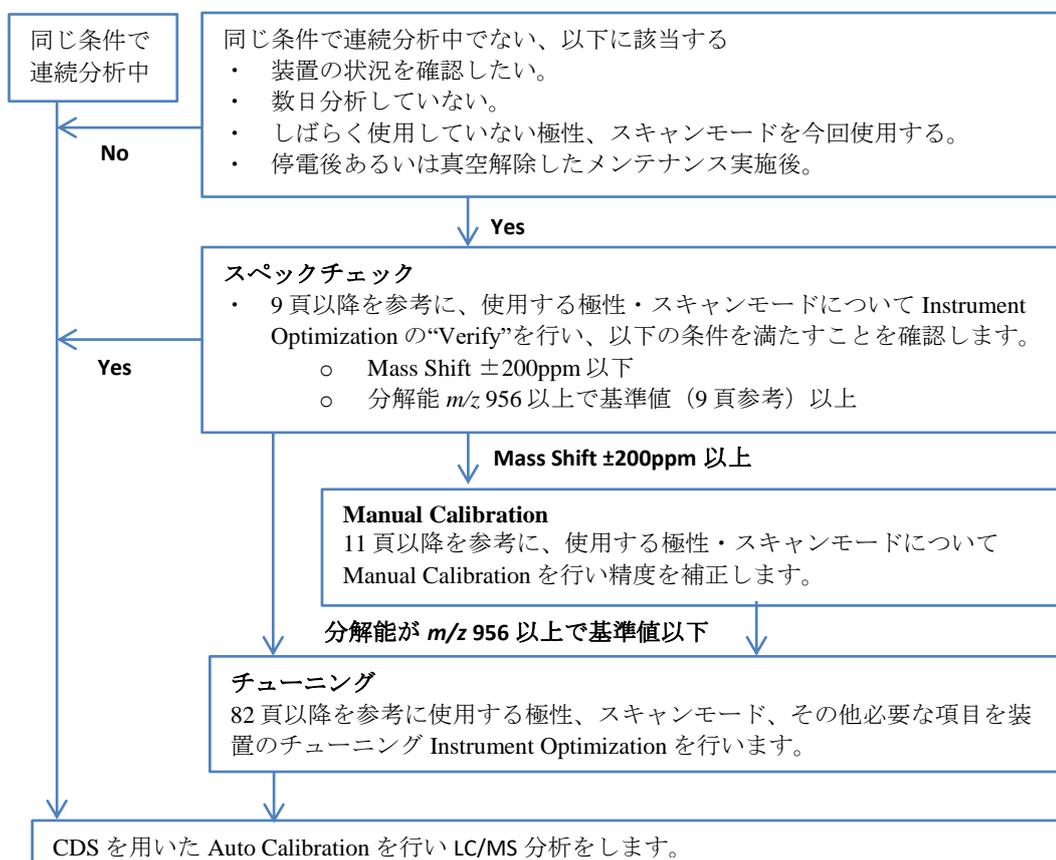
- Analyst<sup>®</sup> TF software のデータは Project で管理します。測定試料や測定者が変わるときは Project の作成、変更を推奨します。
- すべての Project は Default で D:\Analyst Data\Projects に保存されています。
- Subproject の使用は測定時不具合が起きる場合がありますので、推奨していません。また、Shimadzu LC システムの PDA を使用する場合は、Subproject を使用できません。

### 【API Instrument について】

- D:\Analyst Data\Projects 内の API Instrument という Project は、装置のキャリブレーションやパラメータなど非常に重要なファイルが入っています。定期的な Back Up を推奨します。また、通常の測定を行う際にこの Project を使用してファイルを保存したり、キャリブレーション用の測定法を削除したりすると、測定に障害を生じることがありますので、ご注意ください。

## 1.4 分析のワークフロー

- 以下を参考に、分析の前にスペックチェックあるいは Instrument Optimization 等を行うかの確認をします。



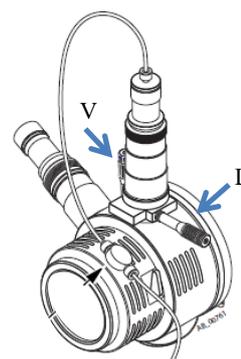
- 感度につきましては、導入時の Verify の結果あるいはお客様の標品などで確認を行い指標にすることをお勧めします。
- スプレーのポジションは Infusion および LC/MS 分析時で変更します。一般的な溶媒使用時の推奨値は以下になります。
  - ◇ Infusion (流速 5-20 $\mu$ L 程度) : 縦 5mm、横 5mm
  - ◇ LC/MS (流速 200-500 $\mu$ L 程度) : 縦 3mm、横 7mm (実際の分析時は最適化して変更することも可能、詳細は LC/MS の項を参照ください。)

## 1.5 標準試薬とイオン源の準備

① 使用する極性 (Positive or Negative) の装置のスペックチェック用の標準溶液をシリンジに挿入し、装置にセットします。

\* Training は Positive Mode で行います。標準溶液として APCI Positive Calibration Solution 用いて行います。

② スプレイヤーの Position (右図の矢印) をそれぞれ目盛 (縦 (V) 5mm、横 (L) 5mm) にセットします。



### 【標準溶液について】

■ 弊社の推奨は以下になります。

極性	推奨する標準溶液	製品番号	
		1 Pack	5 Pack
Positive	APCI Positive Calibration Solution	4460131	4460136
Negative	APCI Negative Calibration Solution	4460134	4460138

- TripleTOF® 6600、5600+ System の場合は、上記溶液を希釈して使用することも可能です (2mM 酢酸アンモニウム/50%アセトニトリル/水溶液の 2 倍希釈など)。
- スペックチェックと Calibration で異なる標準溶液を使用することもできます。
- 装置の管理のため、スペックチェックに使用する標準溶液は固定されることを推奨します。
- 他の試薬を使用する場合は、添付資料を参考に Calibration Table を作成ください。

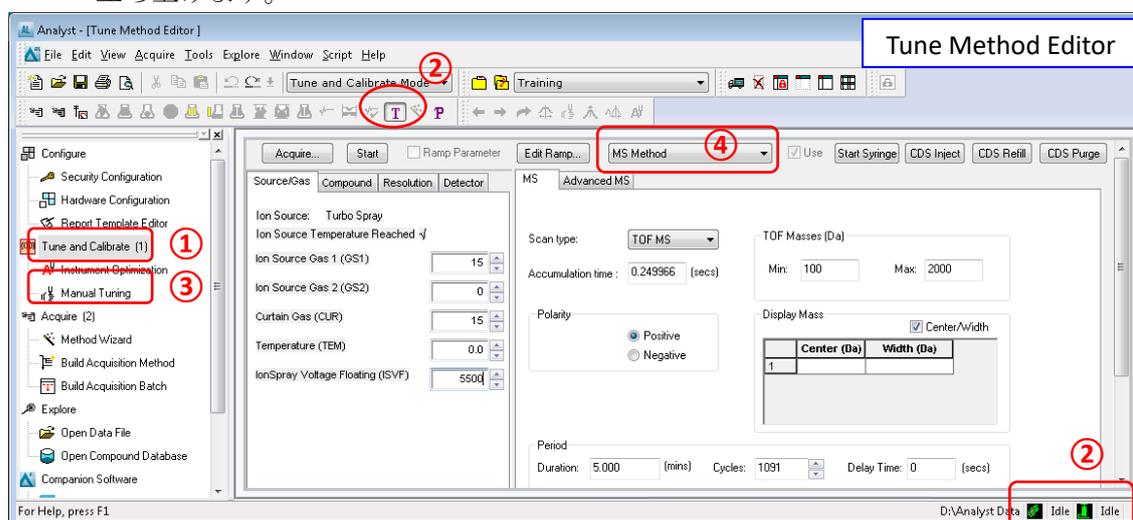
## 1.6 装置の起動と準備

① Navigation Bar の Tune and Calibrate をクリックします。

②  を 2 回クリックします。

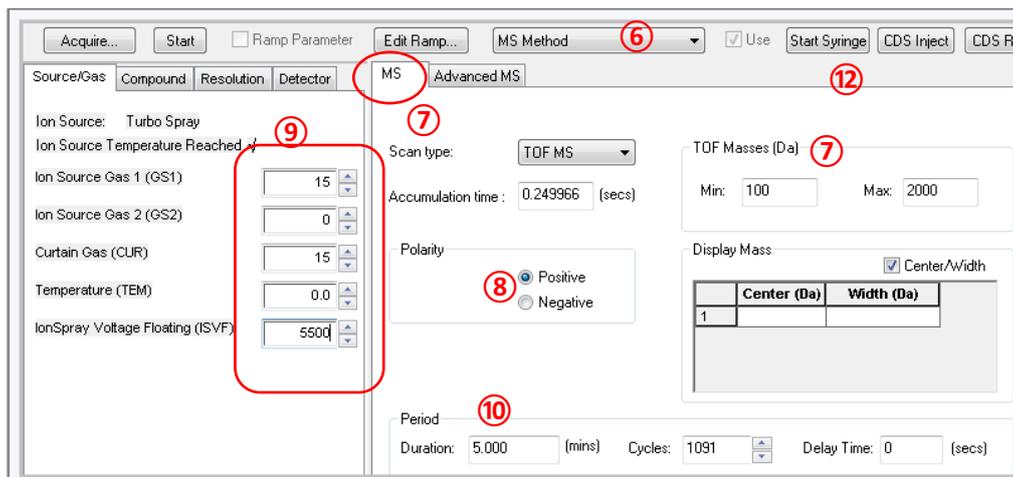
\* 画面右下の Mass 及びシリンジポンプの表示が黄色から緑に変わります。

③ Navigation Bar の Manual Tuning をダブルクリックし、Tune Method Editor 画面を立ち上げます。



- ④ MS Method のプルダウンメニューから Syringe Pump Method を選択します。
- ⑤ Syringe Diameter に使用するシリンジの内径、Flow Rate を入力 (Training では 4.61、10)、Unit に  $\mu\text{L}/\text{min}$  を選択します。
- ⑥ Syringe Pump Method のプルダウンメニューから MS Method に戻ります。
- ⑦ MS タブをクリックし、Scan Type に TOF MS を選択後、TOF Masses (amu) の Min、Max に測定質量範囲 (Training では 100、1000) を入力します。

Volume ( $\mu\text{L}$ )	Diameter (mm)
1000	4.61
500	3.26
250	2.3
100	1.46



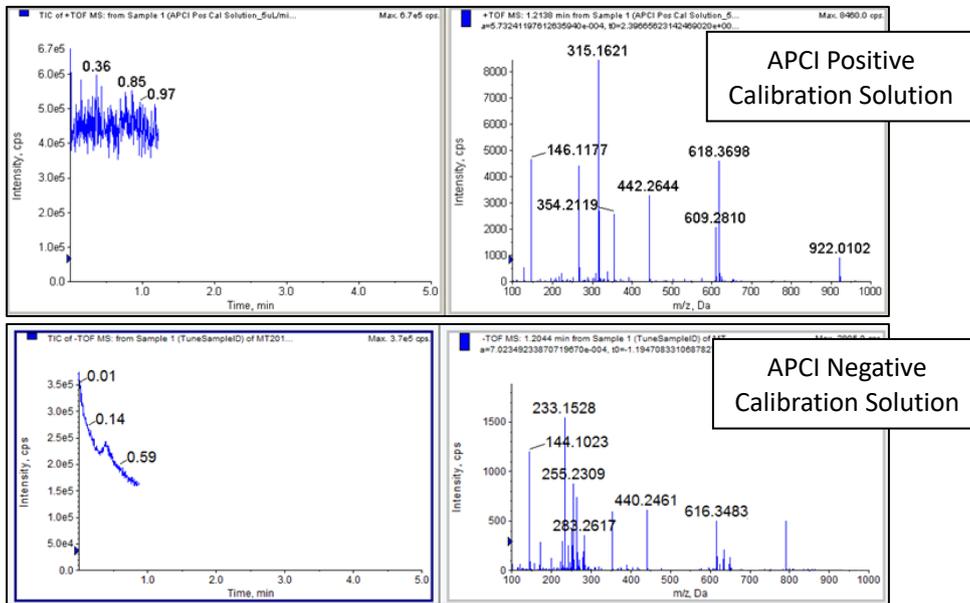
- ⑧ 目的の Polarity (Training では Positive) を選択します。
- ⑨ Source/Gas の設定 (Training では以下の table の初期値で設定) を行います。
- ⑩ Duration に測定の継続時間 (Training では 5) を入力します。
- ⑪ File menu の Save As... で、作成した Method を適当な名前(Training では Pos\_Infusion)で保存します。
- ⑫ 標準溶液をシリンジポンプにセットし、Start Syringe をクリックしてサンプルを MS に導入し、Start をクリックして測定を開始します。

#### 【パラメータと Infusion 測定時の初期値】

	略語	説明	説明	初期値 (Negative)
Compound	DP	Declustering Potential (V)	オリフィスプレートにかかる電圧	80 (-80)
	CE	Collision Energy (V)	コリジョンエネルギー	MS Product Ion 10 (-10) 35 (-35)
Source/Gas	GS1	Source Gas1 (psi)	ネブライザーガス	15
	GS1	Source Gas2 (psi)	ターボガス	0
	CUR	Curtain Gas (psi)	カーテンガス	15
	TEM	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	ヒーター温度	0
	ISVF	IonSpray Voltage Floating (V)	プローブにかかる電圧	5500 (-4500)

- 実際のサンプルの分析の際は、状況に応じて上記値を変更してお使いください。
- 熱に不安定な化合物やインソース CID を受けやすい化合物を分析される際は、TEM および DP を低めに設定してください (例 TEM : 350、DP : 30 程度)。
- TEM は最大 700 度で使用してください。750 度はヒーターの寿命が短くなります。

- ⑬ 目的の標準物質のイオン (Training では APCI Positive Calibration Solution) のイオンが観察され、TIC が安定するのを待ちます。

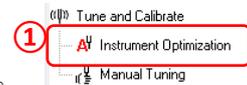


- ⑭ TIC 安定後、0.5~1 分後、Stop をクリックします。

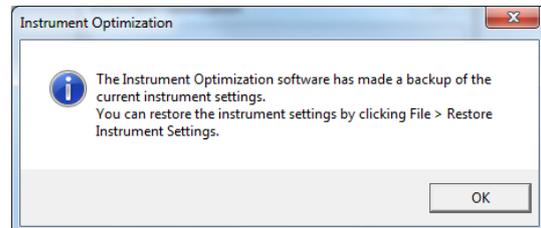
### 1.7 スペックチェックの実施

- 装置の感度、分解能を確認します。

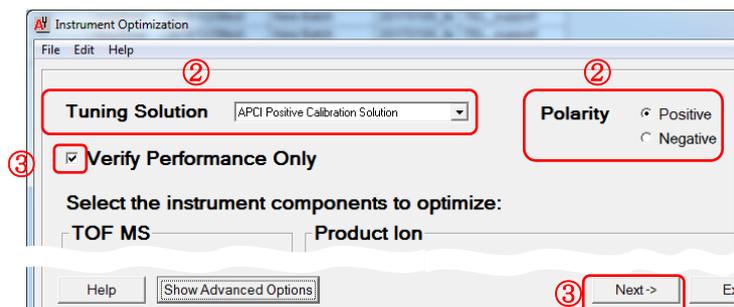
- ① Navigation Bar の Instrument Optimization をクリックします。



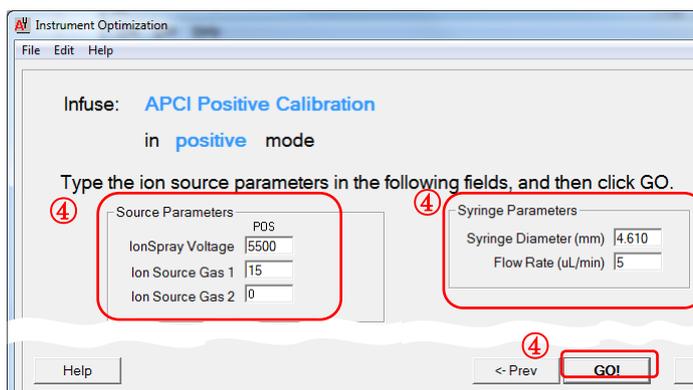
- \* 右図のメッセージが表示された場合、OK して Backup を作成します。



- ② Instrument Optimization の画面(下図)で、Tuning Solution に使用する Calibration Table 名、Polarity を選択します。(Training では APCI Positive Calibration Solution、Positive を選択してください。)
- ③ Verify Performance Only にチェックをかけ、Next をクリックします。



- ④ 右図を参考に、イオン源の設定（8ページに記載の初期値、Trainingでは以下）と使用するシリンジの内径、Flow Rate（Trainingでは4.61, 10）を入力後、画面下のGo!をクリックし、装置のチェックを開始します。



- ⑤ 終了後、レポートが作成され、以下のフォルダ内に作成される取得日時のフォルダ内に保存されます。

D:\Analyst Data\Projects\API Instrument\Data\Instrument Optimization

- ⑥ 実施した取得日時名フォルダ内の results.doc を開き、Resolution と Hight を基準値と比較し、Resolution 同等程度以上、Hight が基準値を大きく下がっていないことを確認します。

\* 上記を満たしていない場合はトラブルシュートの頁へ進みます。

- ⑦ 必要に応じて、①に戻り、別の極性 (Positive/Negative) についてチェックを行います。

2015-09-07 at 14:32  
Logged in as WABSCIEX

Instrument: Triple TOF 5600  
Model :  
Serial

Instrument Optimization Ver: 2.96.40

Instrument performance...

5600+, APCI Positive Calibration Solution 使用時の results.doc の例

TOFMS High Resolution					
Mass (Da)	Found At (Da)	Height (cps)	Area	Resolution	Error (ppm)
146.1176	146.1162	1.27E+03	4.78E+03	25 114	9.1
266.1598	266.1583	2.01E+03	8.16E+03	32 017	5.8
315.1623	315.1606	2.51E+03	1.03E+04	33 925	5.1
354.2122	354.2105	1.89E+03	8.46E+03	33 118	4.9
442.2647	442.2627	2.39E+03	1.20E+04	35 522	4.5
609.2807	609.2775	1.21E+03	6.34E+03	37 179	5.3
618.3695	618.3668	3.37E+03	1.85E+04	37 276	4.4
922.0098	922.0053	4.80E+02	2.85E+03	39 266	4.9

Product Ion High Resolution					
Mass (Da)	Found At (Da)	Height (cps)	Area	Resolution	Error (ppm)
174.0913	174.0908	1.32E+04	5.13E+04	26 521	3.1
195.0652	195.0648	2.30E+04	8.97E+04	28 033	1.9
236.1281	236.1277	4.56E+03	1.88E+04	29 036	1.8
365.1860	365.1854	4.80E+03	2.16E+04	33 512	1.8
397.2122	397.2113	1.45E+04	6.47E+04	35 233	2.4
448.1966	448.1956	8.81E+03	4.09E+04	35 356	2.1
609.2807	609.2792	1.03E+04	5.28E+04	37 761	2.4

Product Ion High Sensitivity					
Mass (Da)	Found At (Da)	Height (cps)	Area	Resolution	Error (ppm)
174.0913	174.0910	2.23E+04	1.33E+05	16 780	1.8
195.0652	195.0651	3.54E+04	2.10E+05	18 081	0.7
236.1281	236.1278	6.35E+03	5.07E+04	16 036	1.2
365.1860	365.1858	6.56E+03	5.85E+04	16 212	0.6
397.2122	397.2118	1.60E+04	1.60E+05	17 326	1.1
448.1966	448.1964	1.10E+04	1.06E+05	16 857	0.5
609.2807	609.2801	1.19E+04	1.31E+05	17 190	0.8

	Mode	Resolution			Height
		6600	5600 5600+	4600	
Positive	TOFMS at m/z 829.5	32000	30000	25000	
	Product Ion High Res. at m/z 397.2	30000			
	Product Ion High Sens. at m/z 397.2	15000		—	
Negative	TOFMS at m/z 933.6	32000	30000	25000	
	Product Ion High Res. at m/z 514.3	30000			
	Product Ion High Sens. at m/z 514.3	15000		—	

装置の Resolutin, Height の基準値

\* Height につきましては、装置、試薬、溶液により異なります。メンテナンス後など装置が汚れていない際に、標準品を測定、記載ください。

## 1.8 Manual Calibration

- \* 使用する極性 (Positive および Negative Mode) とスキャンモード (TOFMS, Product Ion Scan (TripleTOF® 6600、5600+ System の場合は High Resolution (HR) Mode と High Sensitive (HS) Mode) すべてにおいて Calibration を行う必要があります。

		Pos	Neg
6600	TOFMS		
5600+	Product Ion HR		
5600	Product Ion HS		
4600	TOFMS		
	Product Ion		

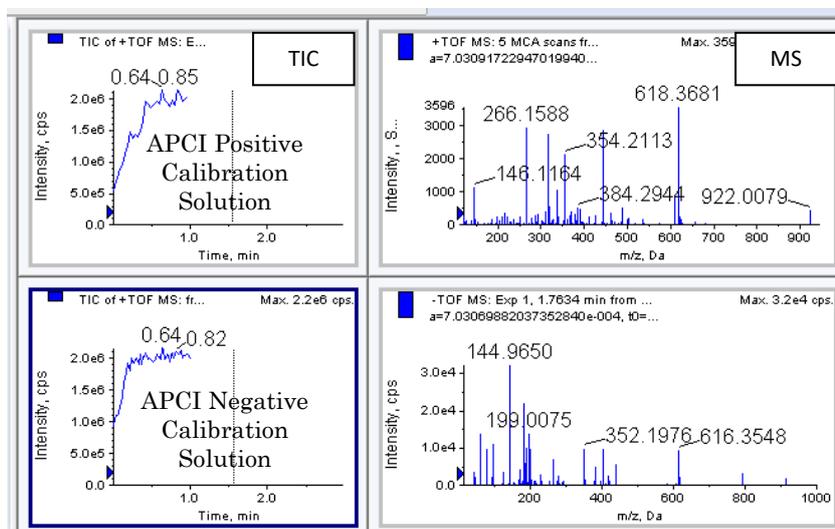
Calibration チェックリスト

- \* 使用する標準溶液は APCI Positive Calibration Solution、APCI Negative Calibration Solution あるいはその希釈液 (7 ページ) を推奨します。
- \* 他の試薬を使用する場合、巻末の参考資料を参考に、Calibration Table を作成してください。
- \* Calibration には Auto と Manual の 2 種類があります。この項では Manual Calibration について記載します。Training ではイオン源は DuoSpray、極性は Positive Mode、標準溶液として APCI Positive Calibration Solution を用いて Calibration を行います。
- \* LC/MS 分析の際は CDS を用いた Auto Calibration を行いますので、精度が大きくずれた場合を除いて Manual Calibration は必要ありません。

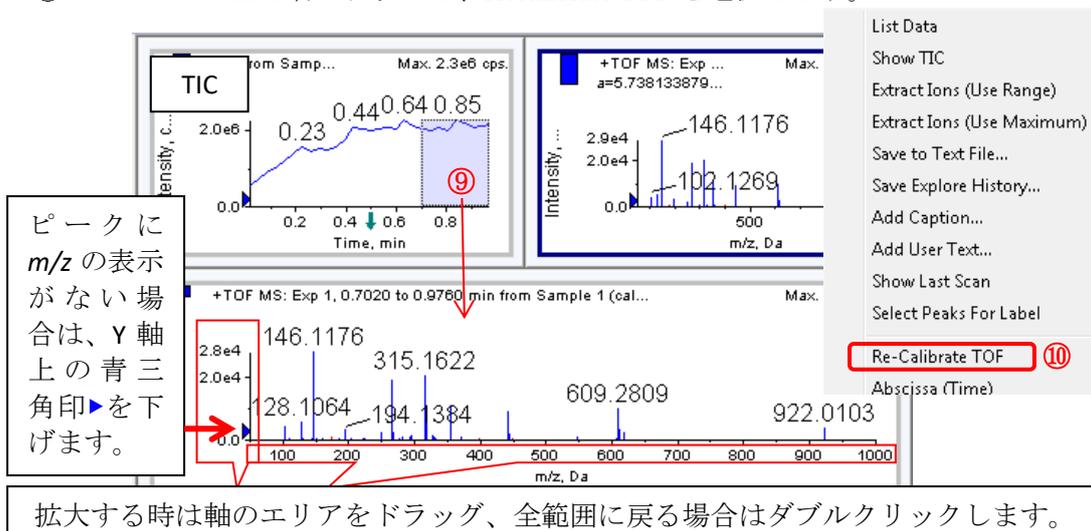
### 1.8.1 TOF MS

- ① Navigation Bar の Tune and Calibrate をクリックします。
- ②  をクリックします。
- ③ Navigation Bar の Manual Tuning をダブルクリックし、Tune Method Editor 画面を立ち上げます。
- ④ File menu の Open から、準備で保存した Method (Training では Pos\_Infusion) を開きます。(ErrorMessage は No で終了してください)
- ⑤ 標準溶液をシリンジポンプにセットし、Start Syringe をクリックしてサンプルを MS に導入します。
- ⑥ Start をクリックします。

- ⑦ 目的の標準物質のイオン (Training では APCI Positive Calibration Solution) のピークが観察され、TIC が安定するのを待ちます。



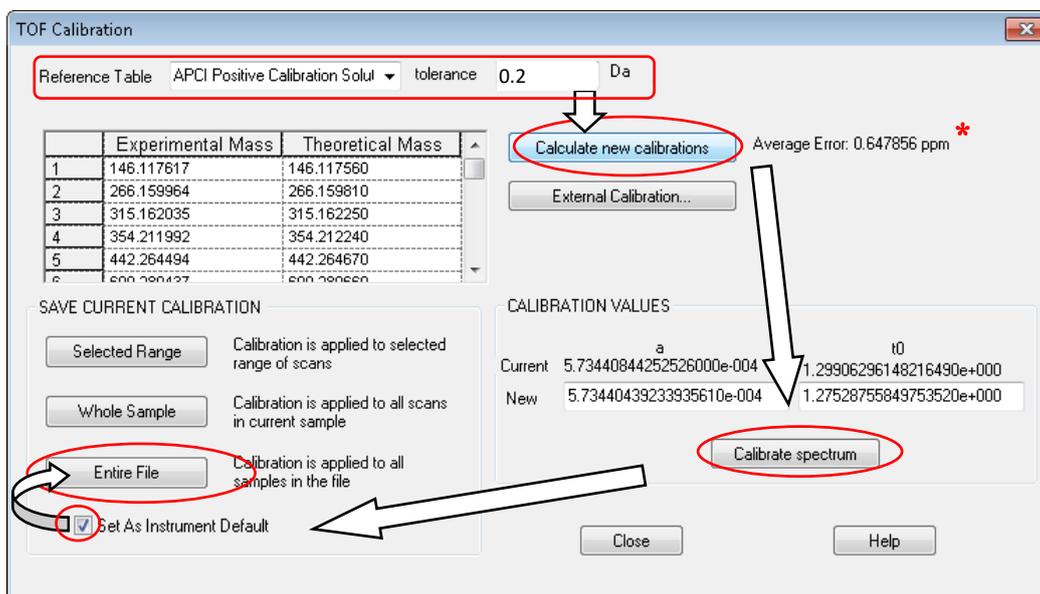
- ⑧ TIC の安定後、0.5~1 分後、Stop Syringe、Stop をクリックし、シリンジ、測定を止めます。
- \* 測定を stop して終了したデータでない場合、Manual Calibration ができません。
- ⑨ TIC 上で目的の標準物質のイオンが出ている部分を左ドラッグで選択後、ダブルクリックし、マススペクトルを表示させます。
- \* 手動で目的のイオンを選択する場合はそのピークを左ドラッグして (複数ピークを選択する場合はシフトキーを押しながら) 選択します。
- ⑩ スペクトル上で右クリックし、Recalibrate TOF を選択します。



- ⑪ Reference Table から、目的の Calibration Table (Training では APCI Positive Calibration Solution) を選択し、Tolerance に適当な値 (Training では 0.2) を入力します。

- \* Theoretical Mass (選択した Table に登録されている理論値)、Experimental Mass (入力した Tolerance 内で最も強い Peak の実測値) が自動入力されます。

- ⑫ Calibrate new Calibrations → Calibrate spectrum の順にクリックし、Set As Instrument Default にチェックが入っていることを確認後、Entire File をクリックします。



- ⑬ 保存名に適当な名前を入力し（変更の必要ありません）、保存します。

- ⑭ OK を 2 回クリック後、Close をクリックして終了します。

\* この操作により、このデータとこれ以降の Positive の TOFMS のデータが補正されます。

		Pos	Neg
6600	TOFMS	✓	
	Product Ion HR		
5600+	Product Ion HS		
4600	TOFMS	✓	
	Product Ion		

Calibration チェックリスト

### 【Calibration とトラブルシューティング】

\* Calibration 画面では、Reference Table を選択することで、Theoretical Mass に選択した Table に登録されている理論値、Experimental Mass に入力した Tolerance 内で最も強い Peak の実測値のリストが入力されます。

Q1) Experimental に表示される数が少ない。

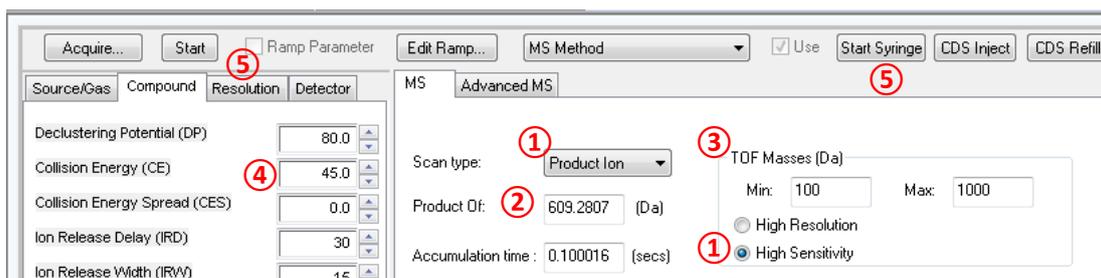
A: スペクトルに戻り、Y 軸上の青三角印▶を下げ、目的の  $m/z$  を表示させて、再度操作を行ってください。

Q2) Experimental に何も表示されない。

A: 装置のメンテナンスや Tuning 後など、大幅に Mass が Shift している場合があります。この場合、Tolerance を広げる、再度 Reference Table を選択するの操作を、数値が表示されるまで繰り返します。数値が表示された後、Calibrate new Calibrations をクリックし、画面右の\*の Calibration Error の値が数 ppm 以内であることを確認後、操作を続けてください。

## 1.8.2 Product Ion Scan

- \* TripleTOF® 6600、5600+ System の場合、Product Ion Scan には High Resolution (HR) Mode および High Sensitive (HS) Mode があります。
- \* High Resolution Mode、High Sensitive Mode については 15 頁を参照ください。
- ① MS のタブをクリックし、Scan Type を Product Ion に変更し、使用予定の High Resolution Mode あるいは High Sensitive を選択します。
- \* 4600 では必要ありません。Training では High Sensitivity を選択します。



- ② Product Of に Product Ion Scan に使用する親イオン\*の  $m/z$  (Training では 609.3) を入力します。

	② Product of	③ Mass Range	④ CE
Positive	609.3	100-1000	45
Negative	403.1	70-1000	-27

- ③ TOF Masses (Da) の Min, Max に測定質量範囲 (Training では 100、1000) を入力します。

- ④ Compound のタブをクリックし、Collision Energy (CE) に適当な値\*(Training では 45) を入力します。

- ⑤ Start Syringe、Start をクリックし、目的の標準物質の Product Ion のピークが観察され、TIC が安定するのを待ちます。

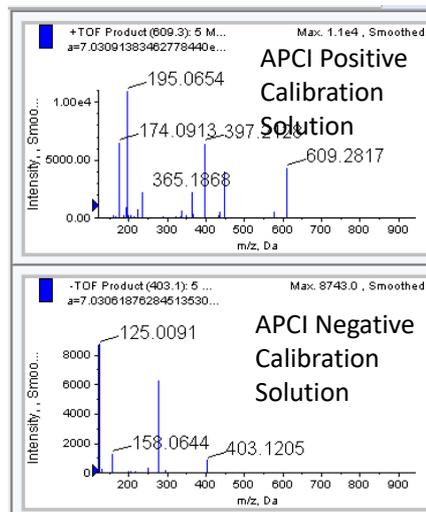
- ⑥ TIC の安定後、0.5~1 分後 Stop Syringe、Stop をクリックし、シリンジ、測定を止めます。

- ⑦ TOF の Calibration の⑧以降と同様な操作を行い、Product Ion の補正を行います。

- \* この操作により、このデータと以降の Positive の Product Ion HS のデータが補正されます。

- \* TripleTOF® 6600、5600+ System の場合、必要に応じて Product Ion Scan の High Resolution も同様の操作で実施します。

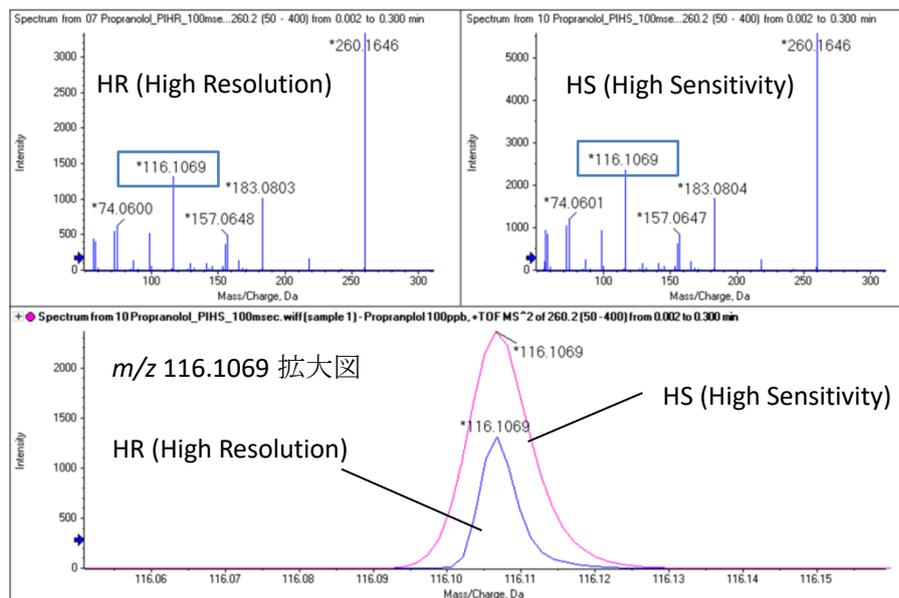
- ⑧ 上記 Table を参考に、必要な極性、モードすべてについて、同様に Calibration を行います。



		Pos	Neg
6600 5600+	TOFMS	✓	
	Product Ion HR		
	Product Ion HS	✓	
4600	TOFMS	✓	
	Product Ion	✓	

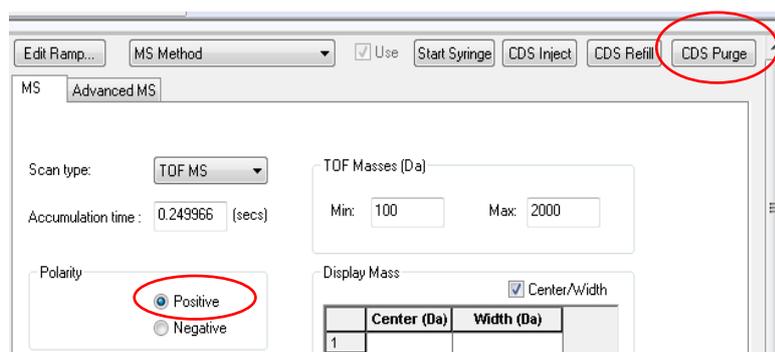
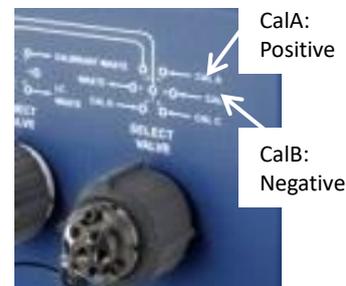
## 【 High Resolution (HR) Mode と High Sensitive (HS) Mode について】

HS Modeにて測定を行うと、HR Modeに比べ感度向上が期待できます。ただし、HS ModeではHR Modeに比べて分解能が落ちるため、ごく近傍に夾雑ピークが存在する場合は、HRモードで測定することを推奨します。



### 1.9 CDSの準備

- \* LC-MS の測定時、前回の測定から時間があいている場合や、イオン化法の変更などで標準溶液を変更した場合には行います。
  - \* CDS の動作の詳細につきましては、添付資料を参照ください。
- ① 使用する極性 (Positive あるいは Negative) のボトル (それぞれ CalA と CalB に接続) に測定に十分な量の標準溶液が入っていることを確認します。
  - ② 測定目的の極性であることを確認後、画面右上の CDS Purge をクリックし、終了するまで 5 分待ちます。
- \* Purge 中は CDS Stop の表示に代わります。Purge が終了すると、CDS Purge に表示が戻ります。
  - \* Training では、Stop をクリックし、途中終了させてください。



# Tune Mode を用いた Manual 測定

## 2 Tune Mode を用いた Manual 測定

- \* Training ではイオン源は DuoSpray、サンプルとして Positive Calibration Solution を用いて、Reserpine 測定を行います。(流速：10 $\mu$ L/min)

### 2.1 測定モードおよび測定時の機能について

#### ➤ 測定モード

##### TOF MS

MS を測定するモードです。分子量関連イオンを測定する際に使用します。

##### Product Ion Scan

Product Ion を測定するモードです。Fragmentation は Collision Cell で行われます。

- \* Q1: Precursor Ion の選択 → Q2 Collision Cell: Fragmentation → TOF: 測定になります。
- \* TripleTOF<sup>®</sup> 6600、5600+ System は High Resolution Mode および High Sensitive Mode の 2 種類の設定 (15 項参照) があります。(TripleTOF<sup>®</sup> 4600 System は 1 種類です。)

##### Precursor Ion Scan

Product Ion から Precursor Ion の情報を得るモードです。TripleTOF では高速測定が可能のため、Precursor Ion Scan の使用ではなく、後述する IDA で測定した Data から、解析で Precursor Ion の情報を得ることを推奨しています。このため、Training では行いません。

#### ➤ 測定時の機能

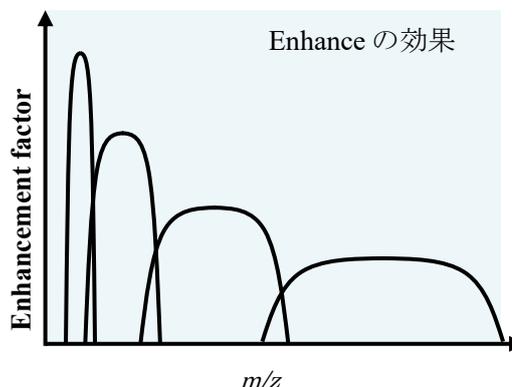
##### Auto Calibration

指定したイオンで常に Calibration を行います。

##### Enhance

指定した  $m/z$  付近のイオンの TOF への導入効率を上げて測定します。 $m/z$  の小さい領域について有効です。定量測定時によく使用します。

- \* Enhance 機能使用時は、非使用時と Calibration が異なりますので、精密質量測定の際は、必要に応じて補正しなおしてください。



## 2.2 TOF MS

① MS のタブをクリックし、TOF Masses (amu)の Min、Max に測定質量範囲を入力します。

\* Training ではそれぞれ 100、1000 を入力してください。

② サンプルをセットし、Start Syringe をクリックしてサンプルを MS に導入します。

③ Start をクリックします。

④ 目的物質のイオン (Training では 609) のピークが観察され、TIC が安定するのを待ちます。

⑤ Stop をクリックします。

\* TOF MS スペクトルで Fragment Ion が観測される場合は Compound のタブの DP を下げてください。

### データの測定と保存

① Manual Tuning の Acquire のボタンをクリックし Sample Name、Data Filename、Comment にサンプル情報などを入力します。

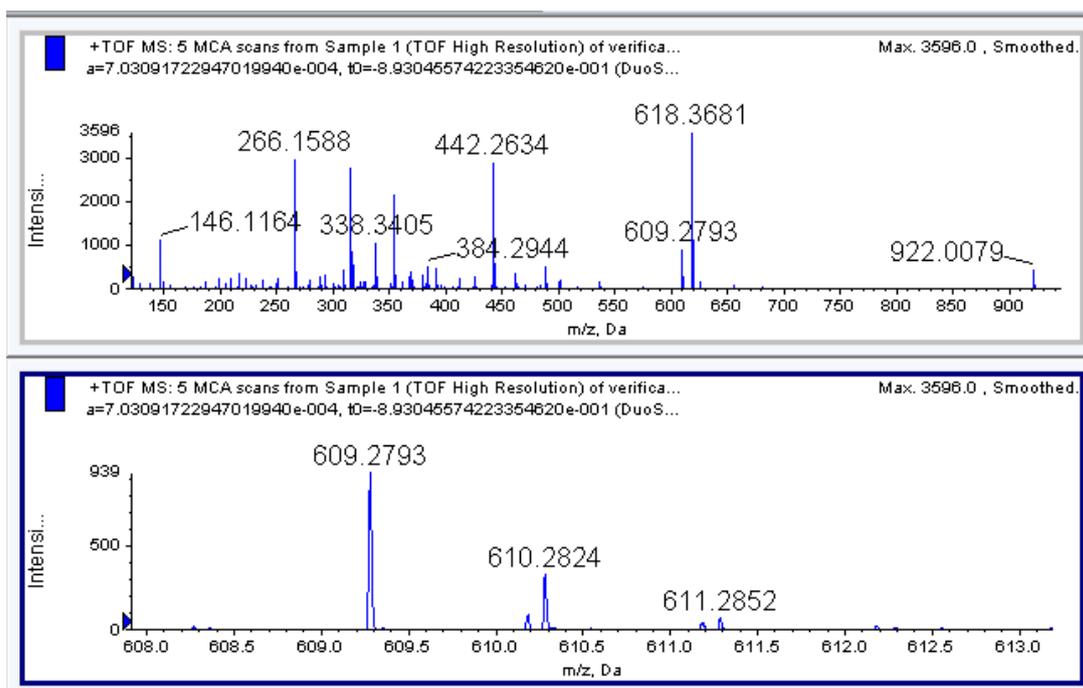
② Training では Data File Name に ResTOFMS と入力してください。

③ OK をクリックすると測定が始まり、データが保存されます。

④ 途中で測定を止めるときは Stop をクリックします。

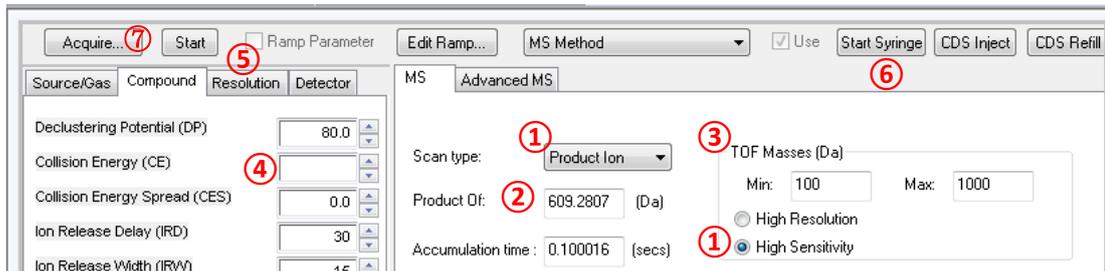
⑤ 測定終了後、Stop Syringe をクリックし、シリンジを止めます。

\* 引き続き測定を行う場合はシリンジポンプを止めなくても構いません。Training では止めずに測定を続けます。



## 2.3 Product Ion Scan と Enhance

- \* TripleTOF<sup>®</sup> 6600、5600+ System の場合、Product Ion Scan には High Resolution Mode および High Sensitive Mode があります。Calibration 済みの Mode を使用ください。
- ① MS のタブをクリックし、Scan Type を Product Ion に変更し、High Resolution Mode あるいは High Sensitive を選択します。
- \* High Resolution Mode、High Sensitive Mode については 15 頁を参照ください。
- \* 4600 では設定がありません。Training では High Sensitivity を選択します。

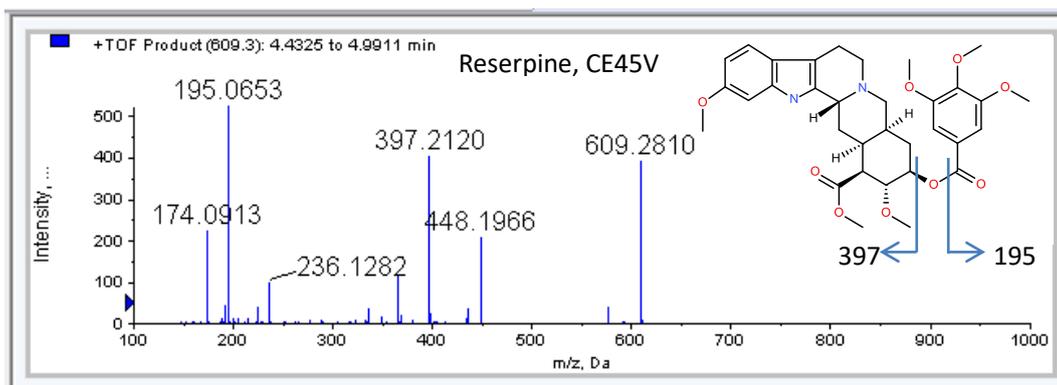


- ② Product Of に目的の親イオン\*の  $m/z$  (Training では 609.3) を入力します。
- ③ TOF Masses (Da) の Min, Max に測定質量範囲 (Training では 100、1000) を入力します。
- ④ Compound のタブをクリックし、Collision Energy (CE) に 10、Collision Energy Spread (CES) に 0 を入力します。
- \* CES については 19 頁を参照ください。
- ⑤ Resolution のタブをクリックし、必要に応じて、Q1 の分解能 (19 頁参照、Training ではデフォルトの Unit) を変更します。
- ⑥ Start Syringe Pump をクリックしてサンプルを MS に導入します。
- ⑦ Start をクリックします。
- ⑧ Precursor Ion (Training では 609) を確認後、フラグメントイオンのパターンを観測しながら、Compound のタブで CE, CES の値を最適化します。
- ⑨ Precursor Ion (Training では 609) を確認後、フラグメントイオンのパターンを観測しながら、Compound のタブで CE, CES の値を最適化します。
- ⑩ Stop をクリックします。
- ⑪ 測定終了後、Stop Syringe をクリックし、シリンジを止めます。
- \* 引き続き測定を行う場合はシリンジポンプを止めなくても構いません。Training では止めずに測定を続けます。

### データの測定と保存

前項のデータの保存と測定の方法と同様に、Acquire をクリックし、測定を行います。

- \* Training では Data File Name に ResMSMS と入力してください。



### 【CES (Collision Energy Spread) について】

数値を入力することで、CE-CES から CE+CES の値で CE を掃引しながらスペクトルを取得します。

例) CE 45, CES 15 の場合 : CE 30-60V で測定を行い、全 CE の平均のスペクトルが表示されます。

- \* IDA や SWATH など、低分子から高分子、開裂しやすい化合物から開裂しにくい化合物など、網羅的な成分の自動測定を行う場合に有効です。
- \* 定量時など、化合物ごとに最適な CE がある場合は、通常 CES 0 を使用します。
- \* CES を使用する場合、Accumulation time は、25ms 以上に設定してください。
- \* 得られるスペクトルは平均のスペクトルになります。得られた結果から各 CE のスペクトルの閲覧はできません。

### 【Resolution について】

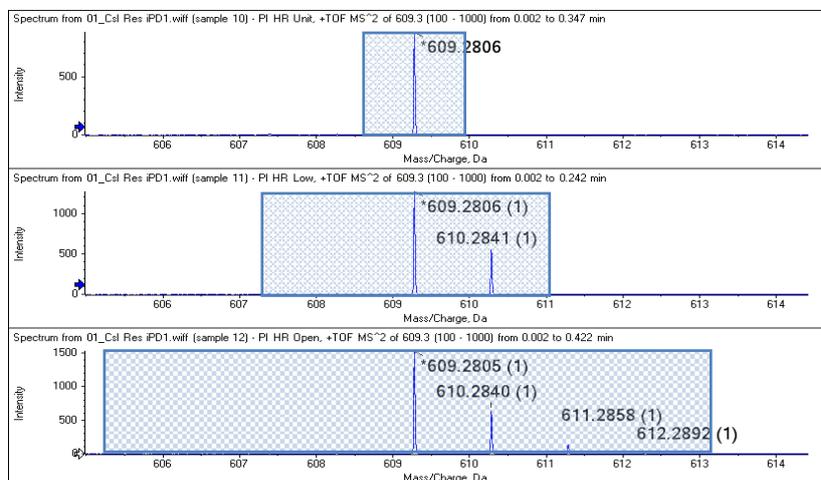
Q1 Resolution は Product Ion Scan および Precursor Ion Scan の際に、Q1 を通過させるイオンの  $m/z$  の範囲になります。

Unit: 設定値から  $\pm 0.7 \pm 0.1$  amu の範囲

High: 設定値から  $\pm 0.5 \pm 0.1$  amu の範囲

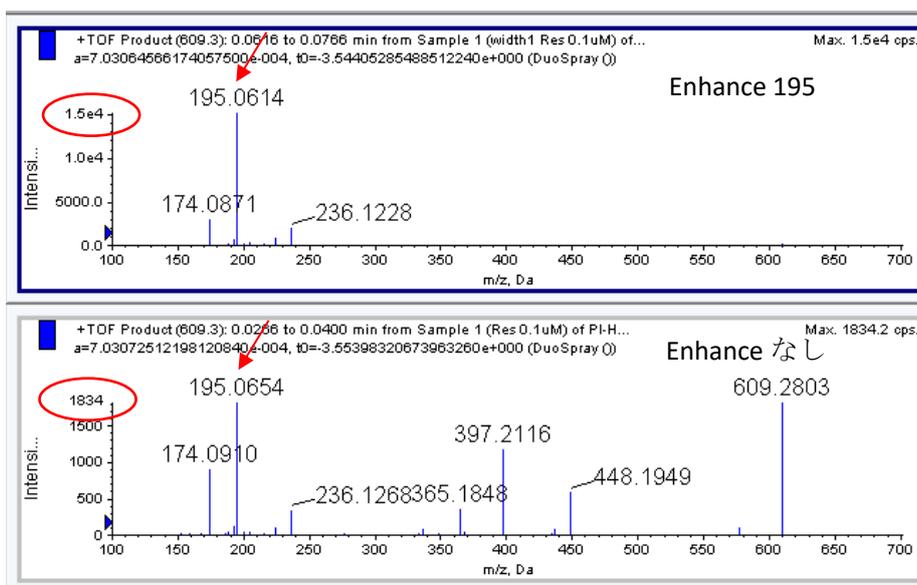
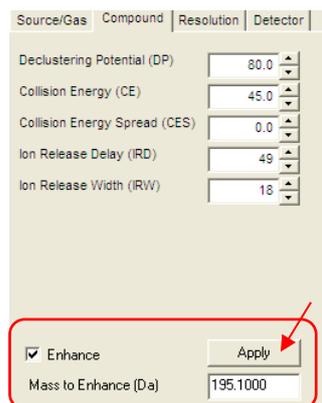
Low: default の設定で設定値から  $\pm 1.5 \sim 2$  amu の範囲 (変更可能)

Open: default の設定で設定値から  $\pm \sim 4$  amu の範囲 (変更可能)



## 2.4 Enhance

- \* TripleTOF<sup>®</sup> 6600、5600+ System の場合、High Sensitive Mode のみで使用できます。
- ① Compound のタブをクリックし、Enhance にチェックをかけ、目的の  $m/z$  (Training では 195.1) を入力し、Apply をクリックします。
  - ② 前項のデータの保存と測定の方法と同様に、Acquire をクリックし、測定を行います。
- \* Training では Data File Name に ResMSMSEnh195 と入力してください。
  - \* 測定中、マススペクトルの  $m/z$  のレンジが Enhance されている付近に変わります。全体を表示させる場合は、マススペクトル上を右クリックし、All Mass Ranges を選択してください。
- ③ 測定終了後、Stop Syringe をクリックし、シリンジを止めます。
  - ④ Enhance のチェックを外し、Apply をクリックします。



## 2.5 測定の終了、流路の洗浄

- ① シリンジ及び流路を洗浄します。
  - \* サンプルが溶解する溶媒を導入し、TOF MS を選択、Start をクリックし、サンプルのピークが出なくなったことを確認後、終了してください。
- ② シリンジ及び流路を水/メタノール=1/1 など、適当な溶媒に置換します。
- ③ Tune Method 画面を閉じます。
  - \* Method を保存する場合は Yes、保存しない場合は No を選択して終了します。
- ④ Tool Bar の をクリック後、 をクリックして装置を Standby にし、ガスの流量と検出器の電圧を最小限に落とします。
  - \* 画面下の Mass 及びシリンジポンプの表示が緑から黄色に変わります。

# データ解析（基本編: Analyst® TF）

## 3 データ解析（基本編: Analyst® TF Software）

### 【Analyst Explorer モードと PeakView® Software の違いについて】

- スペクトル解析は Analyst の Explorer モードおよび PeakView® Software の 2 通りの方法があります。以下の主な違いを参考に、目的に応じて使用ください。
- 測定後の解析においては、より軽快で高機能な PeakView® Software を推奨します。
- PeakView® Software の詳細な説明につきましては、ユーザーマニュアル（日本語、英文）、Reference Guide（英文）を参考ください。英文の資料につきましては、PeakView® Software の Help から参照することが可能です。

#### Analyst® の Explorer モード

- 従来の Analyst に搭載されている解析モードです。
- 測定中の Data についての解析が可能です。
- Data のサイズにより、Data を開くまでに時間がかかる場合があります。
- MS/MS の Library Search が可能です。

#### PeakView® Software

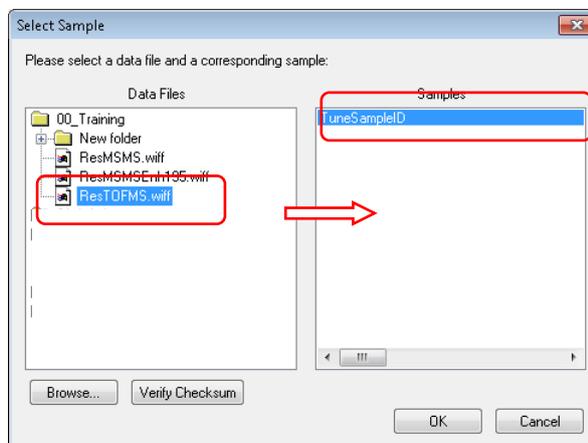
- Analyst TF 用に開発された、新規 Software です。
- 測定中の Data は開くことができません。
- 複数の Data を一度に選択して開くことができます。また、同時に解析することが可能です。
- IDA Explorer、Fragment Ion の帰属など様々な機能が追加、改良されています。
- MS/MS の Library Search はできません。MasterView/LibraryView Software で行います。

### 3.1 Analyst の Explorer モードを用いた解析

- \* Training では、Infusion の Data を Analyst の Explorer モード、LC-MS の Data を Analyst の Explorer モードおよび、PeakView® Software を使用して解析を行います。

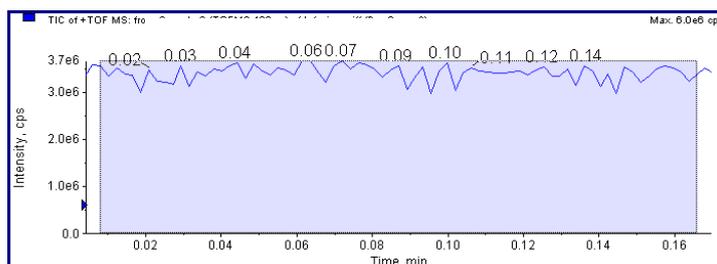
#### Open Data

- Navigation Bar の Explore の Open Data File をダブルクリックし、Select Sample 画面から目的のデータファイル、サンプルを選択し OK をクリックします。
- \* Training では取得した ResTOFMS を選択してください。



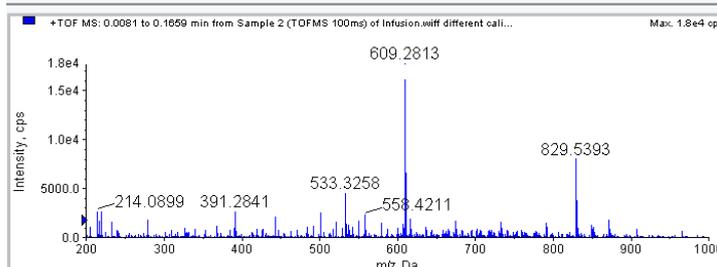
## スペクトルの表示

- TIC 上で目的の時間をダブルクリック、あるいは目的の時間の範囲を左ドラッグで選択後ダブルクリックすることで、選択した範囲の平均のマススペクトルが表示されます。



## ピークラベル(m/z)の表示

- Y 軸に表示されている三角形のマークをドラッグするとピークラベルの閾値を変更することができます。



## スペクトルの拡大

- スペクトルの縦軸もしくは横軸の外側を左ドラッグすることによりスペクトルを拡大することができます。
- 元に戻す際は、拡大した横軸の外側をダブルクリックあるいは Tool Bar の  をクリックして下さい。

## スペクトルの表示を隠す、消す

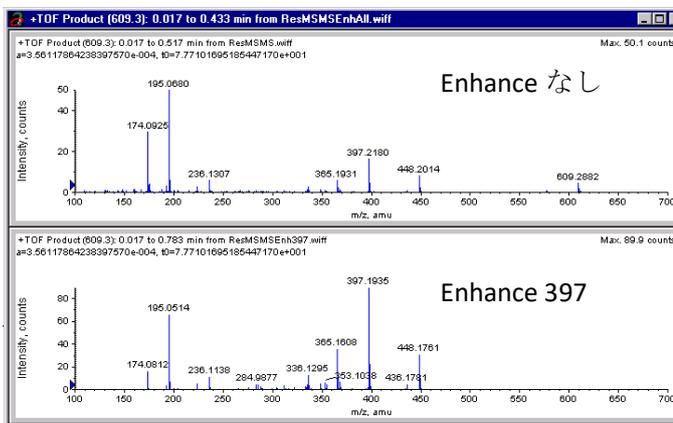
- Tool Bar の  (表示を隠す) あるいは  (表示を消す) をクリックします。
  - \* Training では TIC を隠してください。
  - \* 隠した画面については  をクリックすることですべての画面が表示されます。
  - \* 1つの画面を全画面にしたい場合は  をクリックしてください。

## スペクトルの移動

- \* Training では ResMSMS、ResMSMSEnh195 の感度、スペクトルの比較を行います。データを開き、それぞれ解析してください。

- ① 移動させるスペクトル上をクリックし、Tool Bar の  をクリックします。

- ② 目的のスペクトルの枠付近にマウスのカーソルを移動し、 を表示させた状態でマウスを左クリックしながらスペクトルを移動します。

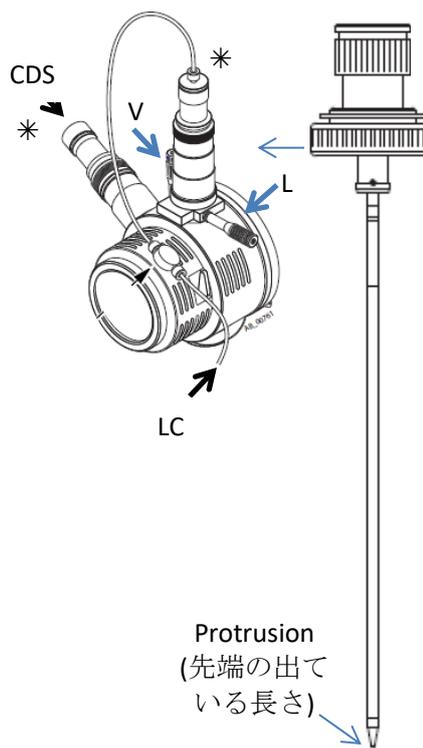


# LC-MS、Acquire Mode での測定

## 4 LC-MS、Acquire Mode での測定

### 4.1 装置の Configuration と準備

- ① 右図を参考に、CDS, LC との接続を行います。  
\* APCI 使用時は配管が異なります。\*の接続を入れ替えてください。
- ② スプレイヤーの Position（右図の青矢印）を以下を参考に、適当な目盛にセットします。
- ③ 必要に応じ、以下を参考にスプレイヤーの先端部分を調整します。



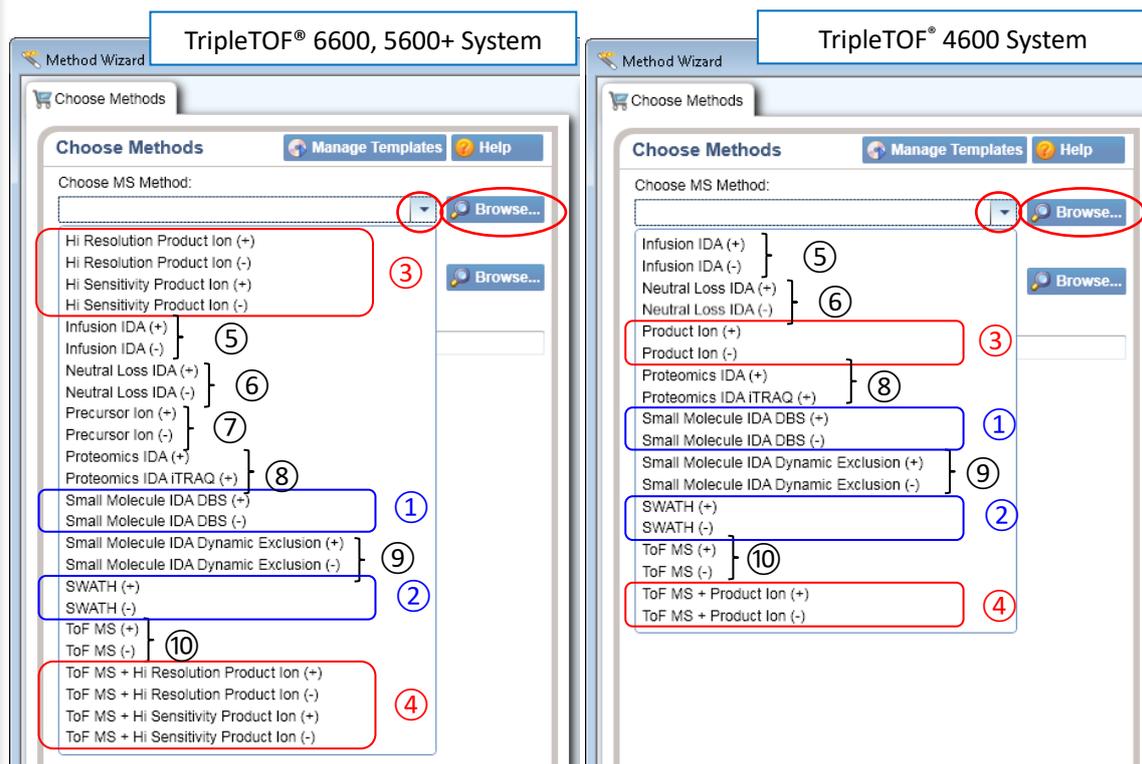
Flow Rate (μL/min)	Probe Position	Protrusion
10-50	V=5-10	~2 mm
	L=4-6	
51-150	V=3-7	~1 mm
	L=4-6	
151-400	V=0-5	~1 mm
	L=4-6	
401-800	V=0-3	~1-0.5 mm
	L=4-6	
Above 800	V=0-2	~0.5mm
	L=3-7	

- ④ Navigation Bar の Hardware Configuration をダブルクリックし Hardware Configuration Editor を開きます。
- ⑤ LC のポンプ、オートサンプラー等を制御する Profile を選択し Activate Profile をクリックします。  
\* 島津社製の PDA について、使用する、しないを切り替える場合は、Hardware Configuration 画面で Deactivate Profile をクリックして現在の Configuration を切った後、HPLC を再起動し、再度変更後の Profile を選択後、Activate してください。使用しない場合は、PDA なしの Profile を使用されることを推奨します。
- ⑥ Activate されたことを確認後、Hardware Configuration Editor を Close します。  
\* 新しい Profile を作成する場合は Analyst<sup>®</sup> Software 操作ガイドをご参照下さい。

## 4.2 Method Wizard を用いた Method 作成

### 【Method Wizard について】

- \* TripleTOF System では Method Wizard から簡便に Method 作成が可能です。
- \* ▼から Template を選択、あるいは、Browse から以前作成した Method を使用し、Method を作成することができます。
- \* MS、LC の測定条件を組み合わせ、新しい Method を作成することができます。
- \* 装置により、使用できる Method (Template) が異なります。



### 低分子化合物の分析で主に使用する測定法と目的

- ① IDA : 定性分析、Data Dependent Acquisition
- ② SWATH : 定性分析、Data Independent Acquisition
- ③ MS/MS : 定量、目的物質の MS/MS
- ④ TOF MS-MS/MS : 定量、MS および目的物質の MS/MS

### その他の測定法と目的

- ⑤ Infusion IDA : Infusion 測定時の IDA
- ⑥ Neutral Loss IDA : Neutral Loss からの IDA、主に代謝物同定で使用
- ⑦ Precursor ion : Precursor ion Scan
- ⑧ Proteomics IDA, iTRAQ : タンパク同定、定量
- ⑨ Small Molecule IDA DBS : 定性分析、③からも同じ Method 作成可能
- ⑩ TOF MS のみ

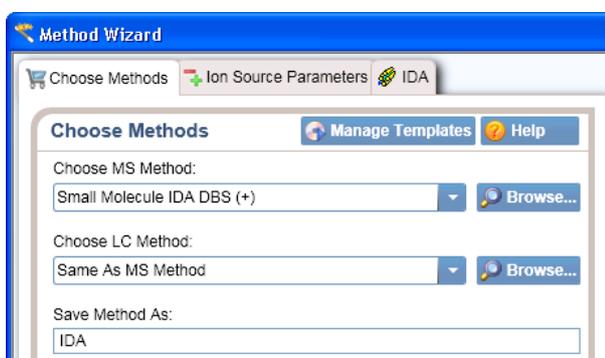
### 4.3 Method の作成 -1 IDA

Training では、Positive Mode の IDA\_TOF MS-10MS/MS（定性用）および TOF MS-MS/MS（定量用）について作成、測定を行います。

- \* Training ではイオン源は DuoSpray、サンプルとして APCI Positive Calibration Solution を使用します。（溶媒：0.1%ギ酸/水、0.1%ギ酸/アセトニトリル、Column Size 2.0~2.1mm、LC の流速：200-400 $\mu$ L/min、inj. Volume 5 $\mu$ L）
- \* 以前に作成した Method を使用する場合は Navigation Bar の Acquire をクリックした後 Project を目的の Method が保存されている Project に切り替えて、メニューバーの File -> Open から Method を呼び出します。次に今回使用する Project に切り替えて、メニューバーの File -> Save as... で Method を保存し直してください。

① Navigation Bar の Method Wizard をダブルクリックします。

② Choose Methods タブの Choose MS Method で目的の MS の Method を選択します。



- \* Training では下矢印から Template を開き、Small MoleculeIDA DBS (+) を選択してください。

- \* 以前測定した Method を開く場合は Browse から選択してください。

③ 以前作成した LC 条件を使用する場合、Choose LC Method で Browse... から目的の LC 条件を選択します。作成済みの LC 条件がない場合はスキップします。

- \* Training では選択しません。

④ Save Method AS: で保存する File 名(Training では IDA)を入力後、Enter キーを押します。

⑤ Next をクリックします。

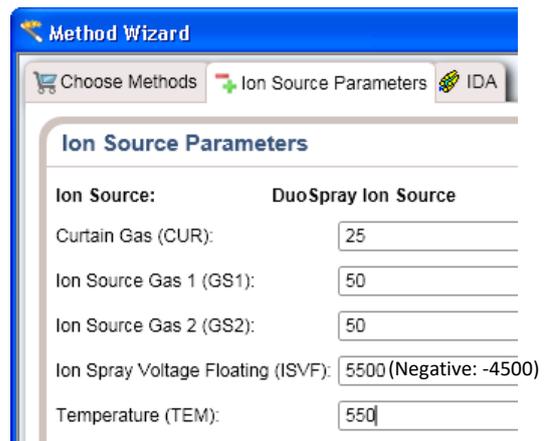
⑥ Ion Source Parameters Tab で適当な parameter を入力し Next をクリックします。

- \* 以下の Table を参考に入力します。最適化した値がある場合はその値を使用してください。

Flow Rate ( $\mu$ L/min)	10-50	51-150	151-400	401-800	Above 800
CUR <sup>b</sup>	15-20	25	30	35	40
GS1	30-10	30-50	40-70	50-90	60-90
GS2 <sup>c</sup>	0-30	30-50	40-70	50-90	60-90
TEM <sup>a</sup>	0-150	150-250	250-500	500-650	600-750

**General Settings to Use When Beginning Method Development**

- \* Training では右のように入力してください。
- ⑦ IDA タブで parameter を入力します。
- \* Training では下図のように入力してください。
- ⑧ 入力後、Method Wizard の画面で Finish をクリックして終了します。
- ⑨ 作成に成功すると、The method IDA was successfully saved. のメッセージが表示されますので、OK をクリックして終了します。



親イオンの測定範囲

親イオンの積算時間

各 MS/MS の積算時間:  
最小 10msec、CES 使用時の推奨: 25msec 以上

測定時間

Scheduled Ionization を使用する場合は、チェックを入れ、Start にイオンの取り込み開始時間、Stop に測定終了時間を入力します。  
\* チェックを入れた場合、Mass Spec Acquisition Duration は Stop に設定した時間になります。

1 サイクルで測定する MS/MS の数  
最大数:  
TripleTOF 6600+: 100  
TripleTOF 5600+: 100  
TripleTOF 4600: 50

Mass Defect Filter (備考 3 を参考ください。)

MS/MS の測定範囲

MS/MS の CE

1 Cycle の測定時間 (自動計算)

Tips: Cycle Time を見ながら、MS/MS の数と積算時間を調整します。

同じイオンを繰り返し選択させないための設定。  
For: 選択後、指定した時間の間、同じイオンを選択しない。

同じイオンを繰り返し選択させるための設定

Include List:  
必ず MS/MS を行いたい m/z

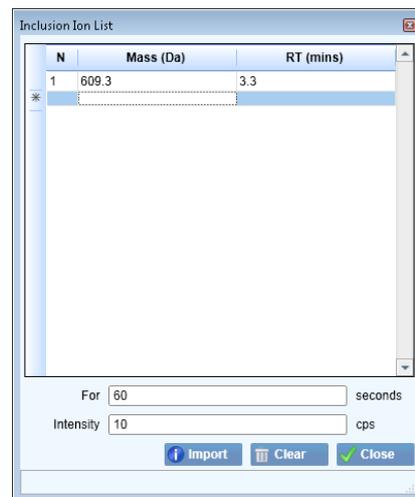
Exclude List:  
MS/MS の測定対象から除外したい m/z  
(備考 1 を参考ください。)

### 【備考1】 Inclusion List, Exclusion List

必ず MS/MS を行いたい m/z、MS/MS の測定対象から除外したい m/z がある場合に使用します。

- ① チェックをかけ、Details をクリックします。
- ② 起動した右の画面で、Import をクリックし、Text 形式で保存した ListFile を開く、あるいは目的の Mass, RT を入力します。
- ③ 画面下に RT の Tolerance、Ion 強度の閾値を入力し Close します。

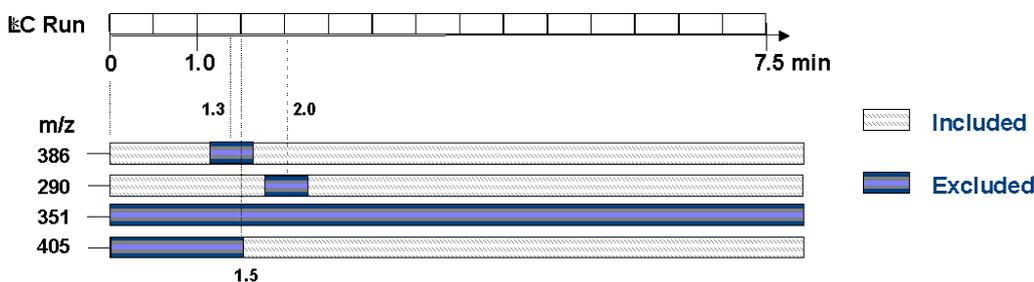
\* RT は以下の備考 2 をご参考ください。



### 【備考2】 SMART Filter (IDA – Specific Mass And Retention Time Filter)

Analyst での測定 Method 作成時の RT の設定方法になります。

- ・ 正の値：入力した時間を基準に window (For: ~ sec) で設定した時間
- ・ 0：全測定時間
- ・ 負の値：測定開始から入力した時間

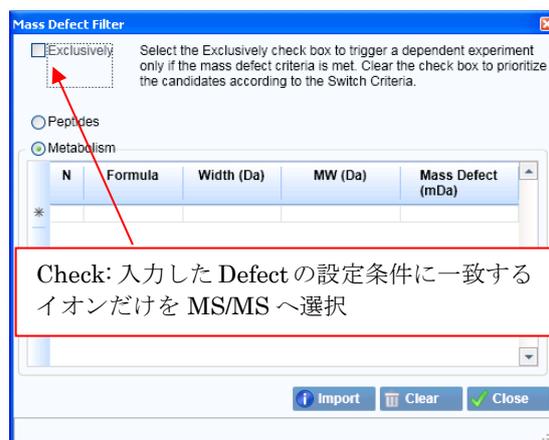


### 【備考3】 Mass Defect Filter

主に薬物の代謝物同定や、類縁体の分析、低分子ペプチドの分析時に使用します。

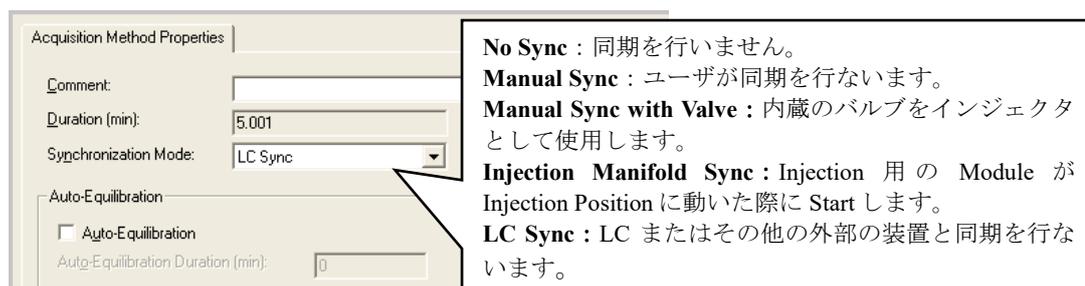
\* 薬物代謝物同定用の詳細な Manual を別途用意していますので、必要な方はご請求ください。

- ① Mass Defect Filter に check をかけ、Details をクリックします。
- ② 起動した右の画面で、Peptide あるいは Metabolism を選択します。
- ③ Metabolism を選択した場合、Import をクリックし、Text 形式で保存した ListFile を開く、あるいは目的の情報を入力します。
- ④ 必要に応じて、Exclusively にチェックをかけ、Close で終了します。

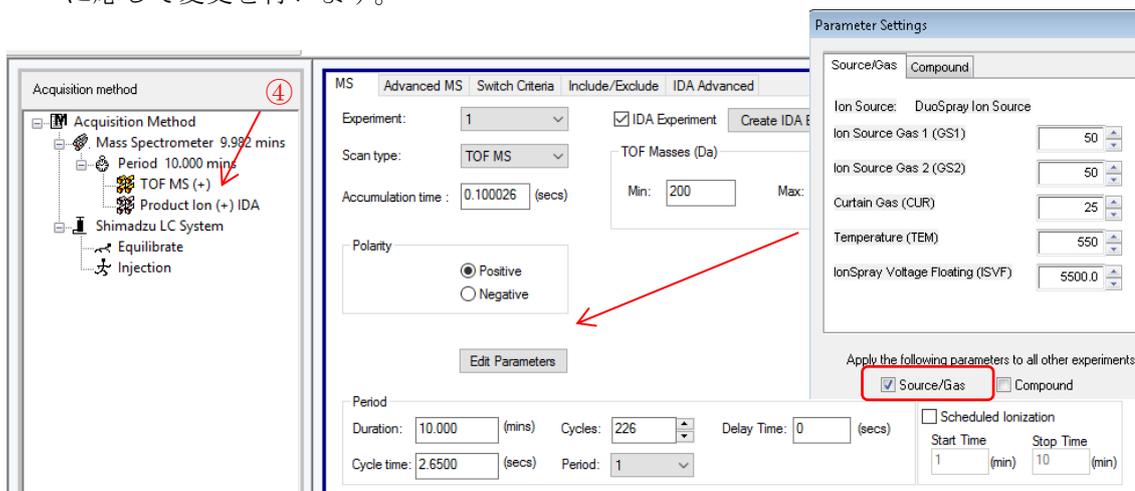


#### 4.4 Methodの確認、修正 -1 IDA

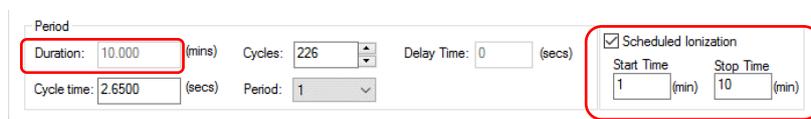
- ① Navigation Bar の Acquire をクリックし、File -> Open から目的の Method (Training では IDA) を選択します。
- ② Acquisition Method を右クリックし、Add/Remove Device Method で使用するデバイスだけにチェックをかけ、OK をクリックします。
  - \* 内蔵の Syringe Pump が必要ない場合は、必ずチェックを外してください。Training ではチェックを外してください。
- ③ Synchronization Mode を LC Sync に変更します。



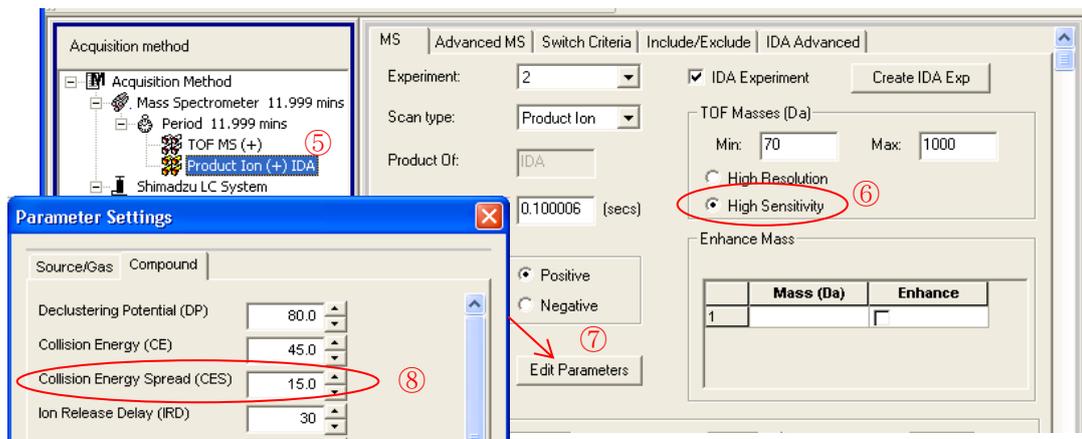
- ④ Acquisition Method の TOF MS をクリックし、親イオンの測定条件の確認、必要に応じて変更を行います。



- \* Training では変更しません。
- \* Gas など、Parameter の変更の際には Edit Parameters をクリックして、Parameter Settings 画面を開き、確認、変更ください。変更した場合、Product Ion も同条件を反映するには Apply the following... の Source/Gas にチェックを入れることで、反映されます。
- \* Scheduled Ionization を使用する場合、Stop Time が Duration (測定時間) になります。



⑤ Product Ion (+) IDA をクリックします。



⑥ MS タブで High Resolution / High Sensitive の確認、変更を行います。

\* Training では、MS タブで、High Sensitivity に変更してください。

⑦ Edit Parameters から Parameter Settings 画面を開きます。

⑧ CES に目的の値(Training では 15)を入力します。

\* Rolling Collision Energy (備考参照) を使用する場合、IDA Advanced Tab で Rolling Collision Energy にチェックをかけ使用してください。Training では使用しません。

⑨ 必要に応じて、Advance MS タブで Q1 の分解能を変更します。

\* Training では変更しません。

⑩ 必要に応じて、Switch Criteria のタブをクリックし、設定を変更します。

\* Training では変更しません。

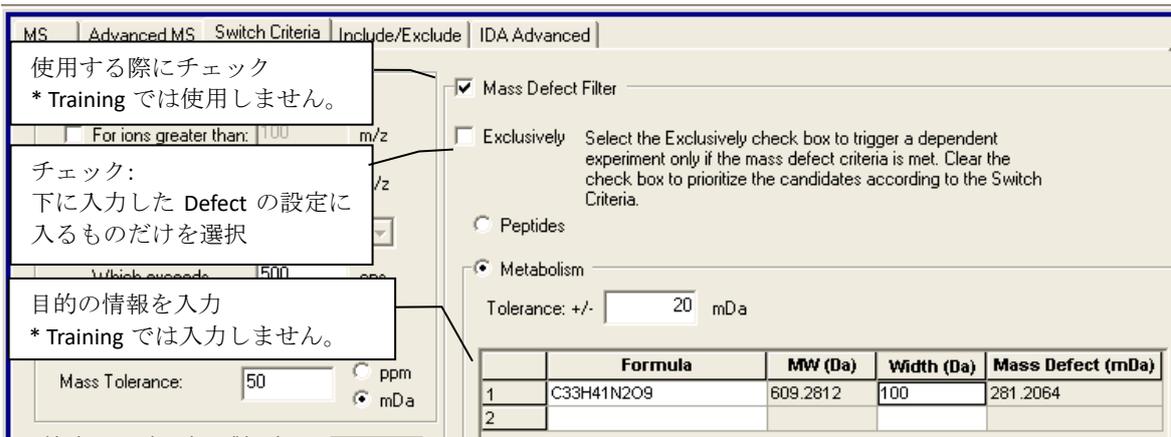
MS | Advanced MS | Switch Criteria | Include/Exclude | IDA Advanced

Survey -> IDA Experiment

- For ions greater than: 100 m/z
- For ions smaller than: 1000 m/z
- With charge state: 2 to 4
- Which exceeds: 500 cps
- Exclude isotopes within: 3 Da
- Mass Tolerance: 50 ppm / mDa
- Maximum number of candidate ions to monitor per cycle: 10
- Exclude former target ions:
  - Never
  - Always
  - For 5 seconds
  - After 2 occurrence(s)

Callout boxes:

- MS/MS を測定する親イオンの m/z の範囲
- MS/MS を測定する親イオンの価数
- MS/MS を測定する親イオンの強度の最小値
- 選択したピークについて同位体として除外する範囲(+の値)
- 選択したピークについて同じイオンとする誤差範囲
- 1 サイクルに MS/MS を測定する数
- 同じイオンを繰り返し選択させないための設定
  - Never: 常に取り続ける
  - Always: 1 度選択した後、選択しない (主に Infusion で使用)
  - For: 選択後、指定した時間の間、同じ親イオンを選択しない。
  - After # occurrence(s): 入力した回数だけ同じ親イオンを選択



⑪ 必要に応じて、Include/Exclude タブをクリックし、Include List あるいは Exclude List を編集します。

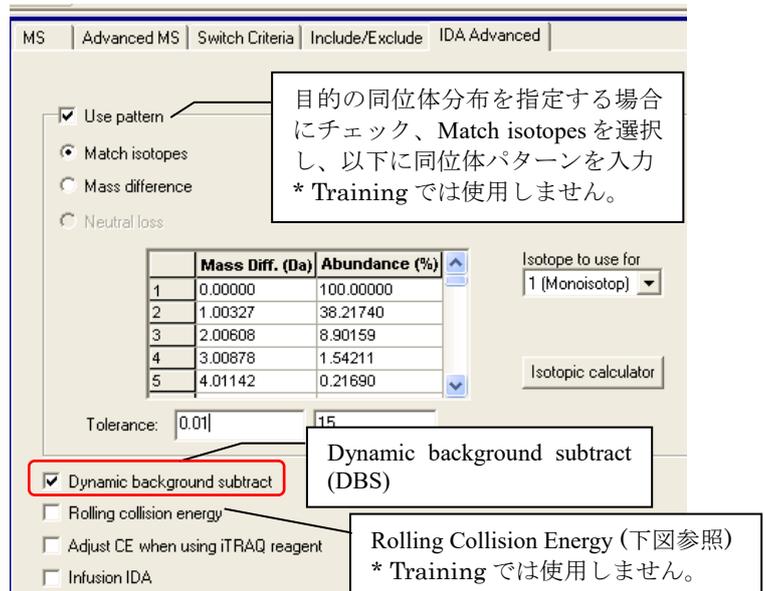
\* 詳細は 27 頁を参照ください。

\* Training では使用しません。

⑫ 必要に応じて、IDA Advanced タブで、設定を変更します。

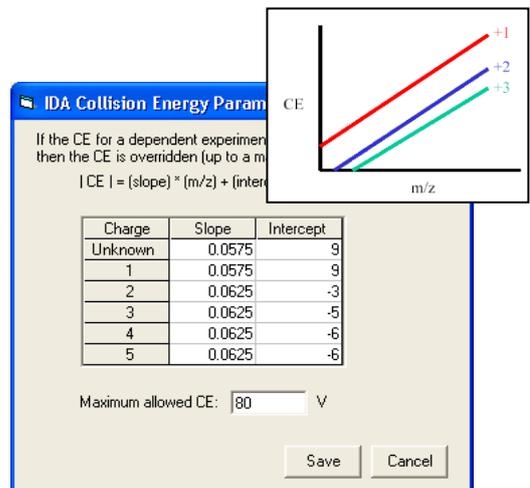
\* Rolling Collision Energy (下記参照) を使用する場合、IDA Advanced Tab で Rolling Collision Energy にチェックをかけます。Training では使用しません。

⑬ File から Save を選択し、保存します。



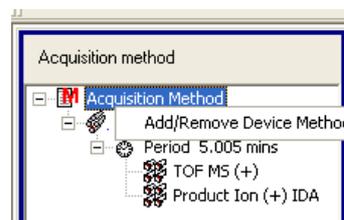
### 【Rolling Collision Energy について】

- チェックをかけることで、観測されたイオンの  $m/z$ 、価数に応じて Script Menu の IDA CE Parameters の計算式で CE が計算、使用されます。
- 計算に使用する最適な Slope、Intercept は化合物の構造などによって異なりますので必要に応じて設定を変更して下さい。設定方法の詳細につきましては、英文マニュアルをご参考ください。



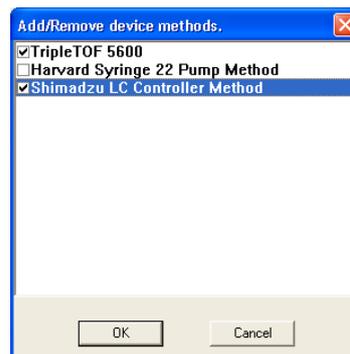
#### 4.5 LC 条件の入力、修正 -1 島津社製 HPLC、PDA なしの場合

- \* 島津社製の HPLC を使用した場合を示します。他の LC をご利用の場合は、93 ページ以降を参考ください。
- \* PDA を使用する場合、Shimadzu's AAO Module for Enhanced Analyst® HPLC Control (旧名称 MIMIC) から設定を行います。“LC 条件の追加、修正 -2 島津社製 HPLC、PDA あり”の項を参照ください。



- ① Acquisition Method を右クリックし、Add/Remove Device Method で使用するデバイスだけにチェックをかけ、OK をクリックします。

- \* 内蔵の Syringe Pump が必要ない場合は、必ずチェックを外してください。Training ではチェックを外してください。



- ② Synchronization Mode を LC Sync に変更します。

**No Sync** : 同期を行いません。

**Manual Sync** : ユーザが同期を行いません。

**Manual Sync with Valve** : 内蔵のバルブをインジェクタとして使用します。

**Injection Manifold Sync** : Injection 用の Module が Injection Position に動いた際に Start します。

**LC Sync** : LC またはその他の外部の装置と同期を行います。

- ③ Shimadzu LC System をクリックします。
- ④ Autosampler のタブをクリックし、必要に応じて Rinsing Dip Time、Rinse Mode、Cooler Temperature などを入力します。

- \* Training では以下のように設定してください。

Pumps | Detector A | Autosampler | Oven | Controller | Time Program

Model: SIL-20AC

Rack Type: Undefined Detect Rack

---

Use Autosampler

Rinsing Volume: 200 uL

Needle Stroke: 52 mm

Rinsing Speed: 35 uL/sec

Sampling Speed: 15.0 uL/sec

Purge Time: 25.0 min

Rinse Dip Time: 5 sec

Rinse Mode: Before and after aspiration

Enable Cooler Unit

Cooler Temperature: 6 °C

Control Vial Needle Stroke: 52 mm

Rinse Pump

Rinse Method: Rinse Pump Then Port

Rinse Time: 3 sec

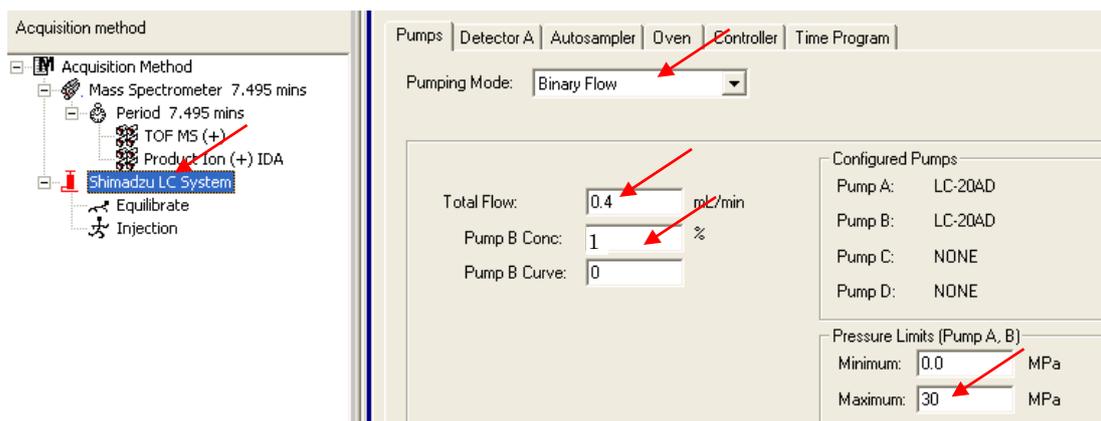
Rinse Pump が導入されている場合  
表示されます。

⑤ Oven のタブをクリックし、必要に応じて **Enable Oven** にチェックをかけ、温度を設定してください。

\* Training では 40°C に設定してください。

⑥ Pumps のタブでポンプの設定を行います。

\* Training では、Pumping Mode に **Binary Flow** を選択し、以下のように流速、Pump B の初期値、Pressure Limits を入力してください。



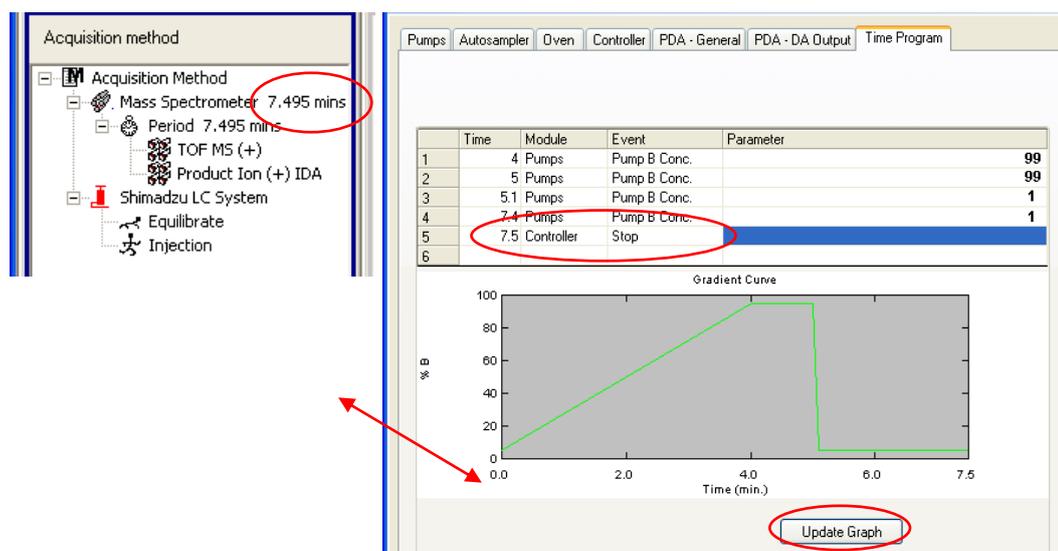
⑦ Time Program のタブをクリックし、グラジエントの条件を入力、MS の測定時間を確認します。

\* Training では、以下のように設定してください。

\* グラジエントの最後には必ず **Controller Stop** を入力して下さい。

\* 入力後、**Update Graph** をクリックすることで、Table が時間順にソートされ、下図のグラフが update されます。

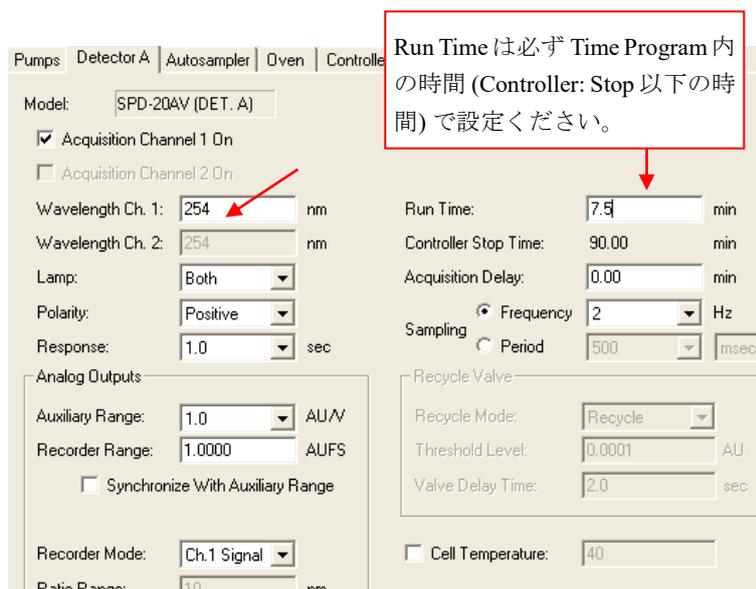
\* MS の測定時間を変更する場合は、**Mass Spectrometer** をクリックし、**Duration** に適当な値を入力してください。



⑧ Detector A のタブをクリックし、UV の設定を行い、Run Time に測定時間を入力します。

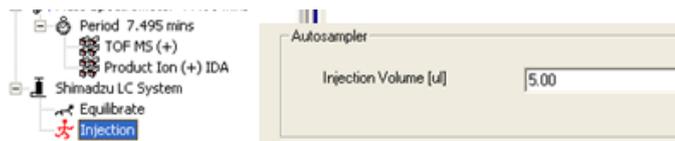
\* Run Time は必ず Time Program 内の時間 (Controller Stop 以下の時間) で設定してください。

\* Training では右図のように入力してください。



⑨ Injection をクリックし Injection Volume を入力します。

\* Training では 5 を入力してください。



⑩ Menu Bar の File から Save を選択し、Method を保存します。

#### 4.6 LC 条件の入力、修正 -2 島津社製 HPLC、PDA ありの場合

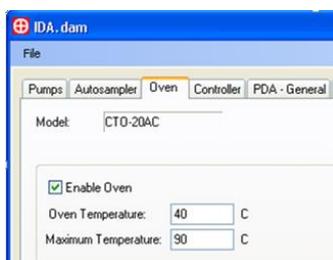
- \* Shimadzu's AAO Module for Enhanced Analyst<sup>®</sup> HPLC Control (旧名称 MIMIC) から設定を行います。
- \* PDA を使用しない場合、LC 条件の追加、修正 -1 島津社製 HPLC、PDA なしの場合を参照ください。

- ① Navigation Bar の Shimadzu Instrument driver をダブルクリックし、Shimadzu HPLC Control 画面を立ち上げ、Set Up をダブルクリックします。
- ② Method の選択画面で、目的の Method (Training では IDA) を選択して開きます。
- ③ Autosampler のタブをクリックし、必要に応じて Rinsing Dip Time、Rinse Mode、Cooler Temperature などを変更します。



- \* Training では右図のように設定してください。

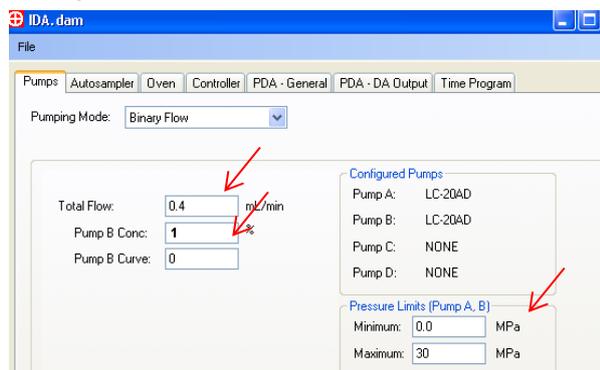
- ④ Oven のタブをクリックし、必要に応じて Enable Oven にチェックをかけ、温度を設定します。



- \* Training では使用しません。

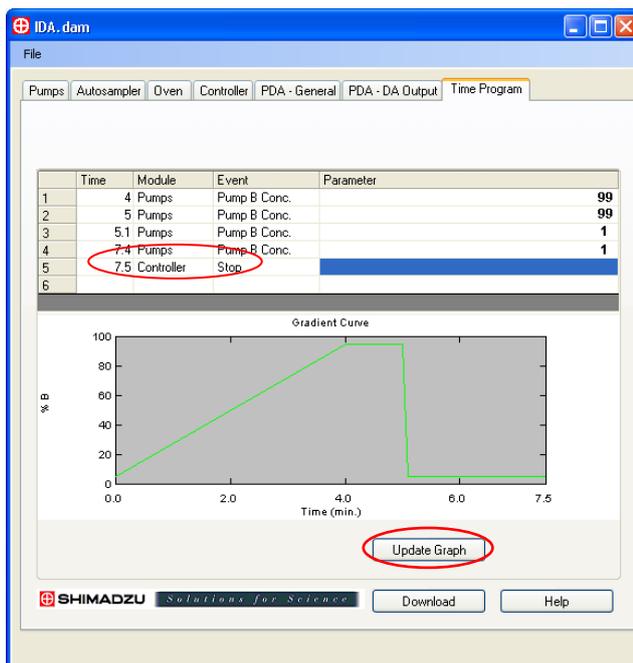
- ⑤ Pumps のタブでポンプの設定を行います。

- \* Training では、Pumping Mode に Binary Flow を選択し、右図のように流速、Pump B の初期値、Pressure Limits を入力してください。



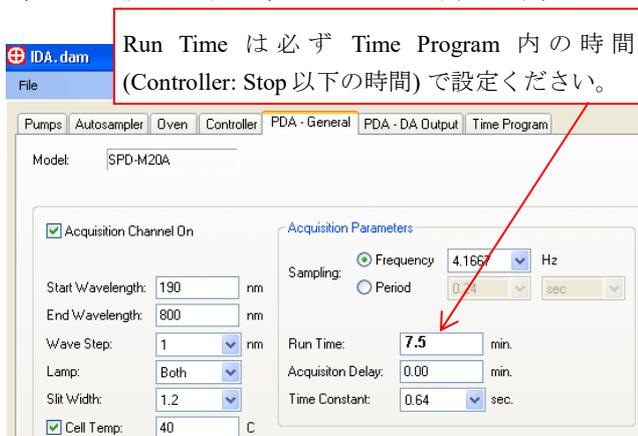
⑥ Time Program のタブをクリックし、グラジエントの条件を入力し、入力後、MS の測定時間の確認を行います。

- \* Training では右図のように入力してください。
- \* グラジエントの最後には必ず Controller Stop を入力して下さい。
- \* 入力後、Update Graph をクリックすることで、Table が時間順にソートされ、下図のグラフが update されます。
- \* MS の測定時間を変更する場合は、Mass Spectrometer をクリックし、Duration に適当な値を入力してください。



⑦ PDA-General のタブをクリックし、UV の設定を行い、Run Time に測定時間を入力します。

- \* Channel を選択し Wavelength を入力します。
- \* Training では右図のように入力してください。
- \* Run Time は必ず Time Program 内の時間 (Controller: Stop 以下の時間) で設定ください。

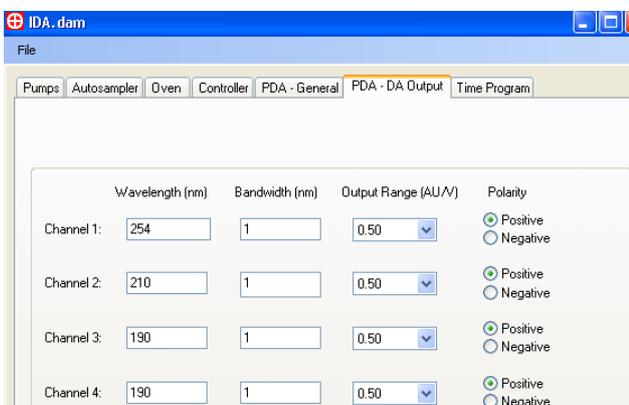


⑧ PDA-DA Output のタブをクリックし、目的の波長を入力します。

⑨ File から Save を選択し、method に LC の条件を上書きします。

⑩ File から Exit を選択し、画面を終了します。

※ Injection Volume は Batch 作成時に設定します。



## 4.7 Method の作成 -2 TOF MS-MS/MS (定量用)

- ① Navigation Bar の Method Wizard をダブルクリックします。
- ② Choose Methods タブの Choose MS Method で TOF MS + Product Ion / TOF MS + Hi Sensitivity Product Ion など、目的の Template を選択します。

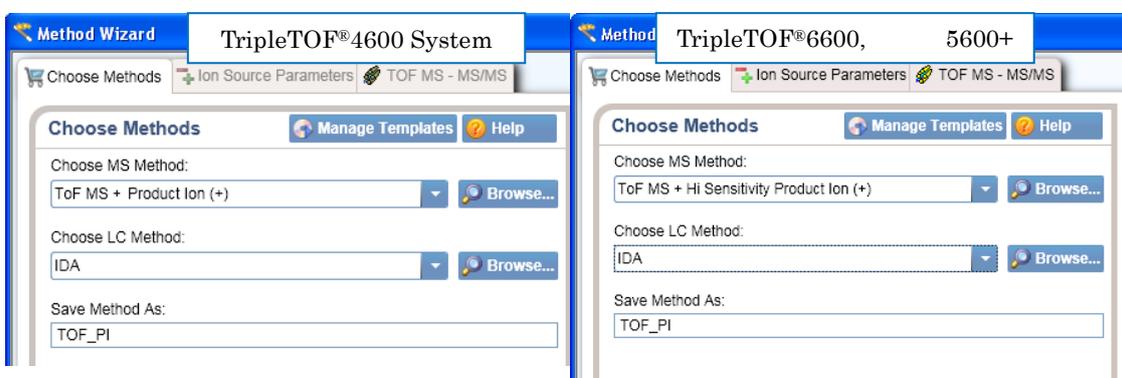
\* Training では以下のように選択してください。

TripleTOF<sup>®</sup> 4600:                      ToF MS + Product Ion (+)

TripleTOF<sup>®</sup> 6600, 5600+:              ToF MS + Hi Sensitivity Product Ion (+)

- ③ Choose LC Method で Browse...から目的の LC 条件を選択します。作成済みの LC 条件がない場合は、スキップします。

\* Training では IDA を選択してください。



- ④ Save Method AS: で保存する File 名(Training では TOF\_PI)を入力後、Enter します。

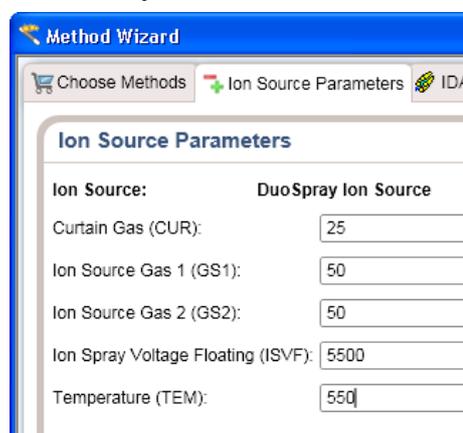
- ⑤ Next をクリックします。

- ⑥ Ion Source Parameters タブで適当な parameter を入力し、Next をクリックします。

\* 以下の Table を参考に入力します。高感度化が必要な場合は、別途最適化し、最適値を入力してください。

※ Training では標準の数値の以下を入力してください。

Curtain Gas (CUR):	25
Ion Source Gas1 (GS1):	50
Ion Source Gas2 (GS2):	50
IonSpray Voltage Floating (ISVF):	
• Positive:	5500
• Negative:	-4500
Temperature (TEM):	550



- ⑦ TOF MS – MS/MS タブで parameter および目的の親イオン、CE、CES の値を入力し、Finish をクリックして保存します。

※ Training では下図のように入力してください。

親イオンの測定レンジ

親イオンの積算時間

MS/MS の測定レンジ

各 MS/MS の積算時間

1 Cycle の測定時間 (自動計算)

測定時間

Tips: Cycle Time を見ながら、MS/MS の数と積算時間を調整します。

親イオン、CE、CES の順に入力。Copy/Paste 可能

Product of m/z (Da)	Collision Energy (V)	Collision Energy Spread (V)
146.11756	45	15
266.15981	45	15
315.16225	45	15
354.21224	45	15
442.26467	45	15
609.28066	45	15
618.36953	45	15
922.0098	45	15
*		

- ⑧ 必要に応じて、Method の確認、修正、LC 条件の修正、測定の準備を行ってください。

\* Training では行いません。

Acquisition method

Acquisition Method

- Mass Spectrometer 7.499 mins
  - TOF MS (+)
    - Product Ion (+) 146.1
    - Product Ion (+) 266.2
    - Product Ion (+) 315.2
    - Product Ion (+) 354.2
    - Product Ion (+) 442.3
    - Product Ion (+) 609.3
    - Product Ion (+) 618.4
    - Product Ion (+) 922.0

MS Advanced MS

Experiment: 2

Scan type: Product Ion

Product Of: 146.11756 (Da)

Accumulation time: 0.050003 (secs)

Polarity: Positive

IDA Experiment: Create IDA Exp

TOF Masses (Da): Min: 70 Max: 1000

High Resolution

High Sensitivity

Enhance Mass

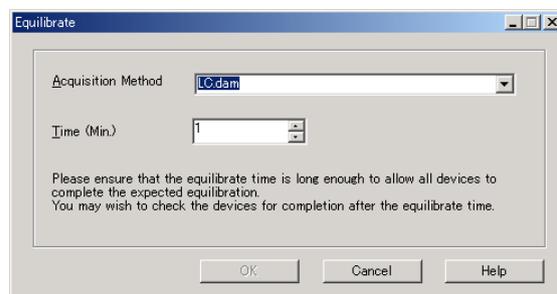
	Mass (Da)	Enhance
1		

- ⑨ Batch を作成し、測定を行います。

\* Training では測定しません。

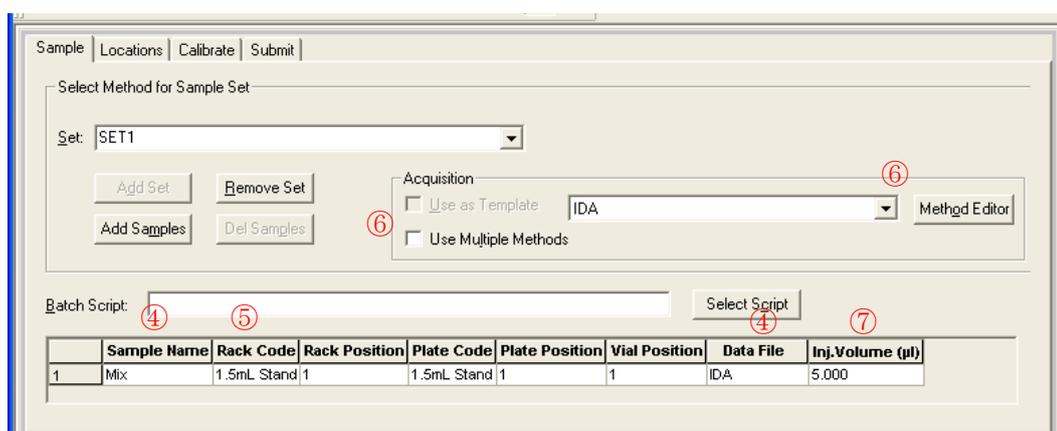
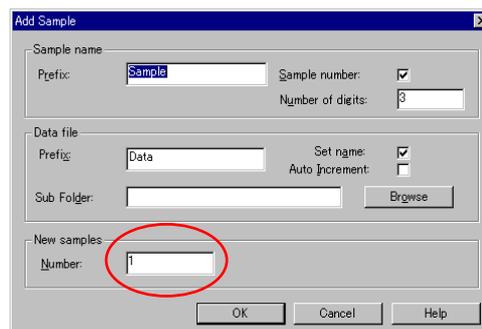
## 4.8 測定の準備

- ① 装置の平衡化します。Tool Bar の  をクリックし Q Manager の画面を開き、次に Tool Bar の  をクリックしてください。
- ② 右下のアイコン  が緑色の場合は  をクリックし、黄色にした後  をクリックしてください。
- ③ Equilibrate の画面で、使用する Method (Training では IDA.dam)、平衡化時間 (Training では 1) を選択し OK をクリックします。
- ④ Exsion LC 使用の場合、画面右下の  をダブルクリックし、開いた Window で初期条件を入力し、Ready にします。
- ⑤ LC の溶媒が流れ、ガスやターボガスの加熱が始まります。1 分後に画面右下の MS などの表示が黄色から緑色に変わります。



## 4.9 Batch の作成

- ① Navigation Bar の Build Acquisition Batch をダブルクリックします。
- ② Add Set、Add Sample の順にクリックします。
- ③ New samples に測定するサンプルの数を入力し (Training では 1)、OK をクリックします。
- ④ 表が作成されますので Sample Name、Data File を入力します。  
※ Training ではそれぞれ Mix、IDA と入力してください。



- \* 複数データを取得する場合、Data File 名は同じにせず別名で保存してください。同一名で保存し、データファイルのサイズが **2GB** を超えた場合、解析ができない場合があります。

- \* 特殊文字 (スペース+ - \* . , @ # % & ^) の使用は推奨していません。Software によって Data が開かないなど、不具合が起きる場合があります。使用されないことを強く推奨します。以下にも類似の例がありますのでご参照ください。

<https://support.microsoft.com/ja-jp/kb/826763>

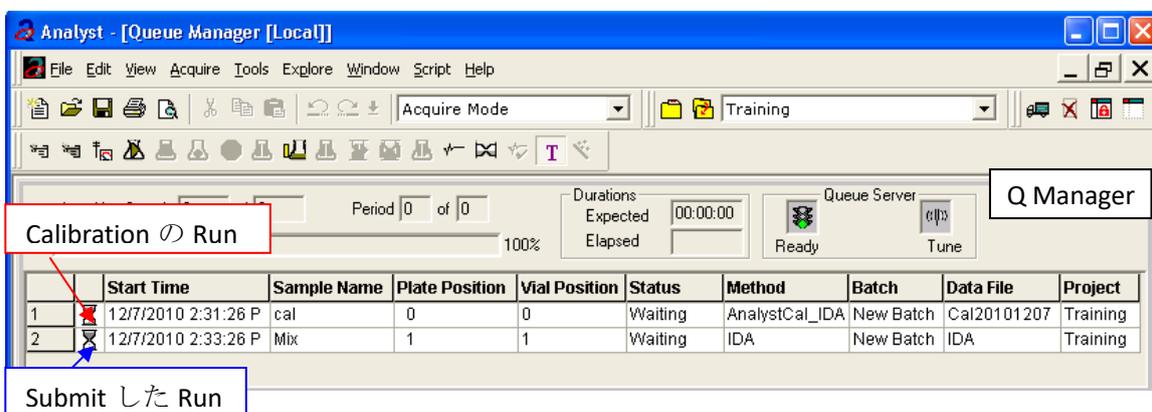
- \* File 名以外は測定後変更ができません。
  - \* Batch 上で右クリックし、Hide/Show から Comment にチェックすることで、Comment カラムが表示され、カラムや溶媒などの情報を入力、保存することができます。入力した内容は測定後変更できませんのでご注意ください。
- ⑤ Rack Code が使用しているラックであることを確認し、Vial Position に sample のポジションを入力します。
- ⑥ Acquisition の Method Editor のプルダウンから、作成した Method (Training では IDA) を選択します。
- \* サンプルごとに測定 Method を変更する場合は、Use Multiple Methods にチェックをかけ、Acquisition Method のカラムを表示させます。表示させたカラムで個々に Method を選択してください。
- ⑦ Shimadzu's AAO Module for Enhanced Analyst® HPLC Control を使用している場合 (PDA 使用の場合) は、Injection 量を入力します。
- \* 他の LC については、Acquisition Method 内で指定した数値が反映されます。カラム内の Injection Volume を変更することで、Injection 量を変更することも可能です。
- ⑧ 必要に応じて、Calibrate のタブで、Auto Calibration にチェックをかけ、条件を入力、設定します。

- \* Training では右図のように入力、選択してください。

- \* Auto Calibration の平衡化では、自動で Refill の動作を行います。
  - \* バッチの途中で CDS 溶液のボトルが切り替わる際には、自動で Purge の動作を行います。
- ⑨ 必要に応じて File -> Save As... から Batch を保存します。
- \* Training では File Name: IDA で保存してください。

#### 4.10 Batch を使用した測定

- ① サンプルを Vial Position で入力したポジションにセットします。
  - ② Submit のタブをクリックし、Submit ボタンをクリックします。
- \* 連続分析中はこの操作で、Submit した順に自動で測定が行われます。



- ③ 状況を確認する場合は、Tool Bar の をクリックし Q Manager を表示します。
  - ④ 上記のように で待機している場合は、Tool Bar の のアイコンをクリックして、 に切り替え後、Tool Bar の (Start Sample) をクリックして Calibration、測定を開始してください。
- \* この際 Do you want to... のエラーメッセージが表示されます。Tune Mode で使用していた Method を保存する場合は Yes で保存、必要のない場合は No でメッセージを抜けてください。
- \* Training では No を選択してください。
- \* Calibration は、CDS が必要な Refill を行った後開始します。2分程度かかります。
- \* Cal の左に緑のチェックが入り、成功したことを確認してください。
- \* 赤×の場合は Calibration に失敗しています。トラブル対応の項を参考ください。
- \* 測定中の Data は Analyst の Explore Mode で確認することができます。リアルタイムのスペクトルを表示させるには TIC 上で表示が進んでいるクロマトグラムの先端よりも先の部分（まだ表示がされていない部分）にカーソルを持っていきダブルクリックしてください。

#### 4.11 測定の終了

- ① Navigation Bar の Acquire をクリック後、Tool Bar の , の順にクリックして装置を Standby にします。
- ② LC の接続を外します。
- ③ 必要に応じて「[2.5 測定の終了、流路の洗浄](#)」を参考に Tune Mode で流路を洗浄してください

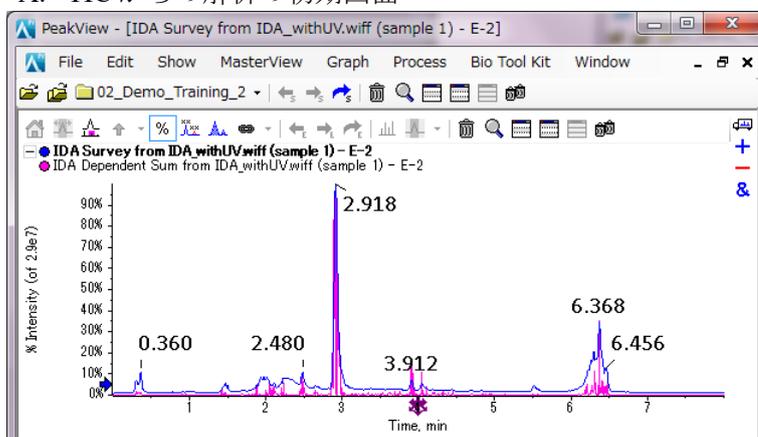
# データ解析 (LC-MS, PeakView® Software)

## 5 データ解析 (LC-MS, PeakView® Software)

### 【データの表示方法について】

- TIC から、IDA Explore から の 2 種類 の Data の 開 き 方 が あり ます。
- IDA Explorer は IDA で 取 得 し た Data 用 の 解 析 手 法 に な り ます。SWATH など、他 の 測 定 方 法 に つ い て は、対 応 し て い ませ ん。
- ど ち ら の 方 法 か ら も 他 の 解 析 画 面 を 開 く こ と が で き ます。

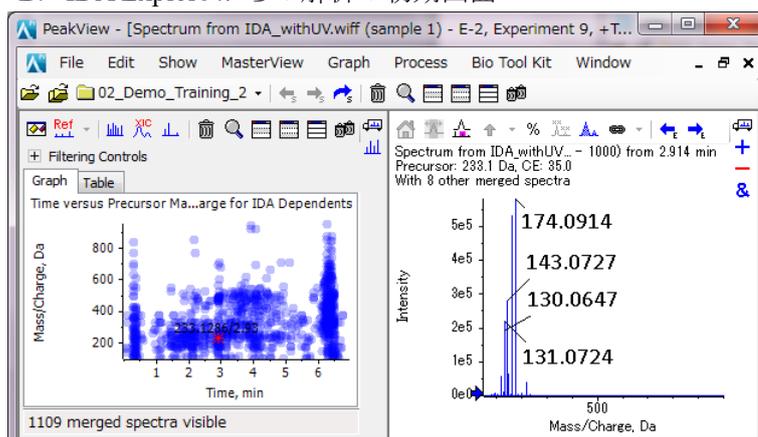
#### A. TIC からの解析の初期画面



\* すべての測定方法方法  
に対応しています。

\* 初期画面は使用した  
全測定 Method の TIC の  
重ね書きになります。

#### B. IDA Explore からの解析の初期画面



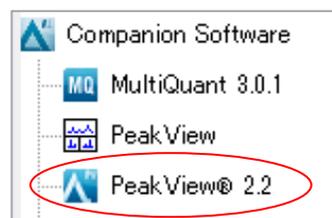
\* IDA で取得した Data  
用の解析手法になりま  
す。

\* スペクトルの確認か  
ら構造解析、類縁体検  
索など、様々な解析を  
容易に行うことができ  
ます。

- 複数の Data を同時に解析する (Open Multiple Wiff Samples...), File 名や File 内 の Sample Name や Sample Info. から 目的 の データ ファイル を 検 索 する (Find Wiff Samples) こ と も 可 能 です。
- PeakView® Software の 詳 細 な 説 明 に つ き ま し て は、ユ ー ザ ー マ ニ ュ ア ル (日 本 文、英 文)、Reference Guide (英 文) を 参 考 考 だ さ い。
- 英 文 の 資 料 に つ き ま し て は、PeakView® Software の Help から 参 照 する こ と が 可 能 です。

## 5.1 PeakView® Software の起動

Analyst の Navigation Bar の PeakView® 2.2、あるいは、Desktop のショートカットをダブルクリックし、PeakView® Software を立ち上げます。



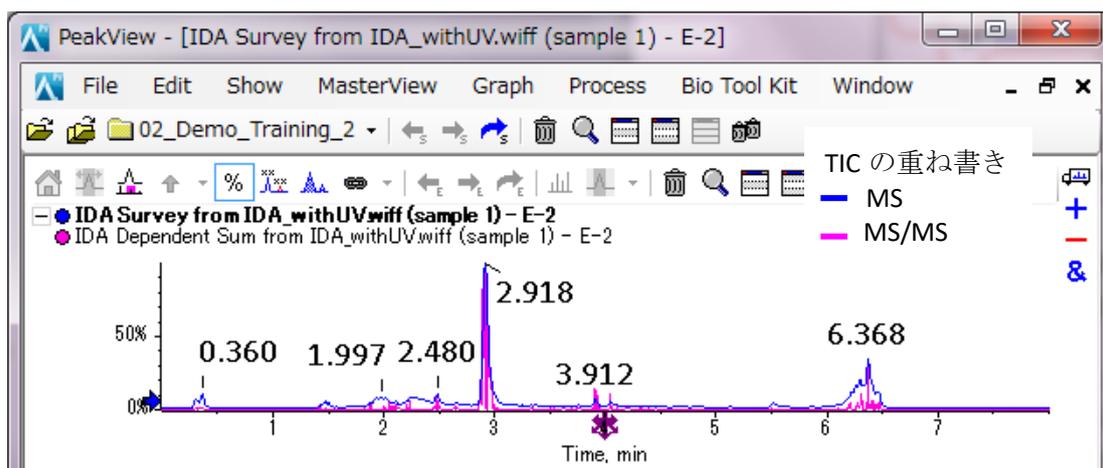
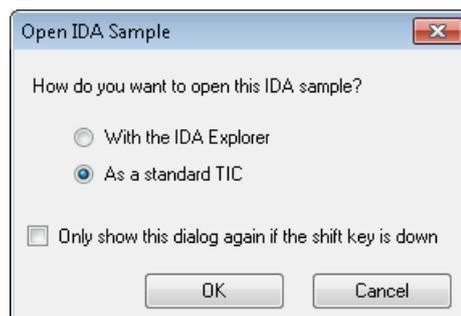
## 5.2 TIC からの解析

① Tool Bar の  アイコンあるいは File Menu の Open Wiff Sample... から目的の File を選択します。

\* Training では TT\_Training Project の 01\_Training フォルダ内の IDA\_withUV を選択してください。

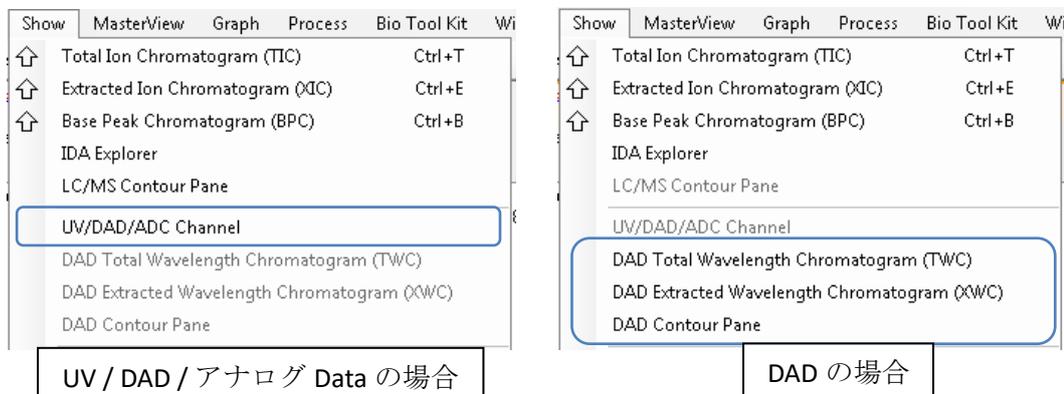
② TIC から開く (As a standard TIC) を選択し、OK をクリックします。

\* MS と MS/MS の TIC の重ね書きが表示されます。



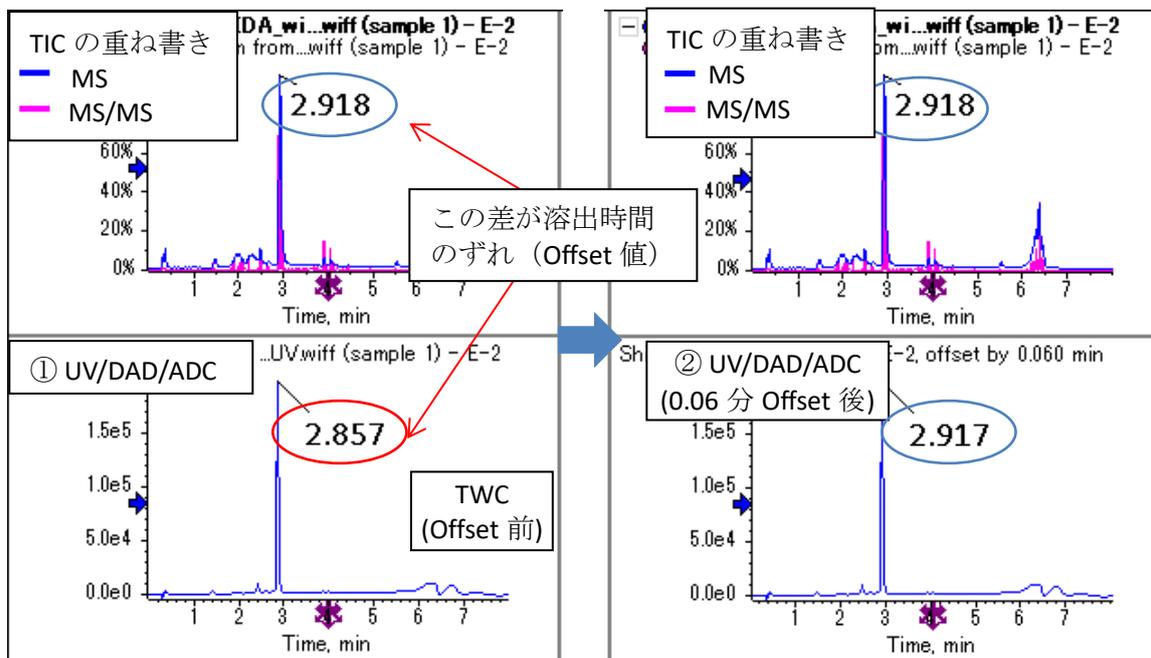
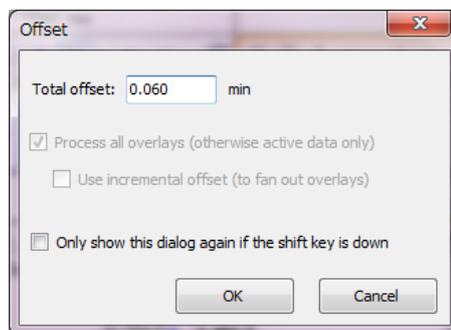
### 5.3 UV/DAD / アナログ Data の表示とアライメント

① Tool Bar の Show から目的の表示を選択することで表示されます。



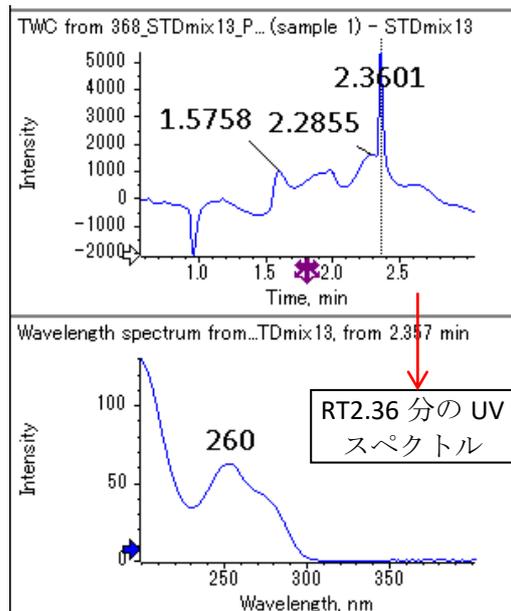
- \* Data により画面が変わります。
- \* Training の Data は UV の Data になります。UV/DAD/ADC Channel を選択してください。

② 表示されたクロマトグラム (Training では UV/DAD/ADC Channel) を選択 (画面をクリック) し、Tool Bar の Process から Offset Chromatogram を選択し、Offset 画面 (右) で溶出時間のずれ (例では 0.06 分) の数値を入力します。



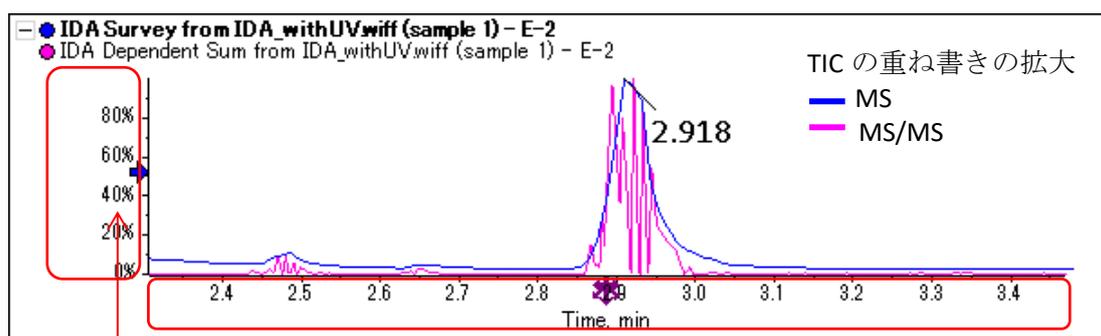
### 【DADのDataからのUVスペクトルの確認についてと注意】

- \* DAD で取得した Data からは UV スペクトルを確認することができます。
- \* Offset を行っていない TWC あるいは XWC 上で目的の Peak をダブルクリックすることで UV スペクトルが表示されます。
- \* 必要に応じて、MS と同様に Background を引くなどの解析を行ってください。
- \* 右の Data は Training の Data と異なります。



### 5.4 Pane を隠す、削除する、全画面にする、拡大する

- ① 目的の Pane を選択後、画面上部にある Tool Bar から目的のアイコン（左から、削除する、全画面表示する、選択した Pane を隠す、選択した Pane 以外を削除する）を選択してください。
  - ② 拡大する時は軸のエリアをドラッグ、全範囲に戻る場合は軸のエリアをダブルクリックします。
- \* Training では UV を隠し、TIC のみにした後、以下のように、3 分付近を拡大してください。



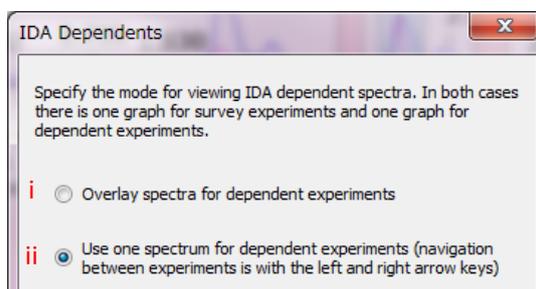
拡大する時は軸のエリアをドラッグします。  
全範囲に戻る場合は軸のエリアをダブルクリックします。

## 5.5 スペクトルの表示

\* IDA の Data について、クロマトグラムからの解析には2種類あります。

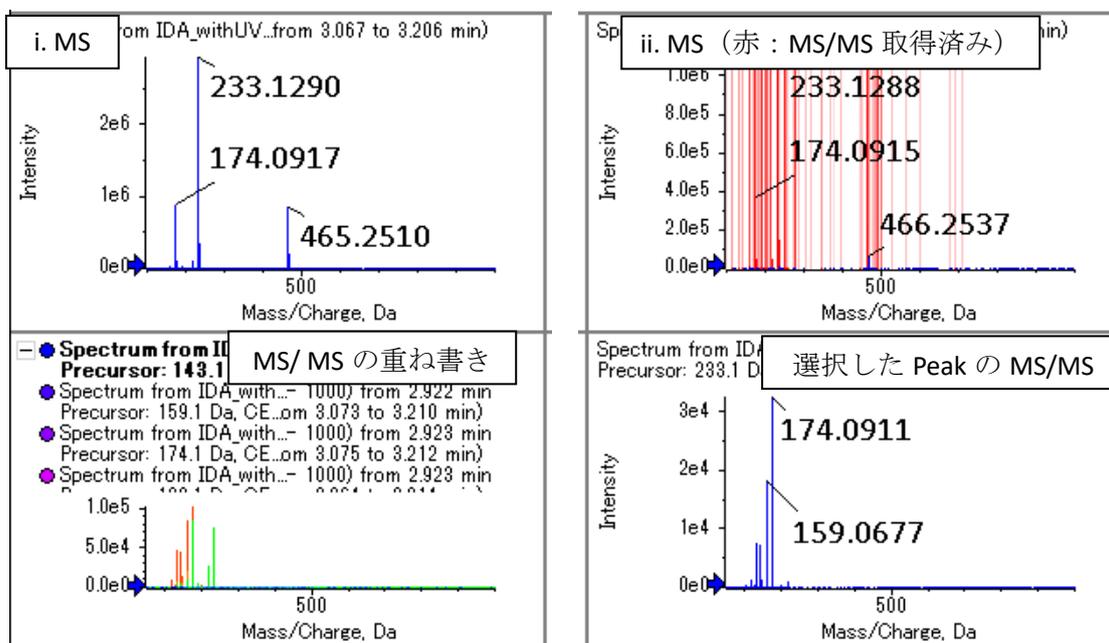
i. 重ね書きする : Overlay spectra...

選択した時間内の IDA のサイクルに含まれる MS/MS がすべて重ね書きで表示されます。異なる時間に測定された同じ Experiment のスペクトルが平均される可能性がありますので、範囲指定はせず、1点で解析ください。



ii. 重ね書きしない : Use one spectrum...

MS 上で、MS/MS 取得済みの Peak が赤でハイライトされます。目的の Peak をクリックすることで、その MS/MS が表示されます。



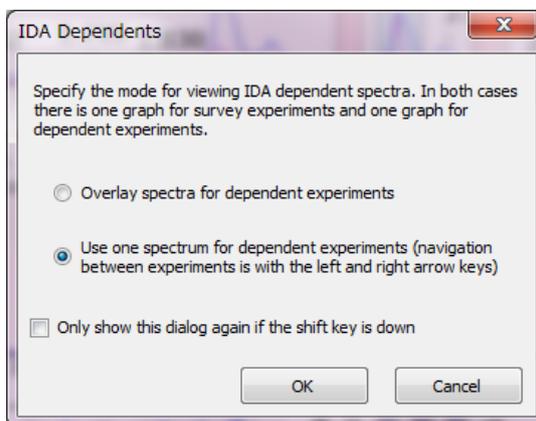
① 目的のクロマトグラム上の目的の時間あるいは範囲を選択、ダブルクリックします。

\* Training では下図を参考に TIC 上の適当な範囲を選択、ダブルクリックしてください。

② 右の画面が表示されますので、目的の表示を選択、OK します。

\* Training では Use... を選択してください。

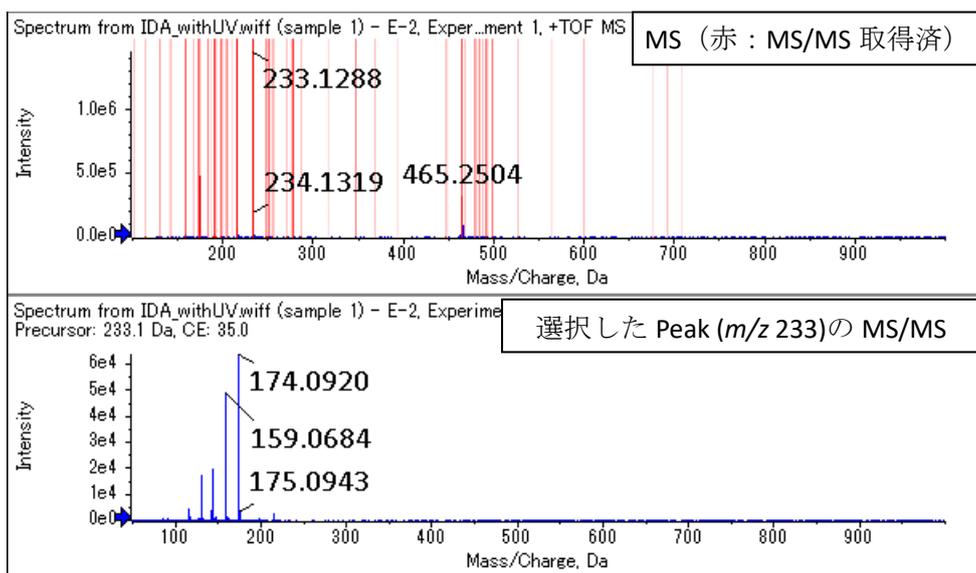
\* 画面下に  の表示がないクロマトグラムから解析を行った場合は、右の画面は表示されません。



③ 表示された MS 上で目的の Peak をクリックして MS/MS を表示します。

\* 以下では  $m/z$  233 の MS/MS を表示しています。適当な Peak をクリックして確認してください。

\* 赤のハイライトを消した MS が必要な場合は、MS を選択 (クリック) し、Tool Bar の Graph から Duplicate Graph を選択することで、ハイライトのない MS が複製されます。

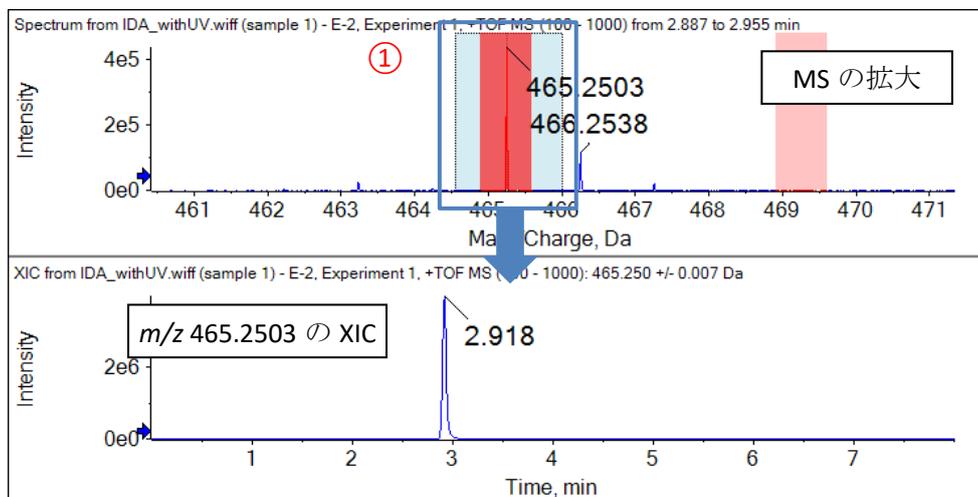


## 5.6 スペクトルからのマスクロマトグラム(XIC)の表示

\* Training では MS/MS を削除してください。

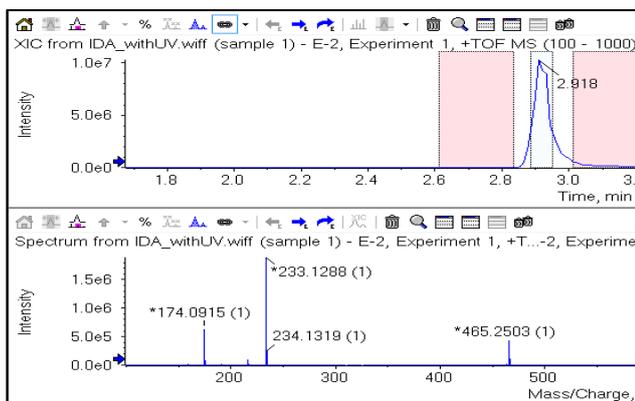
① MS 上で目的のイオンを選択、ダブルクリックすると XIC が表示されます。

\* 以下では  $m/z$  465 の XIC を表示しています。適当なイオンをダブルクリックして確認してください。



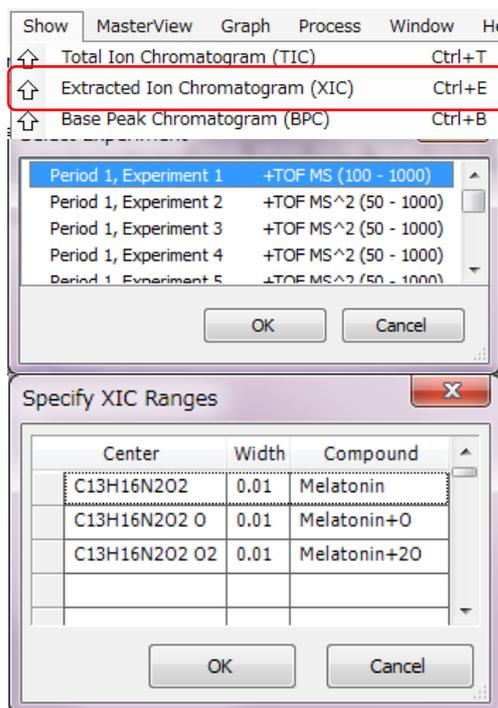
## 5.7 Background の指定、差引

- ① Background に指定する部分を選択します。
  - \* 2 か所選択する場合はシフトキーを押しながら選択してください。
- ② 選択後、画面上部の  をクリックすることで、ハイライトがブルーからピンクに変わります。
  - \* 以降の解析で Background として解析するスペクトルから差し引かれます。

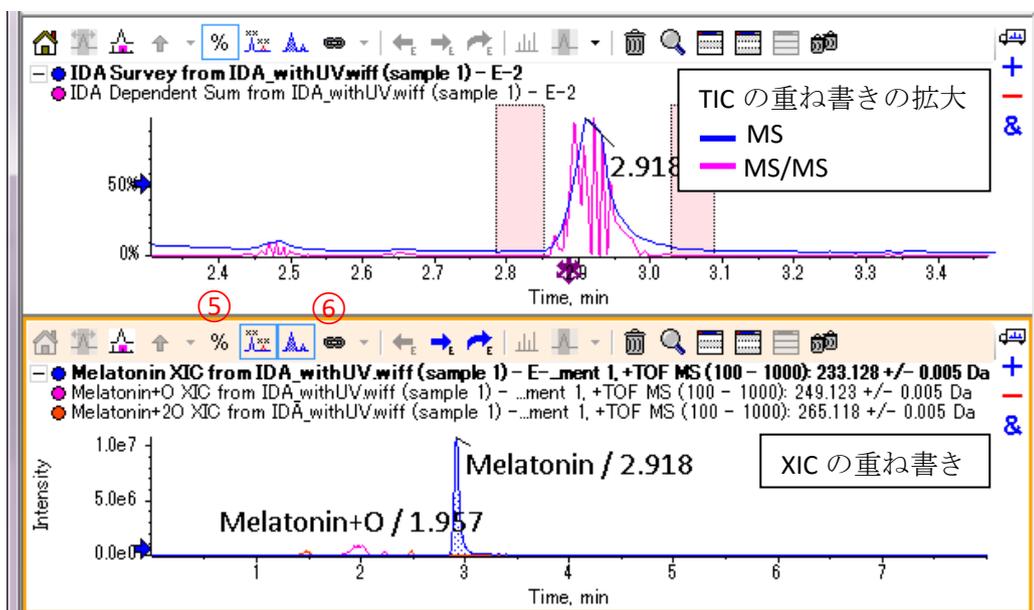


## 5.8 クロマトグラムからのマスクロマトグラム (XIC) の表示、ラベル、ハイライト

- \* Training では MS、XIC を削除し、TIC のみ表示させてください。
- ① Tool Bar の Show から Extracted Ion Chromatogram (XIC) を選択します。
  - ② Select Experiment 画面で目的の測定 (Training では 1 番上の TOF MS) を選択し、OK をクリックします。
    - \* Precursor Ion (親イオン) の場合は 1 番上の TOF MS を選択します。
    - \* 画面下に  の表示がないクロマトグラムから解析を行った場合は、右の画面は表示されません。
  - ③ 入力画面で目的の組成式あるいは  $m/z$ 、Width (Da)、化合物名を入力します。
    - \* 組成式を入力した場合、自動で Positive:  $[M+H]^+$ 、Negative:  $[M-H]$  が計算されます。
    - \* Training では右のように入力してください。
  - ④ OK をクリックすることで、XIC が重ね書き表示されます。
  - ⑤ XIC 上部の  アイコンをクリックすることで、各 XIC の Peak に化合物名が表示されます。

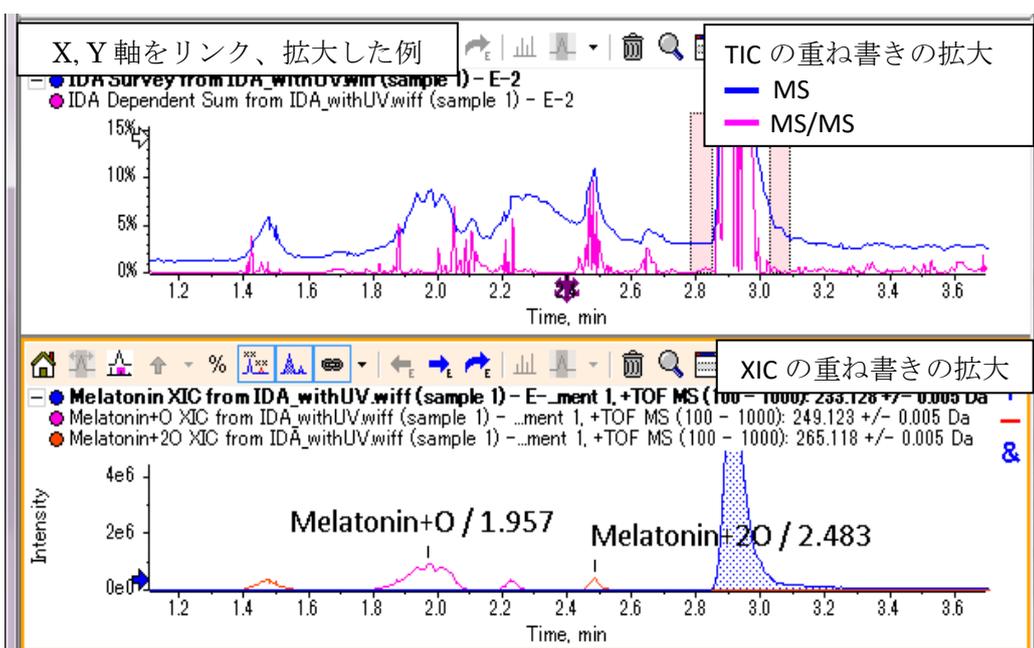


- ⑥ XIC 上部の  アイコンをクリックすることで、選択した XIC（タイトルが太字で表記されているもの）が塗りつぶされます。



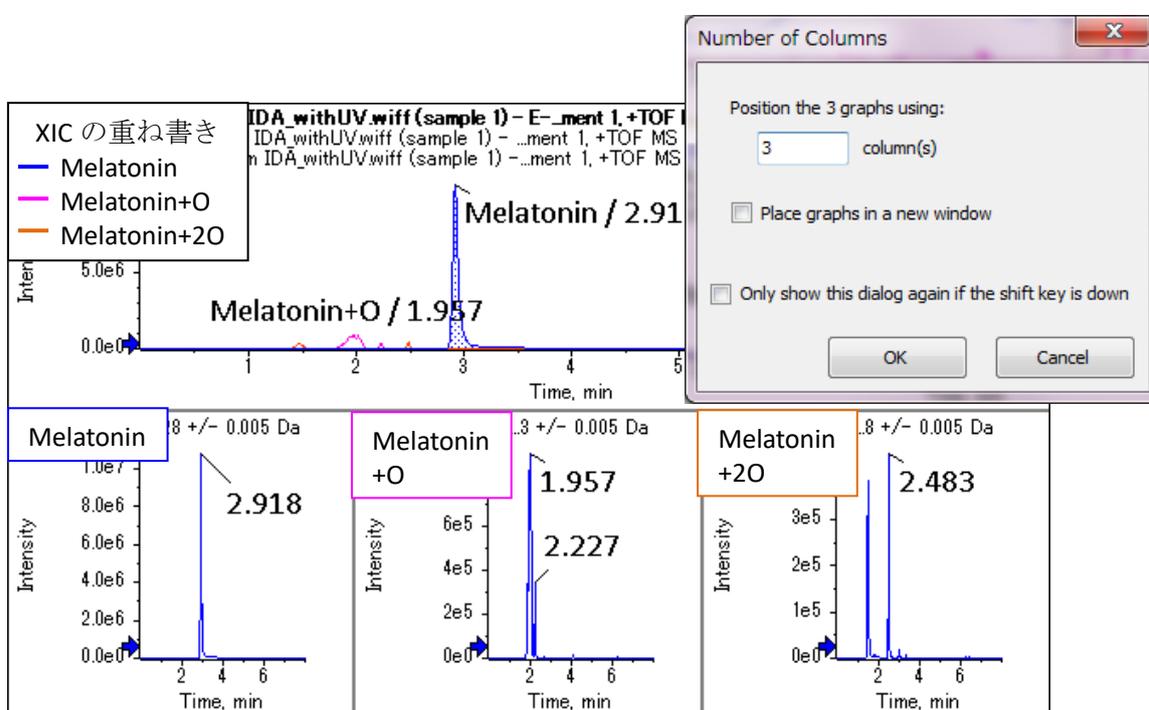
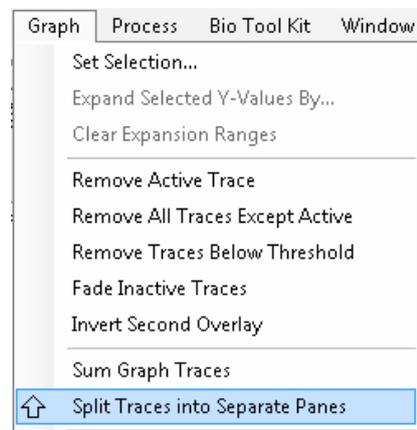
## 5.9 軸のリンク

- ① 軸のリンクを行いたいクロマトグラム上部の  アイコンをクリックすることで、X 軸がリンクされます。
- ② Y 軸をリンクする場合は、 アイコンの右側の ▼ から Link Y-Axes を選択してください。



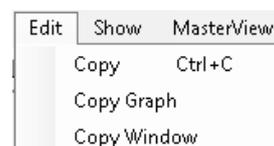
## 5.10 重ね書きした Pane (クロマトグラム、スペクトル) の分離

- ① 目的の Pane (Training では XIC の重ね書き) を選択します。
- ② Tool Bar の Graph から Split Traces into Separate Panes を選択します。
- ③ Number of Columns の画面で、分割後横に並べる Pane の数 (Training では 3) を指定します。
- ④ OK をクリックすることで、分割されます。



## 5.11 画面のコピー

- ① 目的の Pane を選択します。
  - ② Tool Bar から、Edit を選択し、以下を参考に目的の Copy の種類を選択します。
    - Copy: 選択した Pane の Data (画像、リスト) を Copy します。
    - Copy Graph: 選択した Pane の画像を Copy します。
    - Copy Window: 選択した Pane を含む Window 全体を Copy します。
- \* ペイントや pot ファイル等にペースト可能です。
- \* Training では行いません。

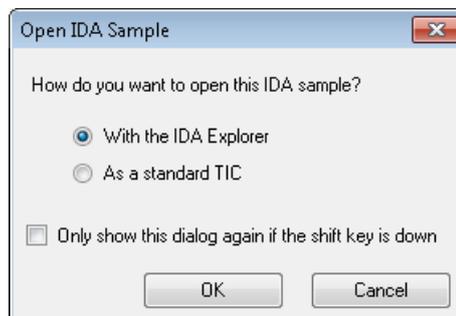


## 5.12 IDA Explorer からの解析

IDA で取得した Data について、スペクトルの確認から構造解析、類縁体検索など、様々な解析を容易に行うことができます。

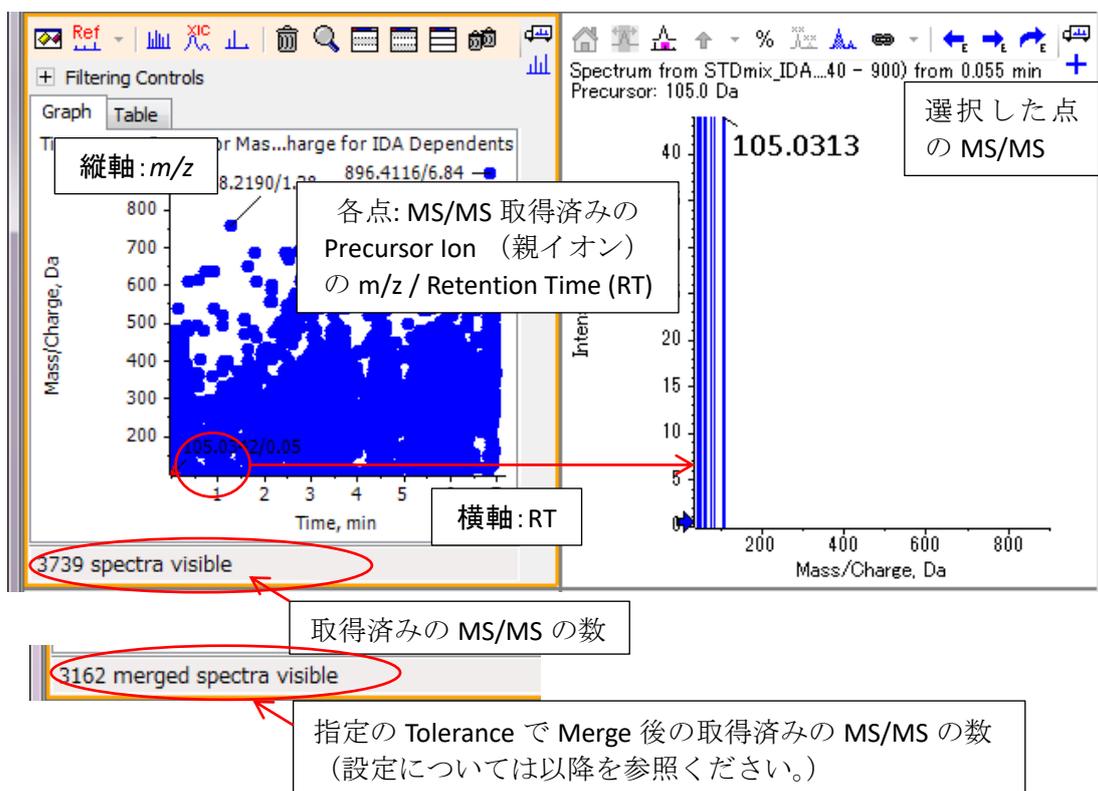
- ① Tool Bar の  アイコンあるいは File Menu の Open Wiff Sample... から目的の File を選択します。

\* Training では、Training で測定した IDA あるいは、TT\_Training Project の 01\_Training フォルダ内の STDmix\_IDA を選択してください。



- ② With the IDA Explorer を選択し、OK をクリックします。

\* 以下の形式の初期画面が開きます。

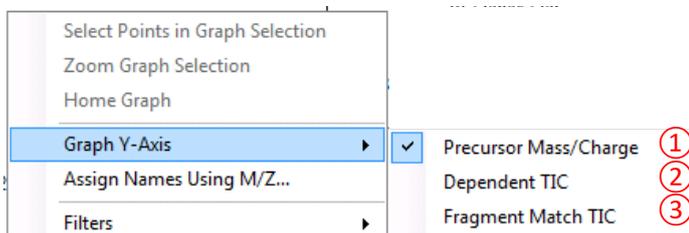


### 5.12.1 縦軸の切り替え、リスト表示

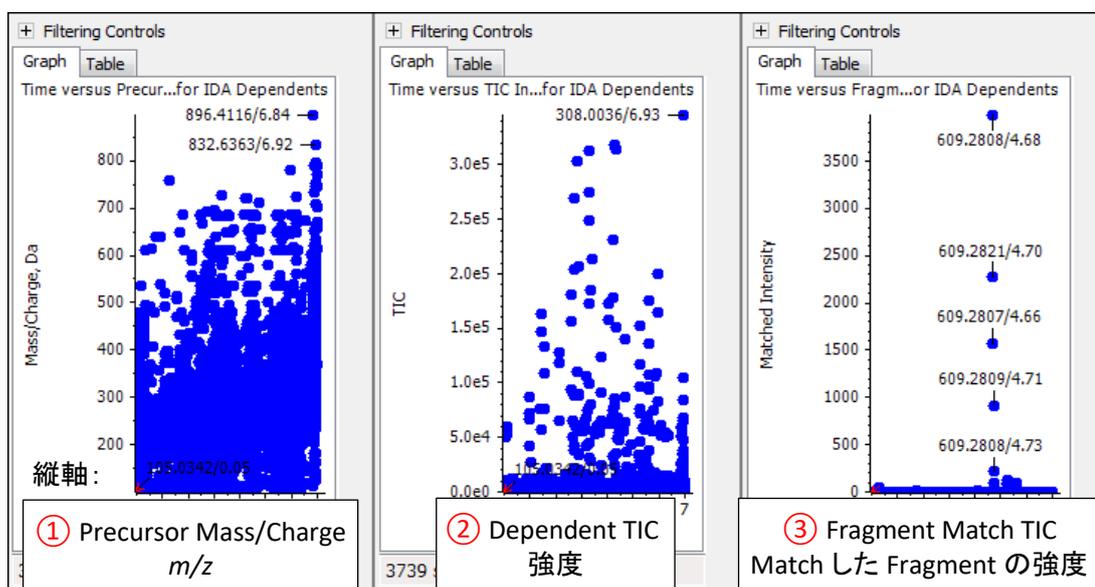
目的に応じ、Graphの縦軸を切り替える、リスト表示にすることが可能です。

#### 縦軸の切り替え

画面上を右クリックし、Graph Y-Axisから目的の縦軸を選択します。



- \* Fragment Match TIC は後述の Fragment Matching 使用時に使用できます。
- \* Training では②Dependent TIC (強度) に変更してください。



### 5.12.2 Table 表示

画面上部の Table Tab を選択することで表示されます。

- \* Training では Graph の Tab をクリックし、②Dependent TIC (強度) にしてください。
- \* Table の各項目をクリックすることでソートすることができます。

Table の項目名をクリックすることで、ソートされます。

Index	Time	m/z	Mass Defect	TIC	
1	0.06	102.0123	0.0123	2.3e3	1
2	0.07	117.9323	0.9323	7.5e2	1
3	0.07	144.9815	0.9815	2.4e3	1
4	0.07	157.0828	0.0828	9.1e2	1
5	0.07	163.1312	0.1312	6.0e3	1
6	0.07	182.1897	0.1897	2.3e3	1
7	0.07	224.1271	0.1271	1.7e3	1
8	0.08	250.1186	0.1186	1.2e3	1
9	0.08	257.2457	0.2457	1.2e3	1

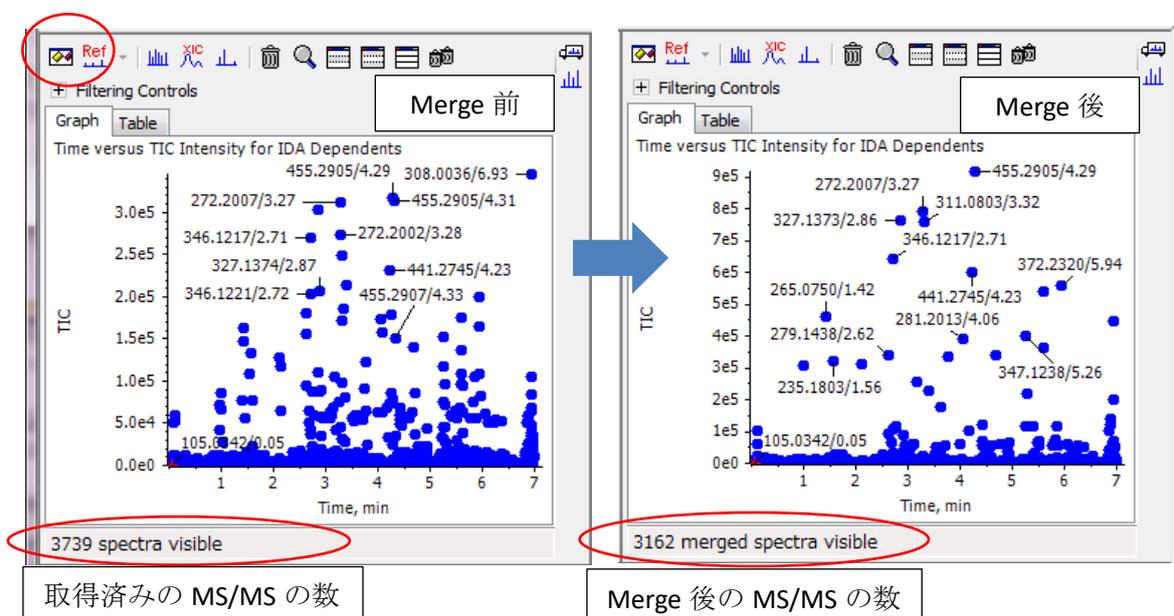
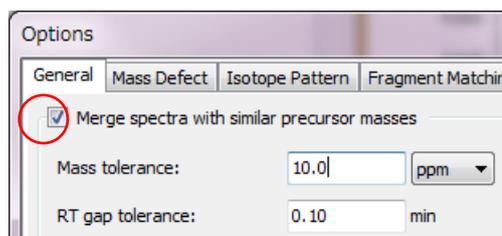
### 5.12.3 スペクトルの統合 (Merge)

- \* 指定の  $m/z$ , RT の Tolerance 内の Peak について、積算して表示します。
- \* 解析が容易になり、より質のよい MS/MS が得られる可能性があります。
- \* 前の解析時の設定が保存されます。LC 条件の変更後など、必要に応じて確認してください。

① 画面左上の  アイコンで Options (右下) を開きます。

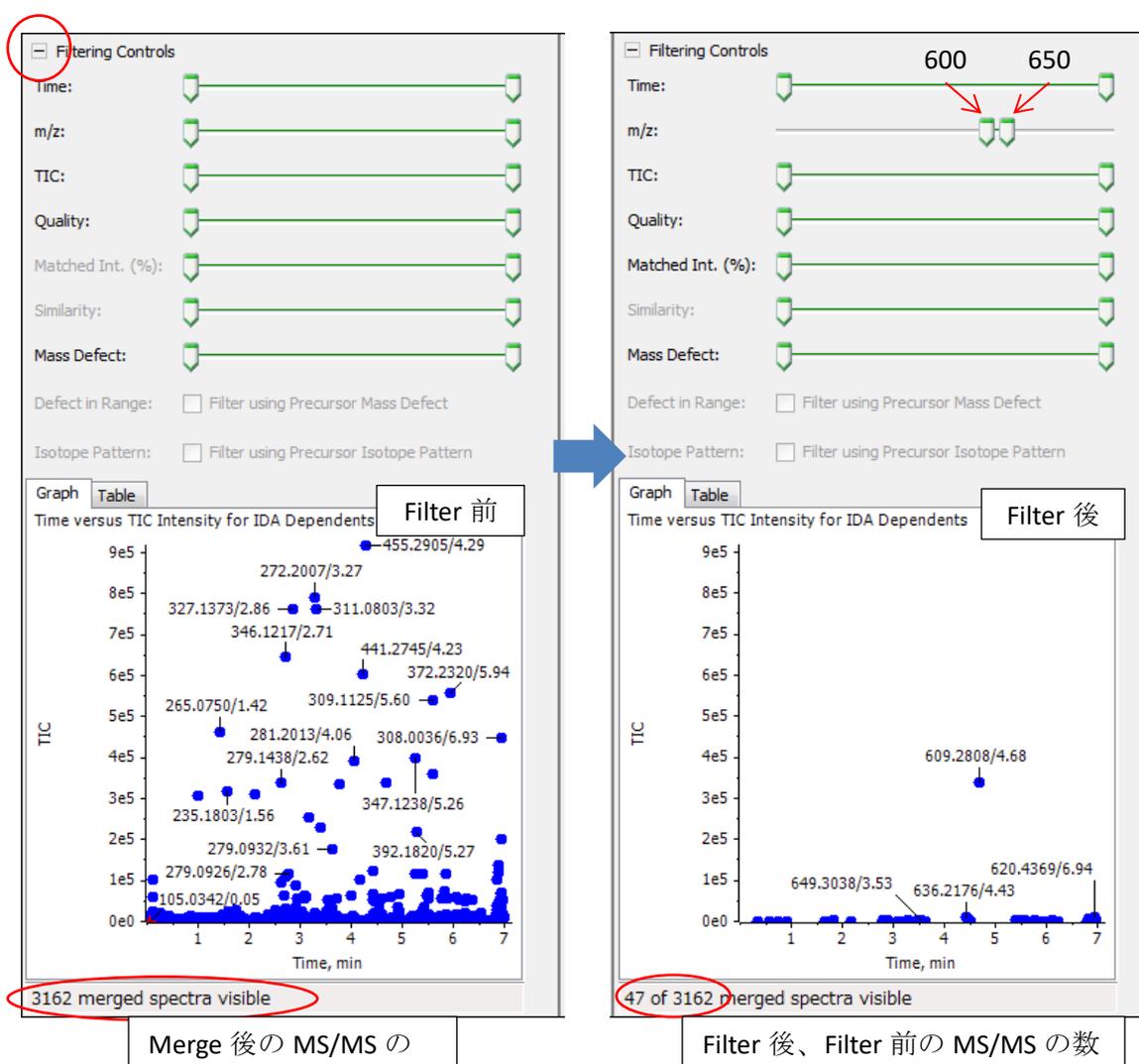
② Merge... にチェックをかけ、Mass, RT gap Tolerance に適当な値を入力します。

- \* RT の Tolerance は LC の Peak 幅に依存します。
- \* Training ではそれぞれ 10, 0.1 を入力してください。



## 5.12.4 Filtering

- \* MS/MS 取得された Precursor Ion に Filter をかけ、目的のイオンを抽出し、解析を容易にすることが可能です。
  - \* 設定できない項目（グレイ表示）については、別途設定が必要になります。
- ① 画面左上の Filtering Control の左の **+** をクリックし、画面を開きます。
  - ② 次ページを参考に  を左ドラッグで移動、あるいはダブルクリック後数値を入力し、目的の制限をかけます。
- \* Training では以下のように、m/z を 600~650 に制限してください。
  - \* 終了後、Filtering Control 左の **-** から Filtering Control は閉じてください。

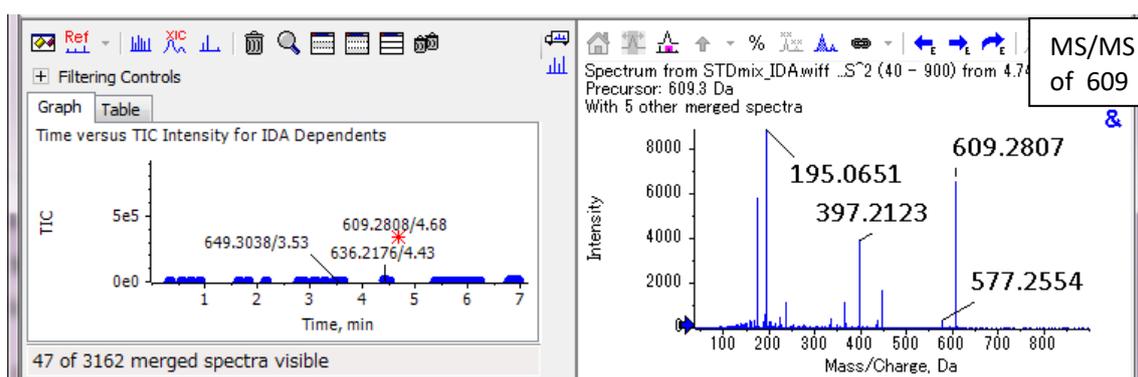


### 【Filtering Controls について】

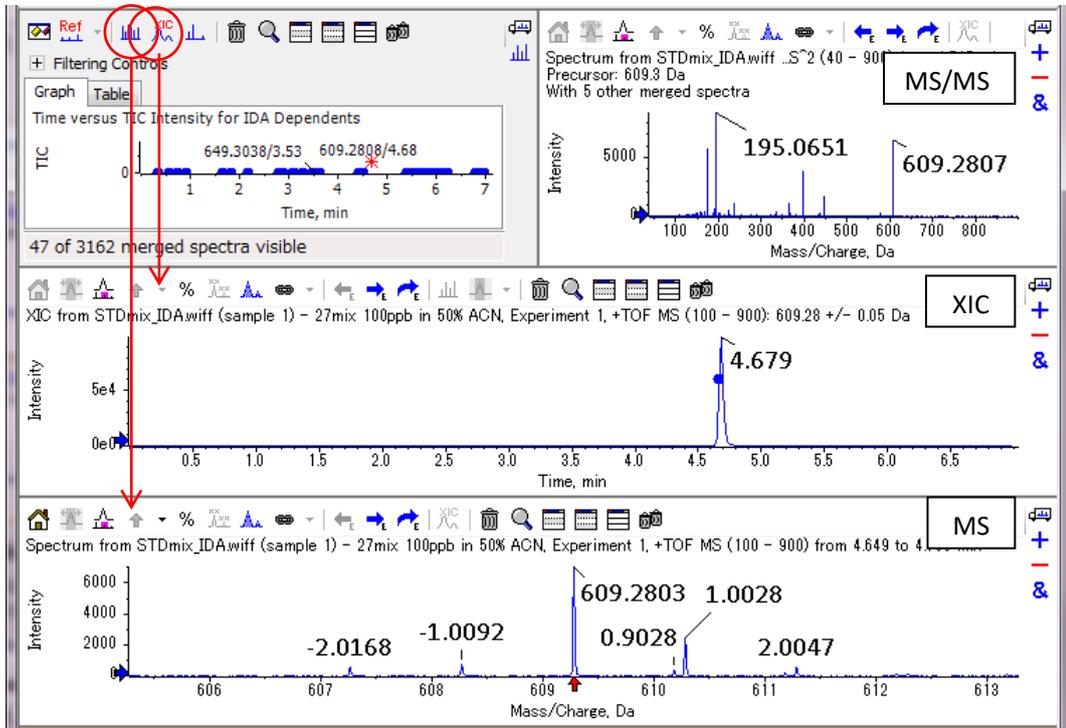
- \* 以下の Filter が可能です。
- \* \*については、別途設定が必要な項目になります。
- Retention Time (RT)
- $m/z$
- TIC: Fragment Ion の強度の積算
- Quality (%): 親イオン、ノイズを除く Fragment Ion の強度の積算の全 Fragment Ion の強度の積算に対する比率
- Matched Int (%)\*: 設定した Fragment Ion, Neutral Loss に一致した Ion の強度の Precursor Ion, Background Ion を除く全 Product Ion 中の比率 (Fragment Matching の項を参照ください。)
- Similarity (%)\*: 設定した基準化合物と一致する Fragment Ion, Neutral Loss の Precursor Ion, Background Ion を除く全 Product Ion 中の比率
- Mass Defect
- Defect in Range\*: 設定 (複数可能) した Defect 内の Precursor Ion のみを表示
- Isotope Pattern\*: 設定 (複数可能) した同位体比を持つ Precursor Ion のみを表示

#### 5.12.5 IDA Explorer を用いた目的物質の MS, MS/MS, XIC の表示

- \* Training では Reserpine ( $m/z$  609.2807, C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>+) について解析を行います。
- ① 目的の Peak をクリックします。
- \* Training では  $m/z$  609.28 をクリックしてください。
  - \* 右側に選択した Peak の MS/MS が表示されます。



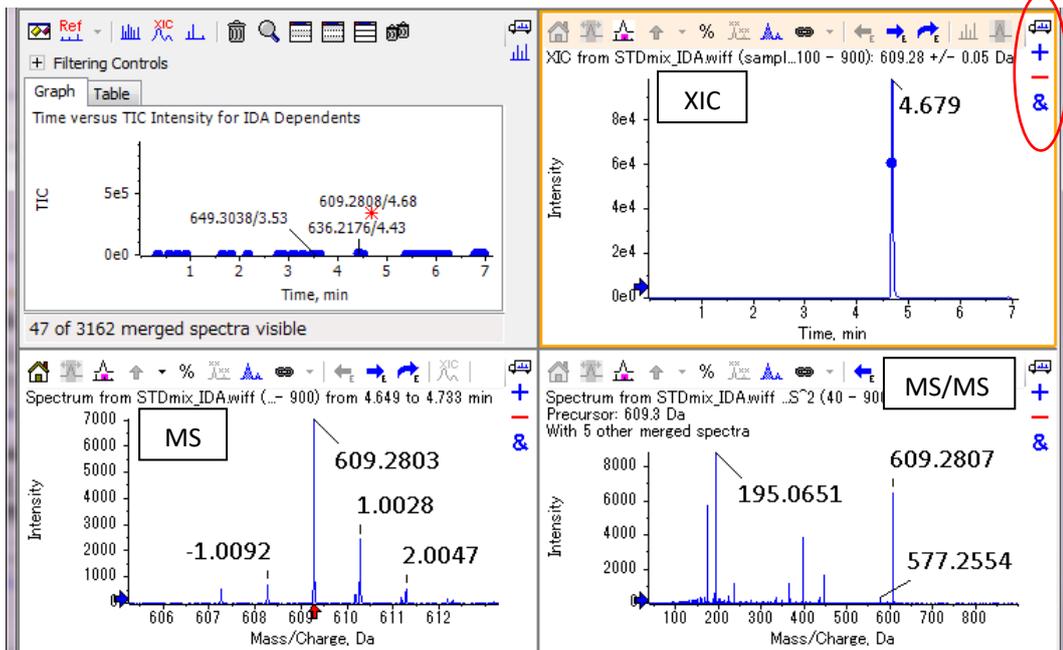
- ② 画面左上の    (左から MS, XIC, MS/MS) から MS, XIC をクリックして表示します。



### 5.12.6 Pane の移動、横軸のリンク、足し合わせ、差し引き、重ね書き

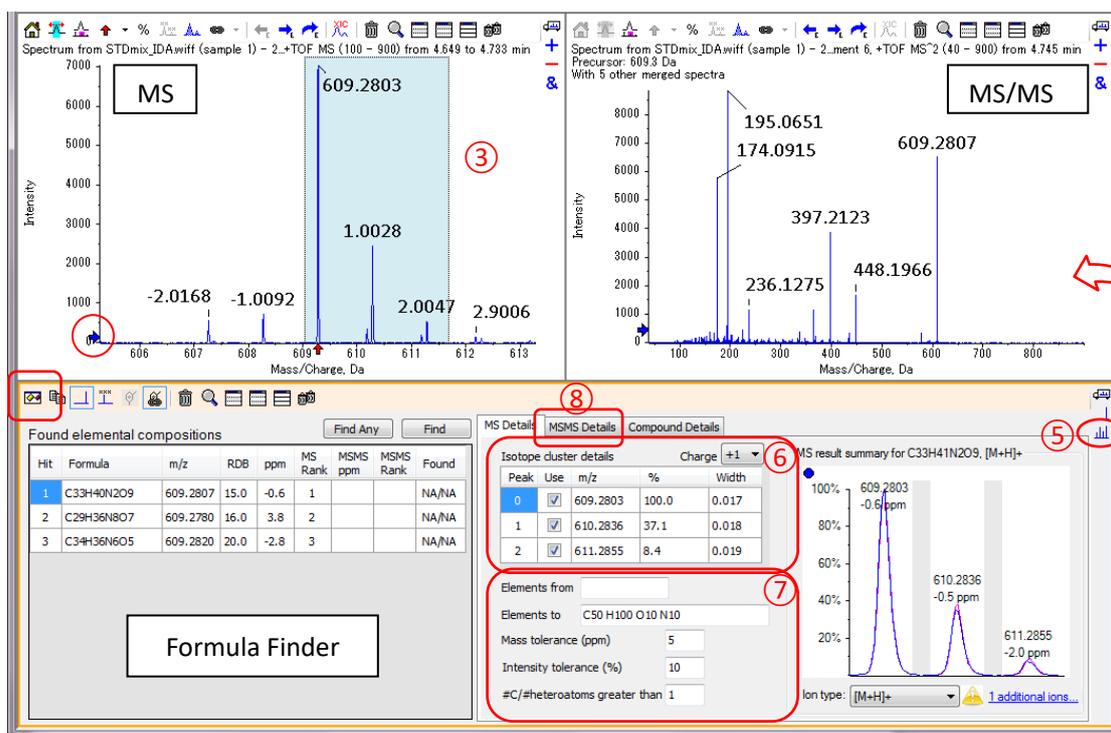
- ① 各 Pane 右上にあるアイコン (上から、移動、足し合わせ、差し引き、重ね書き) から目的のアイコンをクリック&ドラッグしてください。

\* Training では  を使用し、以下のように画面を移動してください。



### 5.13 組成解析 (Formula Finder)

- \* MS の精密質量、同位体分布、および MS/MS から組成解析、フラグメントイオンの帰属を行う機能です。
- ① 前述を参考に組成分析を行うピークの MS および MS/MS を表示します。
  - ② Training では、IDA Explorer、XIC の Pane を削除し、MS、MS/MS のみを表示させてください。
  - \*  $m/z$  のラベル表示されていないピークは、以降の解析で数値が読み込まれません。必要に応じて、スペクトルの Y 軸上で、Label Threshold → を動かし、目的のピークをラベルしてください。
  - ③ MS 上で、目的のピークについて同位体を含めて左ドラッグし、ピークを選択します。
  - ④ Tool Bar の Show から Formula Finder を選択し、Formula Finder を開きます。
  - ⑤ Formula Finder の右端にある  ボタンを MS/MS 上にドラッグ&ドロップして、Formula Finder と MS/MS をリンクします。



⑥ 必要に応じて、Isotope Cluster details で組成分析に使用しない同位体の Use のチェックを外します。

\* 他のイオンが重なっている Peak など、必要に応じて外してください。

\* Training では外しません。

Isotope cluster details				
Peak	Use	m/z	%	Width
0	<input checked="" type="checkbox"/>	609.2803	100.0	0.017
1	<input checked="" type="checkbox"/>	610.2836	37.1	0.018
2	<input checked="" type="checkbox"/>	611.2855	8.4	0.019

⑥

⑦ MS の解析条件を入力します。

\* Training では右図のように入力、設定を行ってください。

Elements from

Elements to

Mass tolerance (ppm)

Intensity tolerance (%)

#C/#heteroatoms greater than

⑦

⑧ MS/MS の解析条件を設定します。

Formula Finder の右画面を MSMS Details Tab に切り替え、Mass Tolerance, #C / #heteroatoms に適当な値を入力します。

\* Training では下図のように入力し、MS Details Tab に戻ってください。

IS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank	Found
1			NA/34
2			NA/2
3			NA/18

⑨ Find をクリックすることで検索結果が表示されます。

\* Find any ボタンを押すと、設定した検索条件に合致しない結果も表示されます。

#### 【各設定について】

- Elements from, to: 検索する元素とその元素数の下限、上限
  - \* 入力した元素、元素数の範囲内で検索が行われます。
- Mass tolerance:
  - \* 初期値として MS では 5ppm、MS/MS では 5mDa を推奨します。他のイオンが重なっている、強度が弱いなどの場合は大きく設定してください。
- Intensity Tolerance (%):
  - \* 初期値として 5~10%を推奨します。他のイオンが重なっている、強度が弱いなどの場合は大きく設定してください。
- #C / #heteroatoms...: 炭素とヘテロ元素の比の制限
  - \* 一般的な化合物では MS では 1、MS/MS では 0 を推奨します。未知成分で不明な場合は MS についても 0 を推奨します。

## 解析結果について

解析結果は組成式のリストおよび 3 つの Tab (MS Details、MSMS Details、Compound Details) で表示されます。

### Found Elemental Compositions

組成解析結果 elemental compositions Find Any Find

Hit	Formula	m/z	RDB	ppm	MS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank	Found
1	C33H40N2O9	609.2807	15.0	-0.6	1	0.4 (9)	1	NA/34
2	C29H36N8O7	609.2780	16.0	3.8	2	2.2 (9)	3	NA/2
3	C34H36N6O5	609.2820	20.0	-2.8	3	1.3 (9)	2	NA/18

MS, MS/MS の情報から総合ランク\*

MS 情報 (精密質量と同位体分布) から組成解析結果のランキング

Database 検索の Hit 数 (Local Library / ChemSpider)

MS/MS からのランク

Hit した組成、m/z の理論値不飽和度 (RDB)、MS の誤差

MS/MS の誤差 (強度の加重平均値) ( ) 内: 使用した MS/MS の Peak 数 (スペクトル上で数値表記された Peak)

### MS Details: MS の帰属結果

MS Details MSMS Details Compound Details

Isotope cluster details Charge +1

Peak	Use	m/z	%	Width
0	<input checked="" type="checkbox"/>	609.2803	100.0	0.017
1	<input checked="" type="checkbox"/>	610.2836	37.1	0.018
2	<input checked="" type="checkbox"/>	611.2855	8.4	0.019

MS result summary for C33H40N2O9

— 実測  
— 計算上の分布

609.2803 -0.6 ppm  
610.2836 -0.5 ppm  
611.2855 -2.0 ppm

Ion type: [M+H]<sup>+</sup> 1 additional ions...

Additional ions

Proposed ion: [M+H]<sup>+</sup>  
Competing ion: [2M+K]<sup>+</sup> 318.19247 (0.3%) [M+CH3OH+H]<sup>+</sup>

検出された他の付加体の情報

### MSMS Details :MS/MS の帰属結果

MS Details MSMS Details Compound Details

Parent mass 609.2808 Charge <= +1 Mass tolerance (mDa) 5

9 MS/MS peaks Display type All

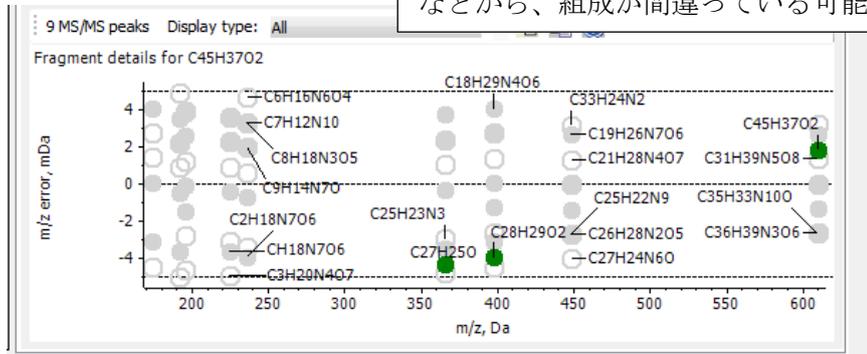
Fragment details for C33H41N2O9

検索されたすべての組成の範囲内の組成解析結果 (All の右の▼から表示変更可)  
 緑、オレンジ: 左のリストで選択した組成 (例: C33H49N2O9) で可能性がある Product Ion の組成  
 緑: 上記中、error の最も小さい組成  
 グレー: 選択した組成では帰属できない組成  
 白抜き: ラジカル  
 ひし形: クリックして選択した Product Ion の組成から関連する組成

グラフコピー、テーブルのコピー、レジェンドの表示

### Tips: Product Ion の情報を用いた組成解析の確認

- \* 不正解な組成の可能性の高い例
- \* 主要な Product Ion が帰属されていない
- \* 帰属された Ion が少ない
- などから、組成が間違っている可能性が高い



### Compound Details :Database 検索の結果

- \* 設定した Local ライブラリ、あるいは On-line の ChemSpider サーチの結果です。
- \* ChemSpider の使用には別途有償ライセンスと Web への接続が必要になります。
- \* 使用するデータベースの確認、設定、変更については次ページの備考を参照ください。

検索された化合物リスト

MS Details | MSMS Details | Compound Details

Details for C33H40N2O9, ChemSpider match

ChemSpider Matches

- (-)-reserpine
- Methoserpidine
- Methyl (3beta, 16beta, 17alpha, 20alph...
- 10-(Cyclohexylamino)-23-(dimethylami...
- Methyl (3xi, 15beta, 17beta)-11, 17-di...
- 3-[(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)(3-cyc...
- 6,6'-[6-(2-Hydroxy-3-methylphenyl)-1...
- Carbonylbis(8-azabicyclo[3.2.1]octan...
- 3-[(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)(octan...
- 3-((Cyclopentylcarbonyl)[2-(2,5-dimet...
- 3-{Hexyl[(7-methoxy-1-benzofuran-2...

(-)-reserpine

Composition: C33H40N2O9, Mass: 608.2728

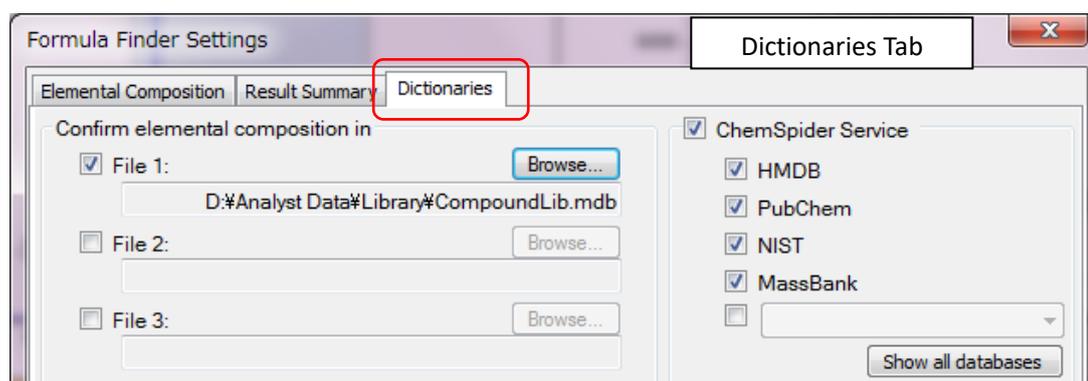
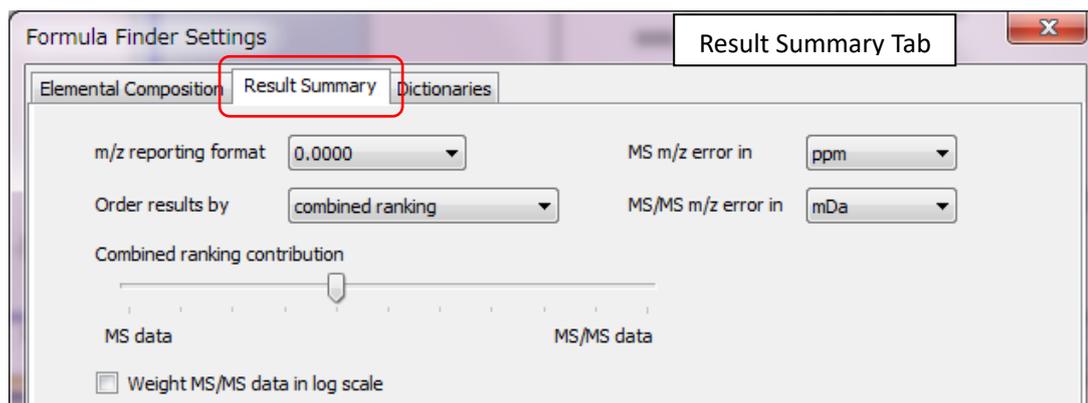
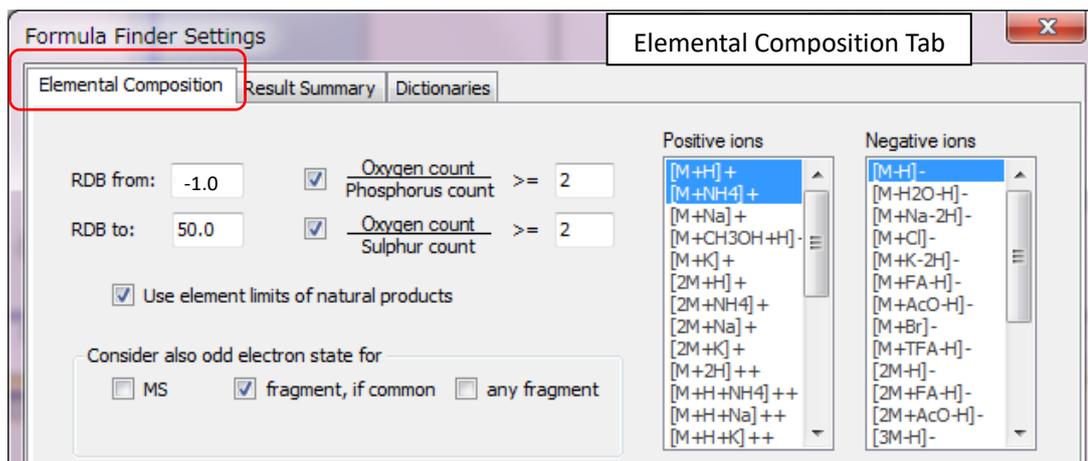
左から

- mol file 形式の構造式の保存
- ChemSpider のウェブサイトへのリンク
- コピー
- 検索された化合物の一覧表示

左のリストで選択した化合物の構造

### 【Formula Finderの詳細設定 (Options) について】

- \* 解析の条件変更、Databaseの変更など、必要に応じて確認、変更を行います。
- \* Formula Finder ウィンドウ左上の  ボタンをクリック、Options 画面を開き、必要な設定を変更後、画面下の OK をクリックし終了してください。
- \* 以下 Training 時の設定になります。



### **Elemental Composition Tab:組成解析の設定**

- RDB from, to: 不飽和度の下限、上限
  - \* 必要に応じて変更してください。
- Oxygen count / Phosphorous count, Sulfur Count: 酸素とリン、硫黄の比
  - \* P (リン)、S (硫黄) を含む化合物の場合、チェックをかけ、適当な数値を入力することを推奨します。
  - \* 前ページの例では P, S はリン酸、スルホン酸を想定しています。それ以外の場合はチェックを外す、あるいは数値を変更してください。
- Use element limits...: リーズナブルな元素比率の組成式のみを表示
- Consider also odd electrons...: ラジカルイオンを検索対象に含める場合
  - \* 使用する項目にチェックをかけてください。
- Positive ions / Negative ions: 想定されるアダクトのタイプの選択

### **Result Summary タブ: 結果表示の設定**

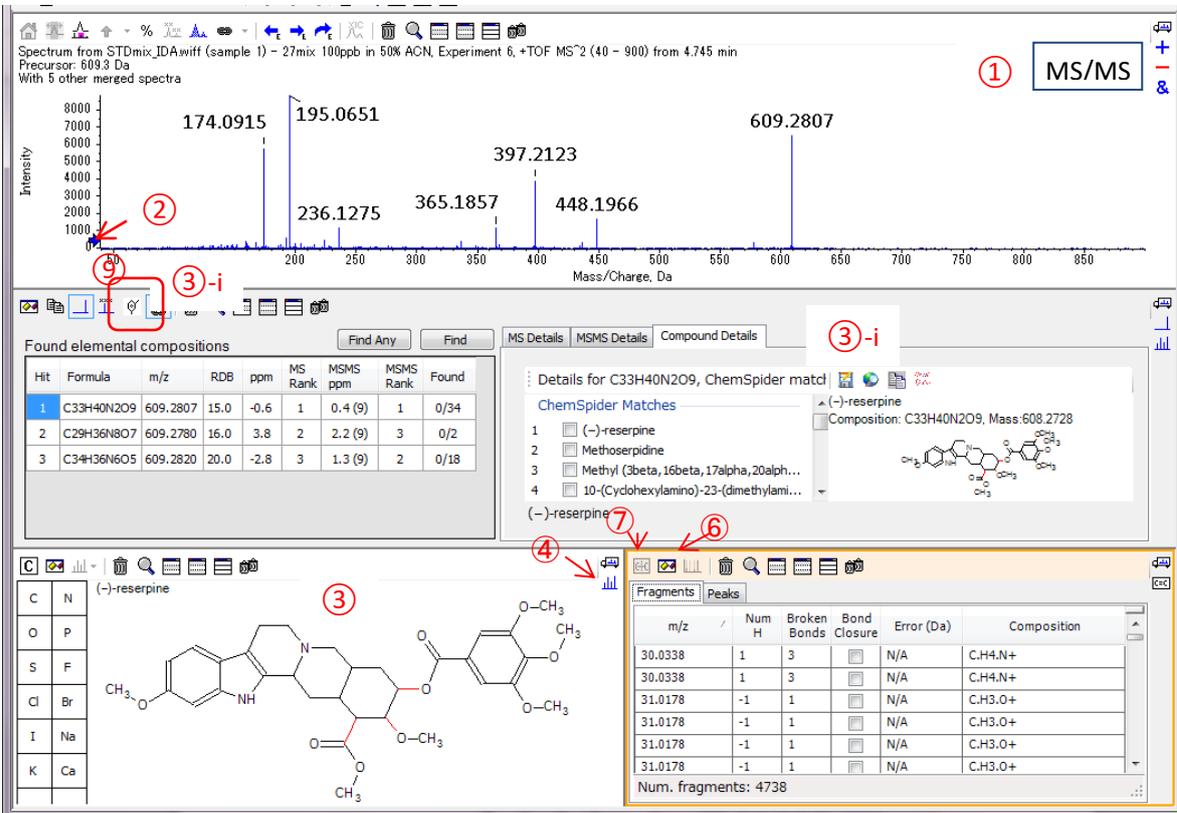
- *m/z* reporting format: 報告の形式
- Order results by: 検索結果の順位づけ
- Combined Ranking Contribution, : 検索結果の順位への MS, MS/MS の重みづけ
- Weight MS/MS data...: 検索結果の順位への MS/MS の重みづけ
- MS error in: MS の入力、表示の単位
- MS/MS error in: MS/MS の入力、表示の単位

### **Dictionaries タブ; 使用するライブラリの指定**

- \* 検索された組成式からライブラリ検索を行います。
- Confirm elemental...: Local ライブラリの指定
  - \* 化合物情報を含むデータベースなどのファイルを 3 つまで選択することができます。選択可能なファイルの種類は、Analyst Database ファイル (\*.mdb)、XIC Manager ソフトウェアリスト (\*.xiclist)、タブ区切りテキスト (\*.txt)、構造データフォーマット (\*.sdf) の 4 種類です。
- ChemSpider Service: On-line で ChemSpider サーチ、Database の選択
  - \* 使用には別途有償ライセンスと Web への接続が必要になります。
  - \* 使用する Database にチェック、あるいは、選択をしてください。
  - \* Database の情報、ChemSpider については ChemSpider の web site をご参照ください。 <http://www.chemspider.com/>

## 5.14 フラグメントの帰属 (Fragments Pane)

- \* 推定された構造式から Fragment Ion の計算を行う、Fragment Ion から構造上の解裂部分を帰属する機能です。
  - \* Mol file 形式の構造式を使用します。ChemSpider サーチの検索結果から呼び出す、あるいは、mol file 形式の構造式をあらかじめ準備してください。
  - \* Training では MS の画面を削除、あるいは隠してください。
- ① 前述を参考にフラグメントの帰属を行う MS/MS (および組成解析時は FormulaFinder の画面) を表示します。
  - ② 必要に応じて、スペクトルの Y 軸上で、Label Threshold→の矢印を動かし、目的のピークをラベルします。
  - \* Training では変更しません。
  - ③ 構造式を開きます。
    - i. ChemSpider の検索結果から開く場合：Compound Details で目的の化合物の構造を表示し、 をクリックして構造式を表示します。
    - ii. それ以外の場合：Tool Bar の File から Open mol file...を選択し、目的の mol file (Training では MOL フォルダ内の Reserpine.mol) を開きます。
  - ④  を MS/MS 上にドラッグし、構造と MS/MS をリンクします。
    - \* 構造を変更した場合は同様に、リンクしてください。
  - ⑤ Tool Bar の Show から Fragments Pane を選択します。



The screenshot displays the software interface for MS/MS analysis. At the top, the MS/MS spectrum is shown with peaks labeled at m/z 174.0915, 195.0651, 236.1275, 365.1857, 397.2123, 448.1966, and 609.2807. The Y-axis is labeled 'Intensity' and the X-axis is 'Mass/Charge, Da'. A red circle ① highlights the 'MS/MS' button in the top right.

Below the spectrum, the 'Found elemental compositions' table is visible:

Hit	Formula	m/z	RDB	ppm	MS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank	Found
1	C33H40N2O9	609.2807	15.0	-0.6	1	0.4 (9)	1	0/34
2	C29H36N8O7	609.2780	16.0	3.8	2	2.2 (9)	3	0/2
3	C34H36N6O5	609.2820	20.0	-2.8	3	1.3 (9)	2	0/18

The 'Details for C33H40N2O9, ChemSpider match' section shows 'ChemSpider Matches' for (-)-reserpine, Methoserpidine, Methyl (3beta,16beta,17alpha,20alpha...), and 10-(Cyclohexylamino)-23-(dimethylami...).

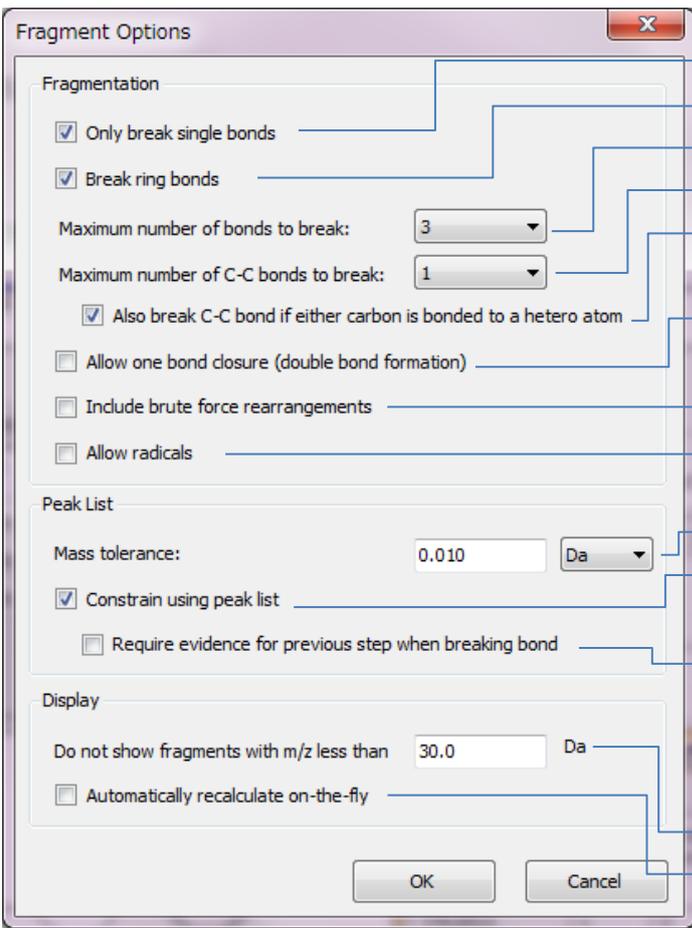
The 'Fragments' pane at the bottom right shows a table of fragment ions:

m/z	Num H	Broken Bonds	Bond Closure	Error (Da)	Composition
30.0338	1	3	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H4.N+
30.0338	1	3	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H4.N+
31.0178	-1	1	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H3.O+
31.0178	-1	1	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H3.O+
31.0178	-1	1	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H3.O+
31.0178	-1	1	<input type="checkbox"/>	N/A	C.H3.O+

The chemical structure of (-)-reserpine is shown in the center, with a red circle ③ highlighting the structure icon in the top right of the structure pane. A red circle ④ highlights the link icon in the top right of the structure pane. A red circle ⑤ highlights the 'Show' button in the top right of the Fragments pane. A red circle ⑥ highlights the 'Fragments' button in the top left of the Fragments pane. A red circle ⑦ highlights the 'Peaks' button in the top left of the Fragments pane.

⑥ Fragment pane の左上の  をクリックし、以下を参考に帰属の条件を設定、OK します。

- \* 化合物の構造に適した設定を行ってください。
- \* Training では以下の条件を使用してください。



**Fragmentation**

- 単結合の開裂のみに限定
- 環構造の開裂を許容
- 最大開裂数
- C-C の最大開裂数
- ヘテロ原子と結合した C-C の開裂の許容
- 閉環の許容 (2 重結合も加味)
- 開裂後の再結合の許容
- ラジカルイオンの許容

**Peak List**

- 誤差範囲
- スペクトル内にある Peak のみ表示 (Check を推奨)
- 2 か所以上の開裂時、1 か所開裂の Peak が帰属されたものに限る

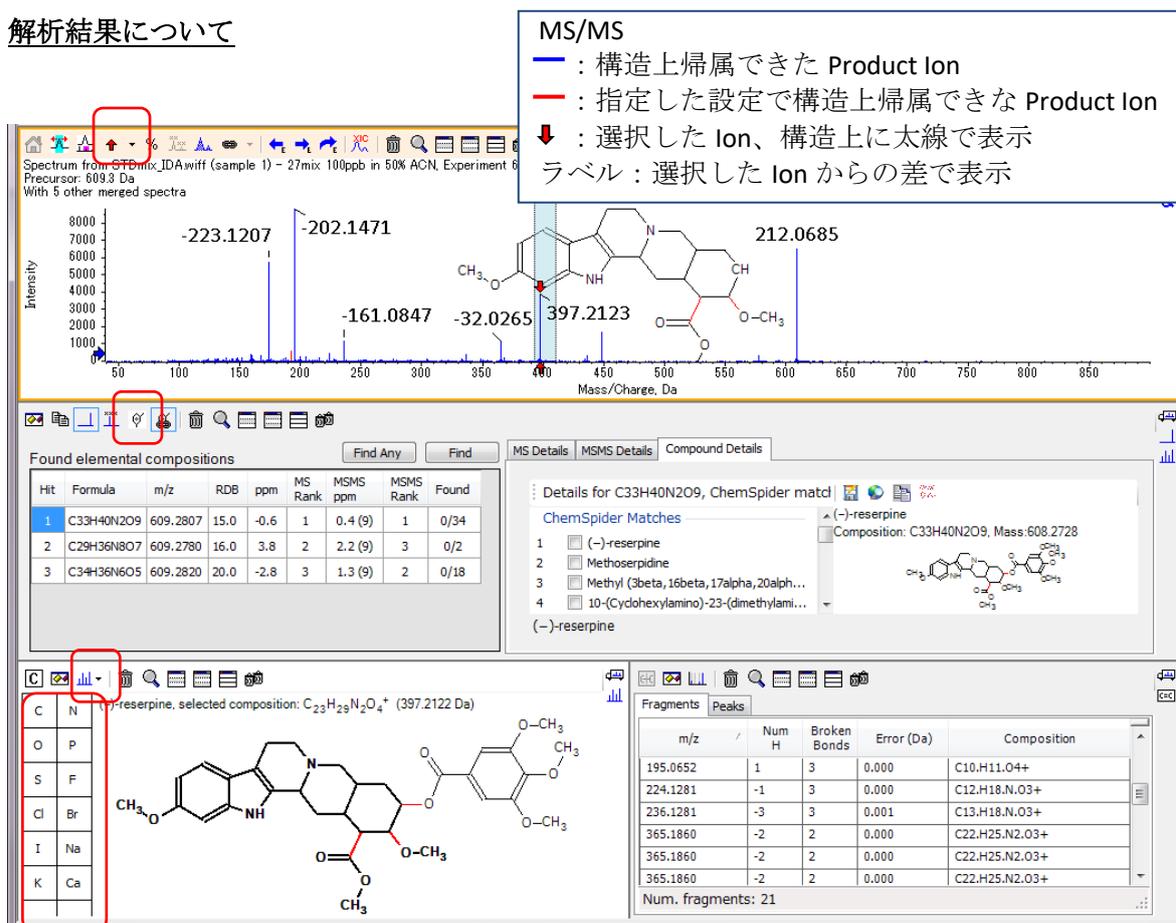
**Display**

- 最小の m/z の指定
- 構造式を変更した際に、自動的に再計算する

**Fragment Pane**

⑦ Fragment pane の左上の  をクリックすることで、帰属されます。

## 解析結果について



### ■ MS/MS の表示とラベルについて

- \* **Fragment Option** で設定した条件下で青 : 構造上帰属できた Product Ion、赤 : 構造上で帰属できなかった Product Ion になります。必要に応じて、**Fragment Option** の設定を変更してください。
- \* MS/MS 上で Product Ion を選択することで、対応する部分構造が太線で表示されます。また、MS/MS 上の  $m/z$  の実測値が、選択した Ion の  $m/z$  からの差で表示に変わります。実測値に戻す場合は画面上の アイコン (Add arrows markers...) から **Use Arrows for Relative Peak Labeling** のチェックを外してください。

### ■ MS/MS と構造式のリンク、コピーについて

- \* MS/MS 上の目的のピークをドラッグして選択することで、対応する部分構造が太線で表示され、**Fragment** の情報がハイライトされます。
- \* 構造上の目的の部分構造を囲むことで、MS/MS 上の対応する  $m/z$  に矢印が表示されます。
- \* 構造上をクリックし **Tool Bar** の **Edit** から **Copy** を選択することで、太線の部分構造がクリップボードにコピーされます。

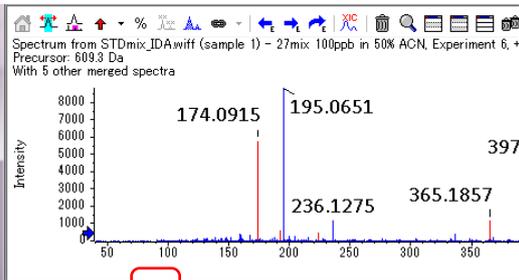
■ 構造式の修飾、変更について

- \* 構造式左の元素を左クリック後、構造に近づけることで、構造への置換が可能です。
- \* 構造式内の変更、削除したい部分をドラッグし、右クリックから目的の変更を行うことが可能です。
- \* 構造式を変更した場合、同じ画面上の  アイコンを目的の MS/MS スペクトル上にドラッグ&ドロップして、再度、スペクトルと構造式のリンクを行ってください。

■ ChemSpider の検索結果使用時の構造式の変更と構造推定について

- \*  ボタンをアクティブにすると、Formula Finder と Structure Pane がリンクされます。複数化合物がリストアップされている場合、Formula Finder 上で他の化合物を選択すると、Structure Pane に表示される構造式も自動で切り替わります。
- \* 切り替え後、再度 Fragment pane の左上の  をクリックすることで、帰属されます。

**Tips:** 未知物質の構造推定を行う場合、複数の候補化合物の中から、最も実際の Product Ion に Match する構造を探すのに役立ちます。



Spectrum from STDmix\_IDAwiff (sample 1) - 27mix 100ppb in 50% ACN, Experiment 6, 4  
Precursor: 609.3 Da  
With 5 other merged spectra

**MS/MS**

—: 指定した設定で構造上帰属できない Product Ion  
 主な Product Ion が帰属できないことから、この構造の可能性は低いと推定される。

Hit	Formula	m/z	RDB	ppm	MS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank	Found
1	C33H40N2O9	609.2807	15.0	-0.6	1	0.4 (9)	1	0/34
2	C29H36N8O7	609.2780	16.0	3.8	2	2.2 (9)	3	0/2
3	C34H36N6O5	609.2820	20.0	-2.8	3	1.3 (9)	2	0/18

Details for C33H40N2O9, ChemSpider match

5  Methyl (3*α*,15*β*,17*β*)-11,17-di...

6  3-[[1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl](3-cyclopentylpropanoyl)amino]-4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-8-(hydroxymethyl)-6-methoxy-3,4,4a,9b-tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-carboxamide

7  6,6'-[6-(2-Hydroxy-3-methylphenyl)-1,3-benzodioxol-5-ylmethyl]bis(3-cyclopentylpropanoyl)amine

8  Carbonylbis(8-azabicyclo[3.2.1]octan-9-yl)amine

9  3-[[1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl](octan-3-yl)amino]-4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-8-(hydroxymethyl)-6-methoxy-3,4,4a,9b-tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-carboxamide

m/z	Num H	Broken Bonds	Error (Da)	Composition
195.0652	1	3	0.000	C10.H11.O4+
195.0652	-1	3	0.000	C10.H11.O4+
236.1281	3	3	0.001	C13.H18.N.O3+
609.2807	0	0	0.000	C33.H41.N2.O9+

Num. fragments: 4

## 5.15 疑似 Precursor Ion Scan、Neutral Loss Scan (Fragment Matching)

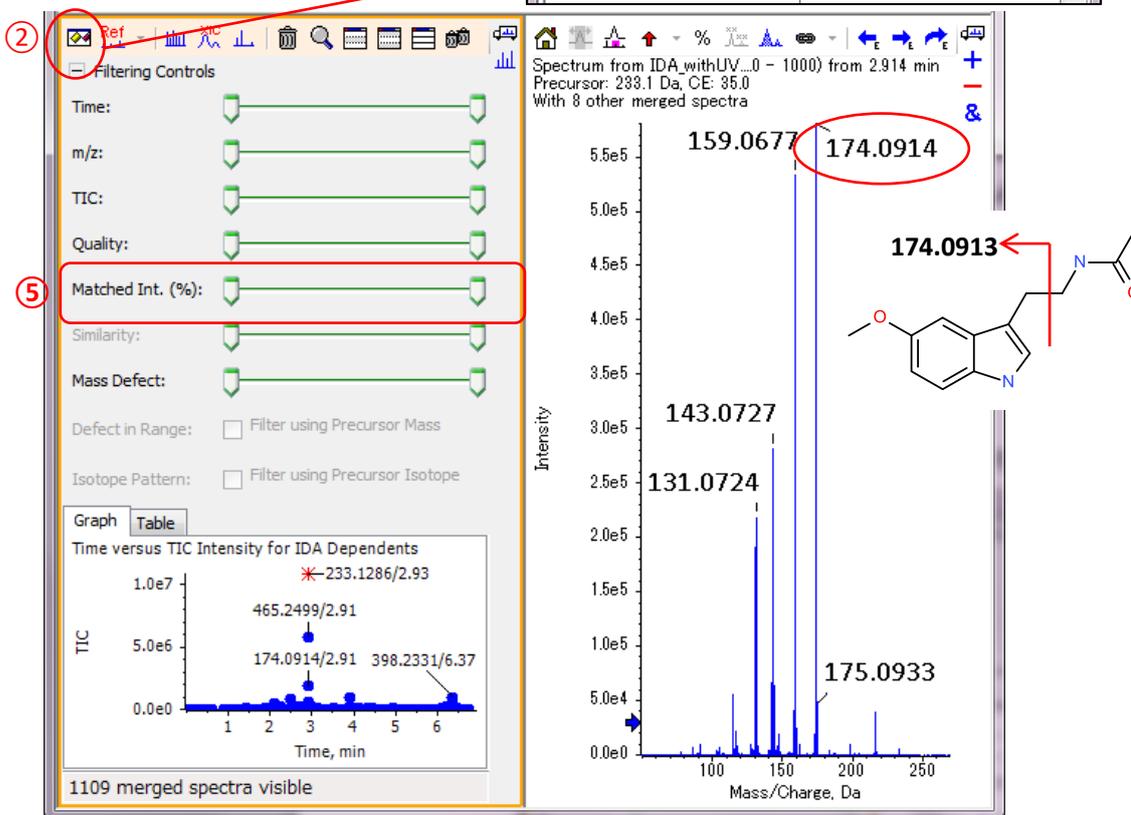
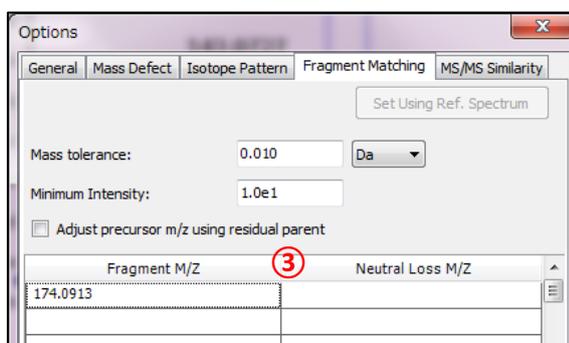
～ 類縁体、目的の骨格を有する化合物の検索 ～

- \* IDA の MS/MS から、目的の部分構造に相当する Product Ion あるいは、Neutral Loss を用い、その部分構造を有する Precursor Ion を検出します。
- \* 複数の Product Ion、Neutral Loss の入力が可能です。Or 検索になります。
- \* Training では 'IDA\_wUV' の Data から Melatonin の類縁不純物を検索します。

- ① 目的の Data (Training では IDA\_wUV) を IDA Explore で開きます。
- ② 画面左上の  をクリックし、Options 画面を開きます。
- ③ Fragment Matching の Tab で目的の Product Ion あるいは Neutral Loss を Fragment M/Z、Neutral Loss M/Z に入力します。

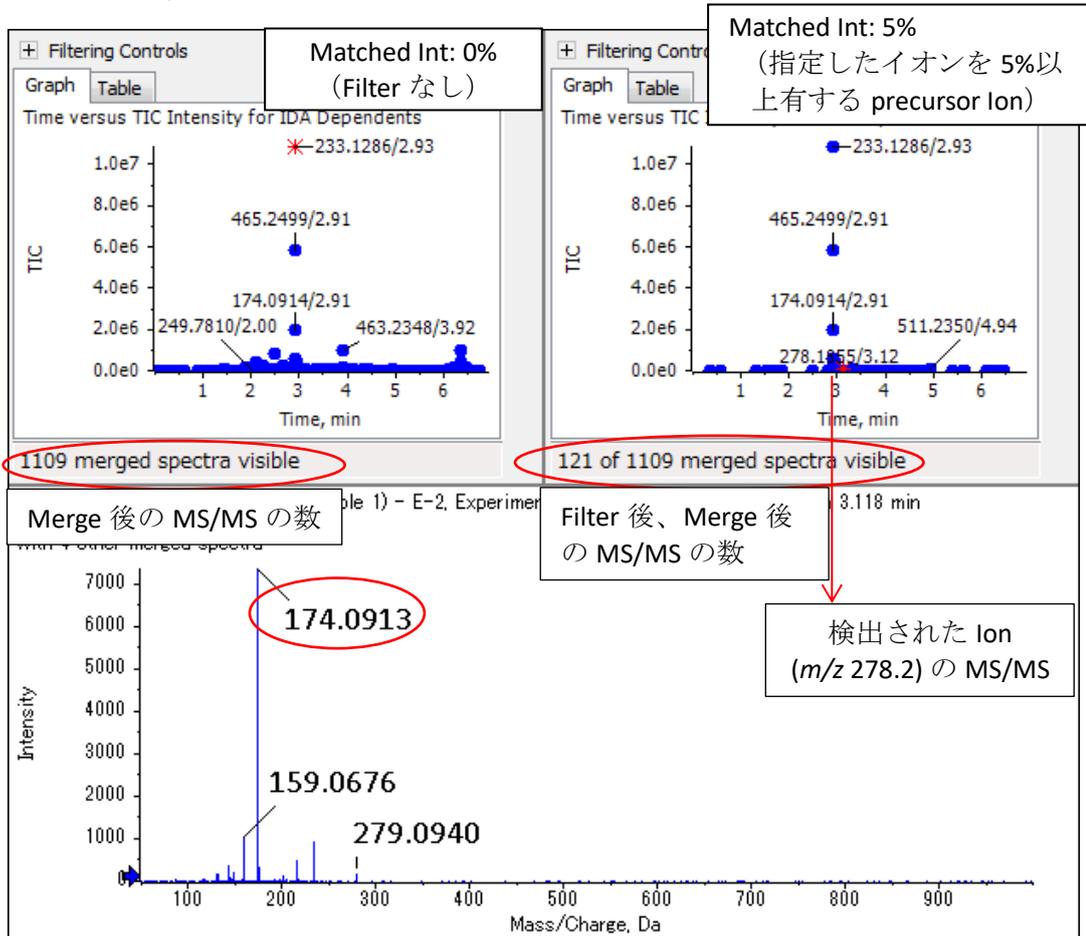
- \* Training では Melatonin の部分構造に相当する、174.0913 を Fragment M/Z に入力してください。

- ④ OK をクリックし、検索を行います。(検索が終了すると、Matched Int の文字が黒に変わります。)



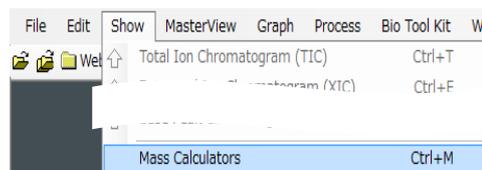
- ⑤ 検索終了後、Filtering Controls の Matched Int (%) の Minimum を適当な値に設定し、Filter(抽出)を行います。

- \* Matched Int (%) : 指定したイオンの強度の積算のノイズ、Precursor Ion を除く全 Product Ion の強度の積算に対する比率
- \* Training では Minimum を 5% に設定してください。



## 5.16 精密質量の計算

① Tool Bar の Show から Mass Calculators を選択します。



② Mass Property タブで解析する組成式を Formula、Charge State に価数 (数字) を入力します。

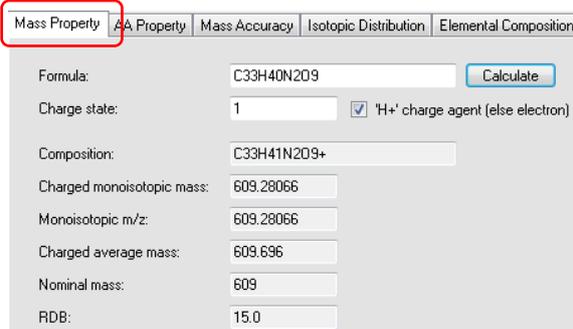
\* Negative Mode の場合はマイナスをつけてください。

\* Charge State 入力例:

• Positive Mode: 1

• Negative Mode: -1

③ Positive Mode で+H、あるいは Negative Mode で-Hを計算する場合は、'H+' charge agent (else electron) のチェックボックスに チェックを入れます。

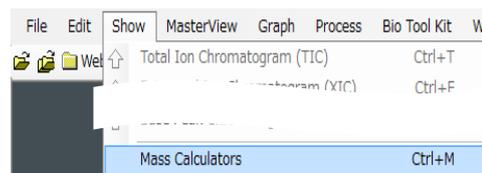


Field	Value
Formula:	C33H40N2O9
Charge state:	1
Composition:	C33H41N2O9+
Charged monoisotopic mass:	609.28066
Monoisotopic m/z:	609.28066
Charged average mass:	609.696
Nominal mass:	609
RDB:	15.0

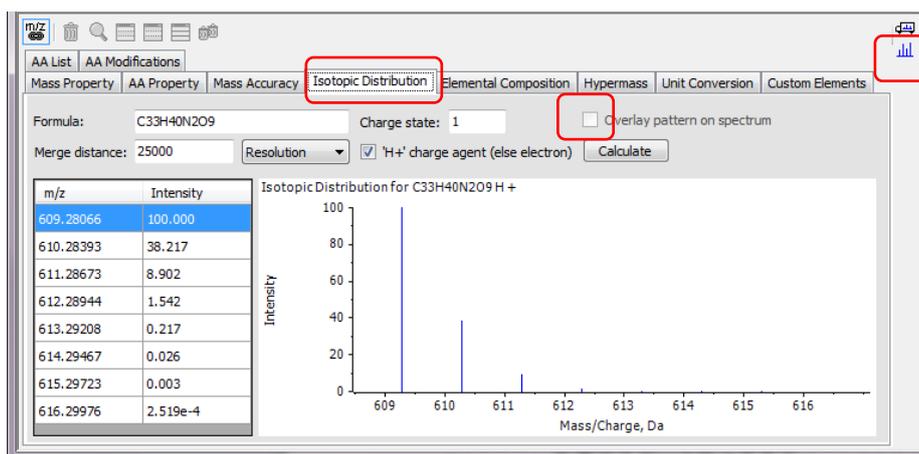
④ Calculate をクリックします。

## 5.17 同位体分布の計算と重ね書き

① Isotopic Distribution タブをクリックし、組成を入力すると理論上の同位体ピークが表示されます。



\* スペクトルに重ね書きする場合は、右上の  アイコンを目的のスペクトルにドラッグしてリンクした後、Overlay pattern on spectrum にチェックをかけてください。



\* その他の Tab については英文 Manual を参照ください。

# MasterView による解析

## 6 MasterView による解析

- MasterView は、PeakView 上で動作します。
- MasterView では、複数データ中の既知化合物の検索、ライブラリ検索、組成解析、未知化合物の検索（含有成分の抽出）、2 サンプル間の差分解析が自動でできます。
- 複数の Data を同時に開き、解析することが可能です。

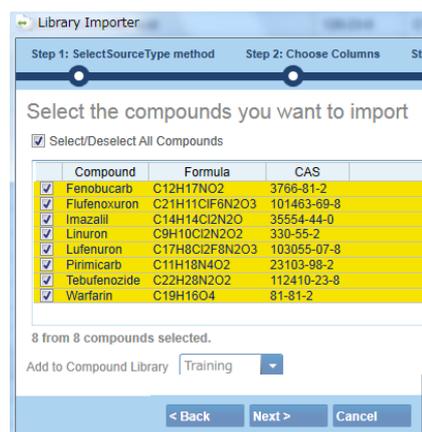
### 6.1 新規 Library の登録

※ 新規 Library を使用する場合に行います。

※ 以前作成したライブラリを使用する場合は、6.2 以降から操作を行ってください。

- ① PeakView を起動します。
- ② メニューバーの File ->  Open Multiple Samples から目的のデータを開きます。  
※ Training では、TT\_Training/02\_MasterView フォルダ内の「01-Data」、「02-Data」を同時に選択して As a standard TIC の表示で開きます。
- ③ Peak View ソフトウェアのメニューから、MasterView-> New Session を選択します。
- ④  (Launch LibraryView importer...) をクリックして、LibraryView を開きます。
- ⑤ 右下の Import をクリックし、使用するデータベースを選択します。  
※ Training では、Analyst Compound Database をクリックし、D:\Analyst Data\Projects\TT\_Training\Data\02\_MasterView フォルダ内の Free for Training.mdb を選択します。

- ⑥ Select/Deselect All Compounds にチェック、または All をクリックし、目的の化合物を選択後します。
- ⑦ Add To Compound Library に作成するライブラリ名（Training では Training）と入力して右下の Next をクリックします。
- ⑧ Finish をクリックします。

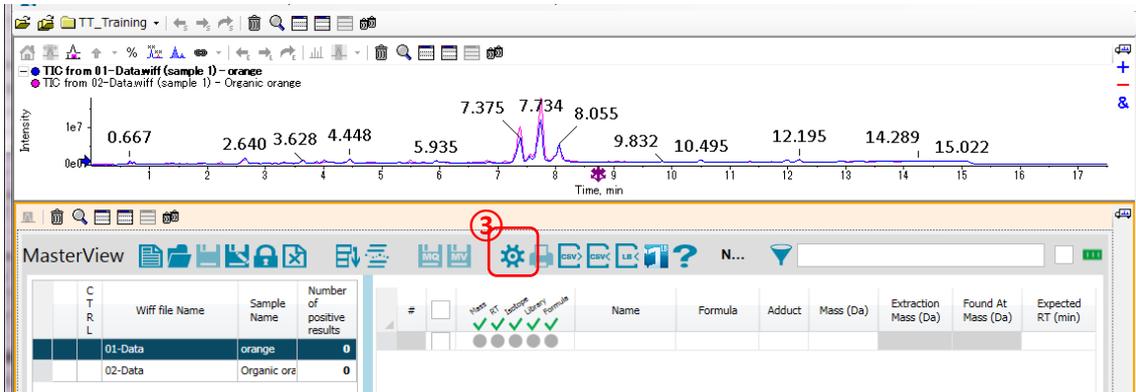


### 6.2 目的、検索条件、結果の表示画面の設定

※ Training では、現在開いている Session をそのまま使用します。③から始めてください。

- ① PeakView を起動し、メニューバーの File ->  Open Multiple Samples から目的のデータを開きます。

- ② Peak View ソフトウェアのメニューバーから、MasterView -> New Session をクリックします。



- ③  ( settings アイコン) をクリックします。
- ④ Calculations タブで、以下を参考にピーク検出条件、差分解析の設定を行います。
- ※ Training では、下図のように設定を行ってください。
  - ※ Non-Target 解析、自動組成解析を行わない場合は⑤、⑥のチェックを外してください。

**Peak 検出時の default 設定**  
 \*注意:RT width 内の Peak はすべて Area 算出時に積算されます。

**Non-Target Peak 検出時の設定 (使用チェック)**

**自動組成解析の設定 (使用时チェック)**

**自動報告書作成時の Template**

**XIC の Threshold (Counts or S:N)**

Do not calculate details for XIC with Intensity < 2000 counts or S:N < 200

Default XIC Width (Da) 0.02

Default Retention Time Width (min) 2

Default Threshold (cps) 2000

Default Threshold (ratio of control) 50

Non-Targeted Peak Finding

Find new LCMS peaks and add them to the existing XIC list.

Find peaks from: All samples

Minimum Retention Time (min) 1

Maximum Retention Time (min) 5

Peak Detection Sensitivity Fast Exhaustive

Formula Finder

自動組成解析時の組成の上限とトレランス

Max Element C100 H200 N10 O20 P4 S4 Cl Br

Mass Tolerance (ppm) 5.00

Report Template

C:\Users\Public\Documents\LAB SCIE\X\MasterView\Templates\FilterByPositiveHit.docx

- ⑤ ライブラリーサーチを行う場合は、以下を参考に **Library Searching** タブで **Perform Library Searching** にチェックを入れ、条件設定を行います。

※ Training では、下図のように設定を行ってください。

The screenshot shows the 'Library Searching' tab in a software interface. A red box highlights the 'Library Searching' tab itself. A red arrow points to the 'Perform Library Searching' checkbox, which is checked. A text box next to it says 'ページ下を参照ください。' (Refer to the bottom of the page).

Callouts on the left side of the image describe different sections:

- 検索アルゴリズム、並び替え条件** (Search Algorithm and Sorting Conditions): Points to the 'Algorithm To Use During Library Search' (Candidate Search) and 'Results Sorted By' (Purity) dropdowns.
- 使用するライブラリ** (Libraries to Use): Points to the 'Libraries To Search' section, where 'Search All Libraries' is unchecked and 'Training' is checked.
- 検索条件** (Search Conditions): Points to the 'Algorithm Parameters' section, which includes a table of constraints and tolerances.

Additional callouts provide specific instructions:

- Search all Libraries** あるいは、使用するライブラリにチェック  
\* リストにない場合は、「6.1.新規 Library の登録」から作成、登録を行ってください。
- Tolerance**  
\* 使用する Data、ライブラリに応じて設定してください。  
TripleTOF の data で作成された Library の場合、通常 5mDa になります。
- 詳細設定**  
\* 変更される場合は Help を参照ください。

### 【 検索アルゴリズムとソートについて】

Algorithm	検索方法
Candidate Search	Algorithm Parameter に基づいて未知成分として検索
Confirmation Search	XIC List の化合物名と一致するものを検索
Smart Confirmation Search	XIC List の化合物名と一致するものを検索し、ヒットしない場合は Algorithm Parameter に基づいて検索。ライブラリでヒットした成分名を [Smart Confirmation] として表示。
Fit	ライブラリ中の MS/MS のピークが、Unknown スペクトルに対して、どれだけ Hit しているのかで算出
RevFit	Unknown の MS/MS のピークが、ライブラリ中の MS/MS に対して、どれだけ Hit しているのかで算出
Purity	両方のスペクトル間で、一致しなかったピークを算出

- ⑥ Columns タブでは table に表示するカラム項目を選択します。

※ Training ではデフォルトを使用します。

- ⑦ Confidence Setting タブでは、質量誤差、保持時間等の各項目における信頼度の設定を行います。

※ Training ではデフォルト (右図) を使用します。

- ⑧ OK をクリックし、settings を閉じます。

### 6.3 目的化合物の情報の入力

※ Non-target 解析 (目的化合物がない) 場合は 6.4 に進んでください。

#	RT	Name	Formula	Adduct	Mass (Da)	Extraction Mass (Da)	Found At Mass (Da)	Expected RT (min)
1		Fenobucarb	C12H17NO2	+H	207.12593	208.13321		0
2		Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O	+H	488.03624	489.04352		0
3		Imazalil	C14H14Cl2N2O	+H	296.04832	297.0556		0
4		Linuron	C9H10Cl2N2O2	+H	248.01193	249.01921		0
5		Lufenuron	C17H8Cl2F8N2O	+H	509.97842	510.9857		0
6		Pirimicarb	C11H18N4O2	+H	238.14298	239.15025		0
7		Reserpine	C33H40N2O9	+H	608.27338	609.28065		0
8		Tebufenozide	C22H28N2O2	+H	352.21508	353.22235		0

- ① Table に目的の化合物情報を入力します。

- i. Manual で入力する場合 :

Formula と Adduct あるいは、Mass (Da) を入力します。その他必要に応じて情報 (化合物名、Retention Time など) を入力します。Excel などから、リストのコピー&ペーストも可能です。

- ii. 以前に作成、保存した List を使用する場合 :

 Import compound Info from csv file から File を選択し、OK をクリックします。

- iii. Library にある化合物リストを使用する場合 :

 Import compound Info from Library View をクリックし、既知化合物リストとする Library (Training では、Training) を選び、OK をクリックします。

- ② 必要に応じて  Export compound Info from csv file から List を保存します。
- ③ Process をクリックし、解析を行います。

## 6.4 結果の確認

選択した Peak の XIC

i. 各データ中の Positive Hit 数

ii.  [icon]

iii. Session pane: Target List および Non-Target 検索で Hit した Peak の List と情報 (name は m/z / RT で表記、Positive Hit は緑でハイライト)

Positive Results の設定

#	Mass	RT	Isotope	Library	Formula	Name	Formula	Adduct	Mass (Da)	Extraction Mass (Da)	Found At Mass (Da)	Exp. RT (min)
1						Fenobucarb	C12H17NO2	+H	207.12593	208.13321	208.14114	0
2						Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O	+H	488.03624	489.04352		
3						Imazalil	C14H14Cl2N2	+H	296.04832	297.0556	297.05584	0
4						Linuron	C9H10Cl2N2O2	+H	248.01195	249.01921		
5						Lufenuron	C17H8Cl2F8N2O	+H	509.97842	510.9857		
6						Pirimicarb	C11H18N4O2	+H	238.14298	239.15025		
7						Reserpine	C33H40N2O9	+H	608.27338	609.28065		
8						Tebufozide	C22H28N2O2	+H	352.21508	353.22235	353.19264	0
9						103.0538 / 2.22			103.05383	103.05383		2.22
10						104.1071 / 1.65			104.10713	104.10713		1.65

- i. 選択したデータについて、検出された結果が Session pane にリスト表示され、Positive Result 設定をクリアした成分(Positive Hit)が緑でハイライトされ、Number of positive results に数が表示されます。
- ii.  [icon] にチェックを入れると、緑で表示された成分のみの表示になります。
- iii. 各カラムのタイトル(Mass (Da)など)をダブルクリック、ドラッグすることで、それぞれ列内のソート、列の表示順を変更することができます。

### ① サンプル間の比較

- i. 画面左下の Positive Results の設定をすべて解除 (グレーに変更) します。
- ii. 画面下の Sample. Control を選択します。
- iii. 検出された Peak 中、Threshold (ratio of control)で設定された差 (Training では 50 倍) 以上、差がある成分について、Positive Hit として表示されます。

※ Training では、Sample に 01-Data の Orange, Control に 01-Data の Organic Orange を選択し、Imazaril で確認してください。

選択した Peak の XIC

Sample

Control

1

2

#	Mass	RT	Isotope	Library	Formula	Name	Formula	Adduct	Mass (Da)	Extraction Mass (Da)	Found At Mass (Da)	Exp. RT (min)
1						Fenobucarb	C12H17NO2	+H	207.12593	208.13321	208.14114	0
2						Flufenoxuron	C21H11ClF6N2O	+H	488.03624	489.04352		
3						Imazalil	C14H14Cl2N2	+H	296.04832	297.0556	297.05584	0
4						Linuron	C9H10Cl2N2O2	+H	248.01195	249.01921		
5						Lufenuron	C17H8Cl2F8N2O	+H	509.97842	510.9857		
6						Pirimicarb	C11H18N4O2	+H	238.14298	239.15025		
7						Reserpine	C33H40N2O9	+H	608.27338	609.28065		
8						Tebufozide	C22H28N2O2	+H	352.21508	353.22235	353.19264	0
9						103.0538 / 2.22			103.05383	103.05383		2.22
10						104.1071 / 1.65			104.10713	104.10713		1.65

Sample: 01-Data [orange] Control: 02-Data [Organic orange]

② MS、MS/MS、ライブラリーHitの確認

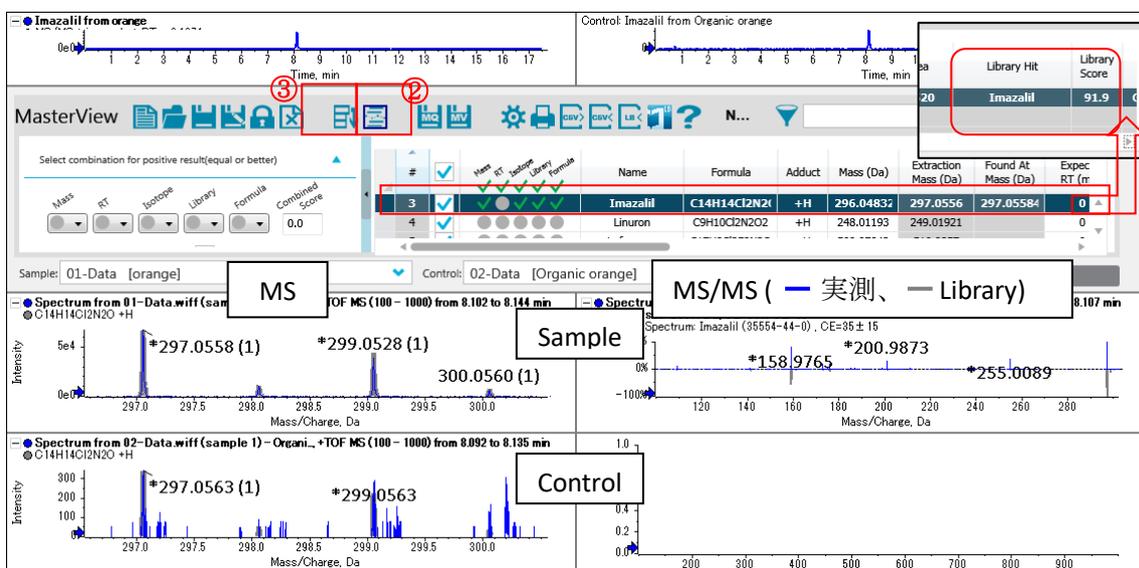
- i. Show MS and MS/MS  をクリックすると、選択した Peak について Sample (上段)、Control (下段) に MS (左) および MS/MS (右) が表示されます。

※ MS/MS が取得されていない場合は表示されません (例: Control)。

- ii. Library に Hit した場合、MS/MS 画面で Library のスペクトルがミラーで表示されます。表示される青が測定値、下側のグレーが Library 中のスペクトルになります。
- iii. List を右にスクロールすることで、Hit した化合物名、Score を確認することができます。

※ スペクトルで表示する Library の Hit を変更することができます。

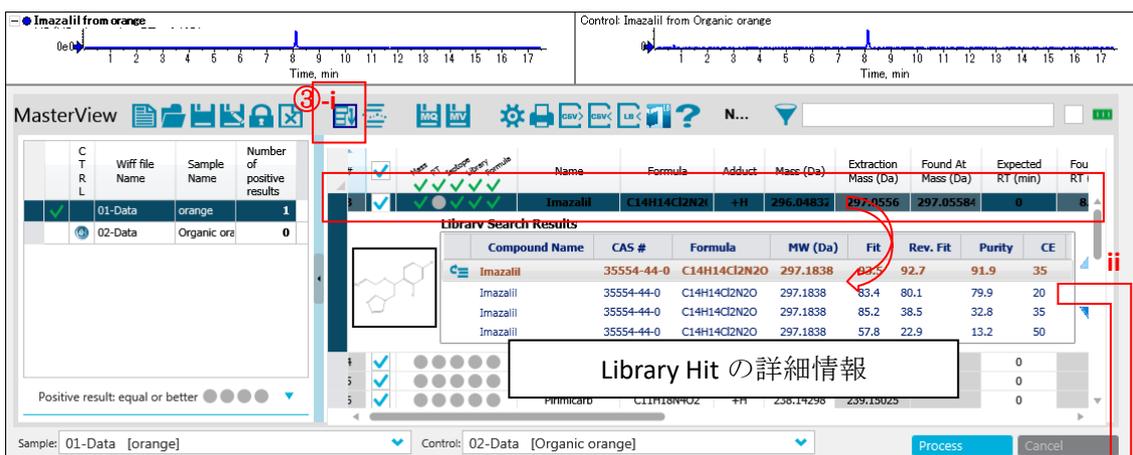
- iv. MS、MS/MS の表示を消す場合は再度同じ  Show MS and MS/MS を クリックしてください。



③ 詳細情報の確認と Chemspider Search、Product Ion の帰属

※ Training では、Imazaril で確認してください。

- Show XIC Details  をクリックすると、選択した Peak の行の下に Library Hit, 組成解析結果の詳細な情報が表示されます。
- List を右にスクロールすることで、Hit した化合物名、Score を確認することができます。



MasterView

Name	Formula	Adduct	Mass (Da)	Extraction Mass (Da)	Found At Mass (Da)	Expected RT (min)	Fou RT (min)
Imazaril	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	+H	296.04832	297.0556	297.05584	0	8

Library Search Results

Compound Name	CAS #	Formula	MW (Da)	Fit	Rev. Fit	Purity	CE
Imazaril	35554-44-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	297.1838	95.7	92.7	91.9	35
Imazaril	35554-44-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	297.1838	83.4	80.1	79.9	20
Imazaril	35554-44-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	297.1838	85.2	38.5	32.8	35
Imazaril	35554-44-0	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	297.1838	57.8	22.9	13.2	50

Library Hit の詳細情報

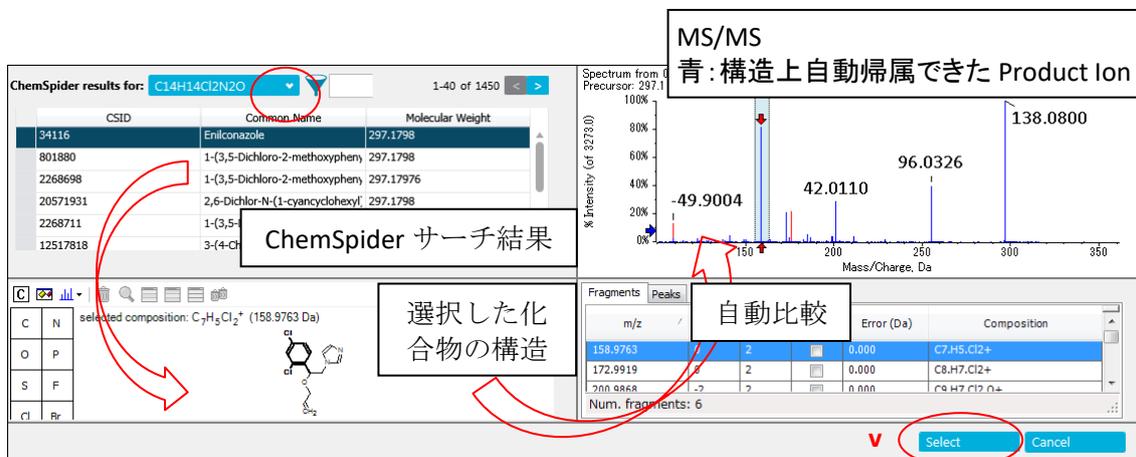
組成解析の詳細情報  
(Hit Count: ChemSpider  
の Database での化合物  
Hit 数)

Area	Library Hit	Library Score	Formula Finder Result	Formula Finder Score	Isotope	RT Width (min)	Width (Da)	Error (mDa)	Inte
37520	Imazaril	91.9	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	95.7	0	2	0.02	0.2	62

Formula Finder Results

Name	Formula	Score	m/z (Da)	Error (ppm)	Error MS/MS (ppm)	Hit Count
Imazaril	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	95.7	297.0556	0.8	1.7	1450
	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> S	21.8	297.05667	2.8	4.8	0

- 組成解析結果 (training では C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O) をクリックします。
- Chemspider 検索結果画面が開き、自動で MS/MS の帰属が行われます。
  - ※ サーチ結果の List で化合物を選択しなおすことで、構造、帰属が自動で更新されます。
- 推定した構造を選択し、Select をクリックすることで、目的のピークに構造式が保存され、結果の Mol 欄に構造式が表示されます。



ChemSpider results for: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O

CSID	Common Name	Molecular Weight
34116	Eniconazole	297.1798
801880	1-(3,5-Dichloro-2-methoxyphenyl)	297.1798
2268698	1-(3,5-Dichloro-2-methoxyphenyl)	297.17976
20571931	2,6-Dichloro-N-(1-cyano-cyclohexyl)	297.1798
2268711	1-(3,5-Dichloro-2-methoxyphenyl)	297.1798
12517818	3-(4-Cl-2-methoxyphenyl)	297.1798

ChemSpider サーチ結果

MS/MS  
青: 構造上自動帰属できた Product Ion

自動比較

m/z	Intensity	Error (Da)	Composition
158.9763	100%	0.000	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>+</sup>
172.9919	~80%	0.000	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>+</sup>
200.9868	~40%	0.000	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>2</sub> O <sup>+</sup>

選択した化合物の構造

Select Cancel

## 6.5 保存と印刷

### ① 解析結果の保存

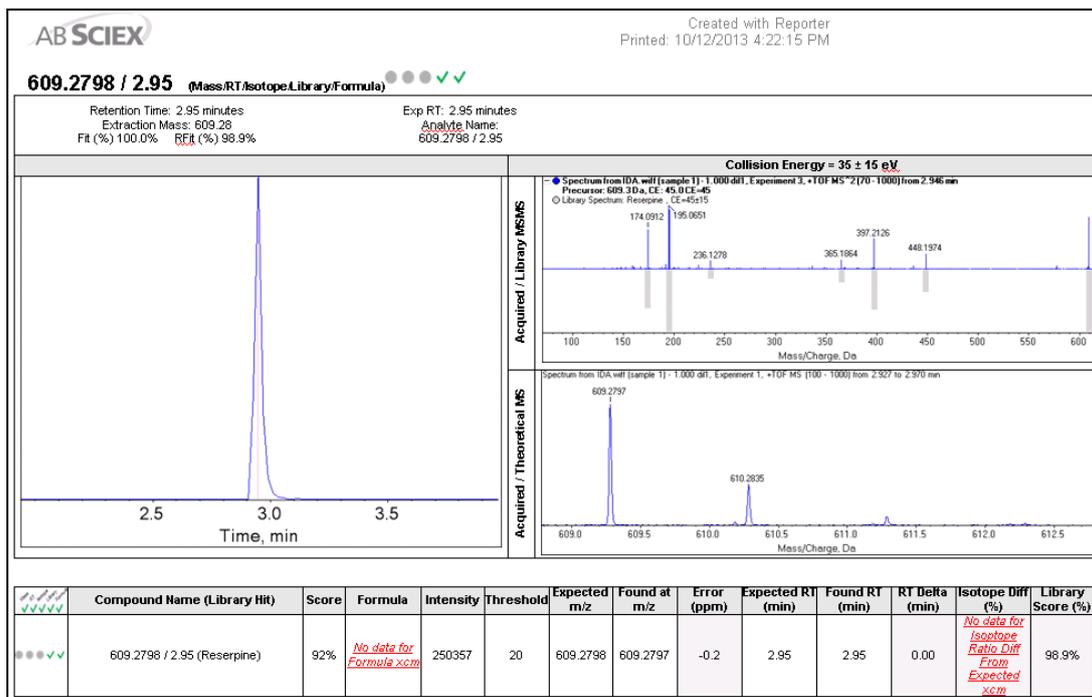
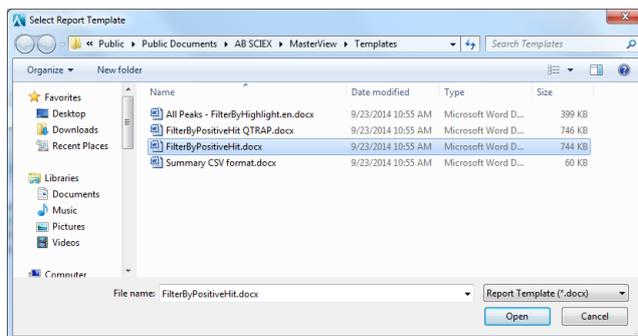
- i. Save session  をクリックします。
  - ※ Training では、Training と入力します。
  - ※ 開く場合は、メニューバーの MasterView/Open Result から開きます。

### ② MultiQuant、MarkerView 用の解析結果の保存

- i. Save MultiQuant Method as Text...  ボタンで、MultiQuant のテキストメソッドとして、Save As MarkerView Peaks...  ボタンで、MarkerView の Peaks ファイルとして保存できます。

### ③ 解析結果の word レポート作成

- i. Generate Report  をクリックし、目的の Template (Training では FilterByPositiveHit) を選択し、Open を選びます。
- ii. 保存先、ファイル名を指定し、保存を行います。



報告書例

# 定量解析 (MultiQuant™ Software)

## 7 定量解析 (MultiQuant™ Software)

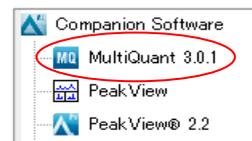
- ※ MultiQuant™ Softwareは、TripleTOF®シリーズで取得したデータを用いて定量を行うためのソフトウェアです。TOF MS、Product Ion、MRM<sup>HR</sup> (TOF MS+Product Ion)、Scheduled MRM<sup>HR</sup> 等で取得したデータについて、定量を行います。
- ※ Training では、MRM<sup>HR</sup> (TOF MS+Product Ion) で取得したデータ (右表の溶液) を使用します。
- ※ MultiQuant™ Software の詳細な説明につきましては、ユーザーマニュアル (日本文、英文)、Reference Guide (英文) を参考ください。
- ※ 英文の資料につきましては、MultiQuant Software の Help から参照することが可能です。

APCI Positive Calibration Solution

STD0	Blank
STD1	1000 倍希釈 (0.001)
STD2	100 倍希釈 (0.010)
STD3	10 倍希釈 (0.100)
STD4	原液 (1.000)
Unknown	33 倍希釈 (0.030)

### 7.1 ソフトウェアの起動

- ① Analyst の Navigation Bar の MultiQuant をダブルクリック、あるいは、Desktop のショートカットをダブルクリックし、MultiQuant を立ち上げます。



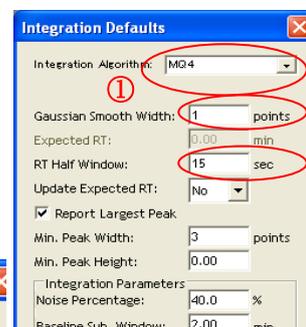
- ② 以下の画面が表示されるので Neither を選択し、プロジェクトを選択します。



- ※ Training では Project : TT\_Training を選びます。

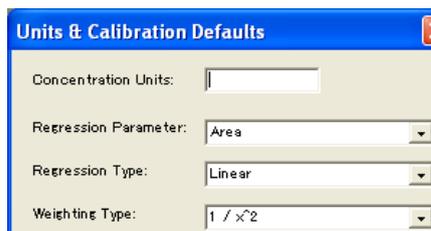
### 7.2 初期設定

- ① ツールバーの Edit -> User Integration Defaults を開き、使用するアルゴリズムを選択します。Training では MQ4 を使用し、右図の通りに入力します。



- ② ツールバーの Edit -> User Units & Calibration Defaults を開き、使用する濃度単位、定量計算に用いるパラメータ、検量線の条件を設定します。

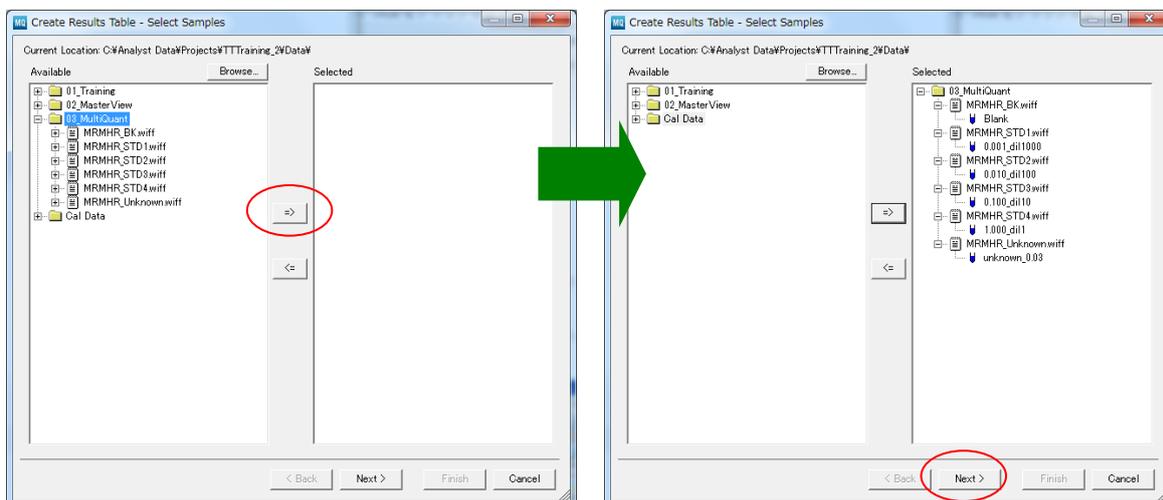
- ※ Training では単位は空カラム、その他は図のように入力します。



### 7.3 定量解析

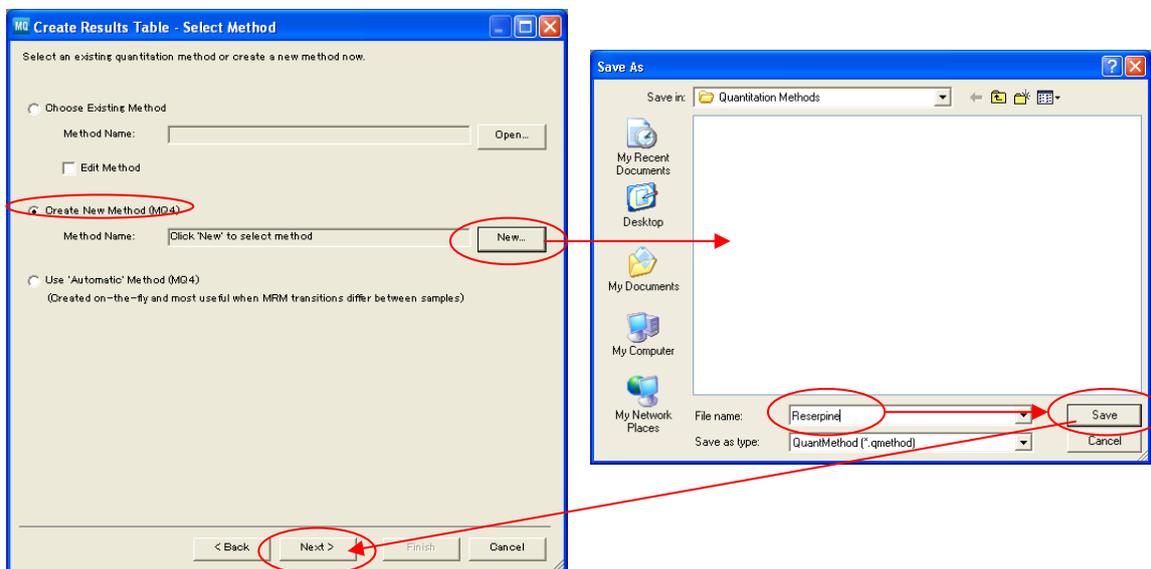
- ① File -> New Results Table にて解析するデータを選択し、画面右側にサンプルを移動させたら、Next をクリックします。

※ Training では 03\_MultiQuant フォルダ内のデータすべてを選びます。  
03\_MultiQuant フォルダをクリックし、⇒をクリックします。



- ② Create New Method(MQ4)を選択した後 New をクリックし、ファイル名を入力して Save します。元の画面に戻って Next をクリックします。

※ Training では Reserpine と入力します。



※ 2回目以降の定量解析では、Chose Exiting Method の Open から既存の定量メソッドを使用することができます。

- ③ ピーク認識を行うための代表サンプルを選択し、Next をクリックします。

※ Training では STD3 を選択します。

- ④ 化合物名と定量に使用するイオンの情報を入力します。

※ Training では以下のように入力します。

- Experiment のプルダウンから“1 TOFMS”を選択し、Name : Reserpine-MS、Start-Stop : 609.2807-0.02 (Precursor Ion の精密質量-Width (Da)) と入力します。

Experiment: 1 TOF MS (100 - 1000)

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop
1	<input type="checkbox"/>	Reserpine-MS			609.2807-0.02

- Experiment のプルダウンから“7 TOF PI of 609.3”を選択し、Name : Reserpine-PI、Start-Stop : 195.0652-0.02 (Product Ion の精密質量- Width (Da)) と入力します。

Experiment: 7 TOF PI of 609.3 (70 - 1000)

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop
1	<input type="checkbox"/>	Reserpine-PI			195.0652-0.02

- ※ 複数の Product Ion を合算する場合は、テーブル上で右クリック→Sum Multiple Ions を選択すると、Product Ion を入力するカラムが増え、複数入力できるようになります。

Product Ion を複数入力できます。

Experiment: 7 TOF PI of 609.3 (70 - 1000)

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop - 1	Start - Stop - 2	Start - Stop - 3
1	<input type="checkbox"/>	Reserpine-PI_merge			195.0652-0.02	174.0913-0.02	397.212-0.02

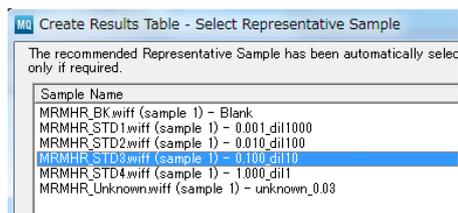
- ※ Scheduled MRM アルゴリズムを用いた測定で、定量したい化合物がどの Experiment で測定されているかわからないときには、PeakView® Software などでデータを開いて確認します。

- ⑤ Next をクリックすると、すべての Experiment を確認していないとの警告が出ますので、OK をクリックします。

- ⑥ 代表サンプルのピークが自動で積分されるので、MS および PI の両方について確認をします。

※ 積分されていない場合は、左ドラッグでピーク部分を囲みます

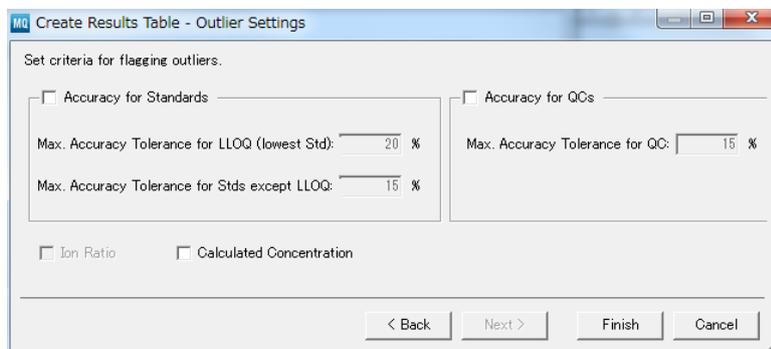
※ 複数化合物がある場合はすべてについてピークが積分されているか確認します。



⑦ **Outlier Settings** では、必要に応じて、真度からの外れ値にフラグを付けることができます

※ **Training** ではすべてのチェックを外します。

※ 基準から外れている測定結果の文字は黒からピンクに変わります。



⑧ 確認が終了したら **Finish** をクリックします。

⑨ **Result Table** が作成され、表示されます。

※ メニューバーから **Edit -> Cache all Chromatograms Now** を選ぶと、一度 **Chromatogram** を開いた後、キャッシュにクロマトのデータが保存されるので、その後の表示（動作）が早くなります。

⑩ 表示するカラムや桁数を変更したい場合は、テーブル上で右クリック→**Column Settings** で設定を行います。入力した **Format** 通りに有効数字や対数表示が切り替わります。

※ **Training** では、**Actual Concentration** の **Number Format** に「0.000」と入力し、**Sample ID**、**IS Name**、**Component Group Name** の「**Visible**」のチェックをはずし、非表示にします。

※ ここで入力した有効桁数以上の値は、定量テーブルに入力表示されないだけでなく、定量計算にも反映されません。

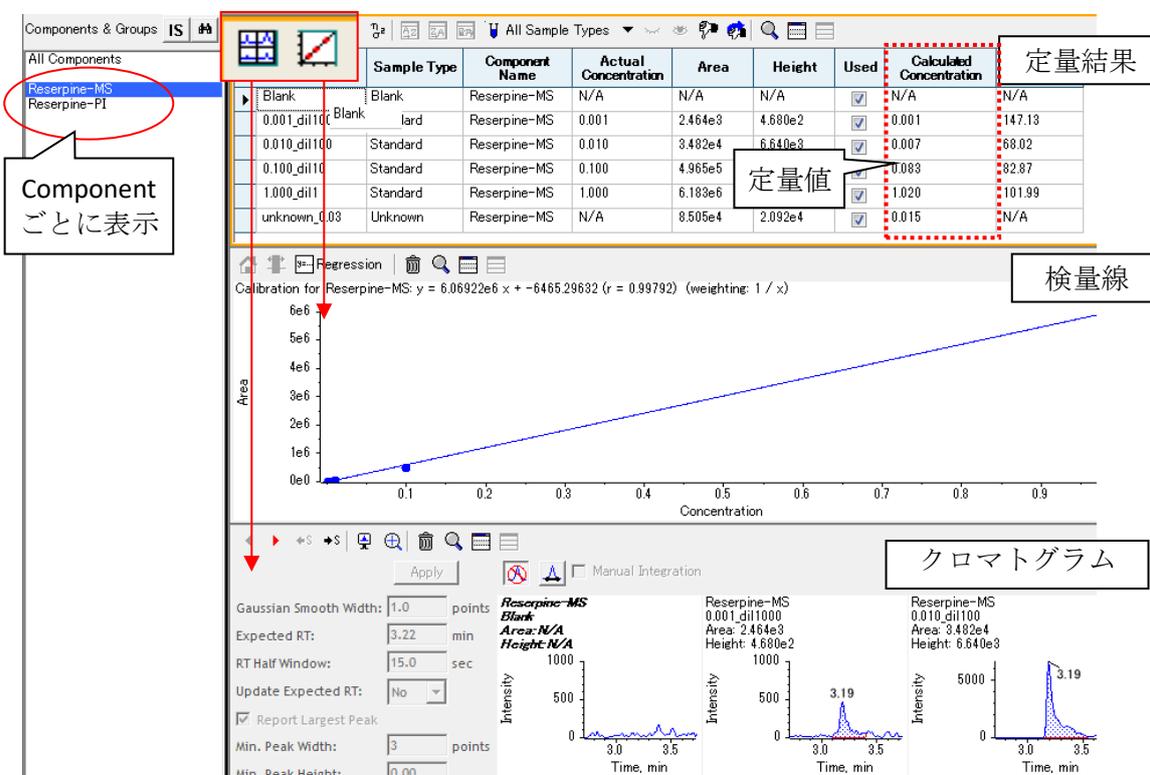
Column Name	Visible	Number Format
Accuracy	<input checked="" type="checkbox"/>	0.00
Acq. Method Name	<input type="checkbox"/>	
Acquisition Date & Time	<input type="checkbox"/>	
Actual Concentration	<input checked="" type="checkbox"/>	0.000
Area	<input checked="" type="checkbox"/>	0.000e0
Area / Height	<input type="checkbox"/>	0.00
Area Ratio	<input type="checkbox"/>	0.000e0
Baseline Delta / Height	<input type="checkbox"/>	0.000e0

⑪ サンプルタイプと標準溶液濃度を図のように入力します。サンプルタイプはプルダウンから選択します。すべての **Components** について入力します。

Sample Name	Sample Type	Component Name	Actual Concentration	Area	Height
Blank	Blank	Unknown	7.386e2	1.636e2	
0.001 dil1000	Standard	Unknown	2.464e3	4.680e2	
100	Standard	Standard	3.482e4	6.640e3	
10	Standard	Quality Control	4.965e5	9.839e4	
1	Standard	Blank	6.183e6	1.009e6	
unknown_0.03	Unknown	Solvent	8.505e4	2.092e4	

※ **Actual Concentration** に入力した値を他の全ての **Component** に反映させるには、テーブル上で右クリックし、**Apply Current Analyte's Actual Concentrations to All** を選択します。

⑫   をクリックし、検量線及びピークを表示させます。Result Table、クロマト



The screenshot displays the software interface with three main sections:

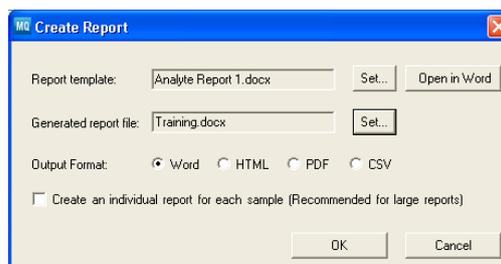
- Result Table:** A table with columns: Sample Type, Component Name, Actual Concentration, Area, Height, Used, and Calculated Concentration. The 'Used' column has checkboxes. A red dashed box highlights the 'Calculated Concentration' column, labeled '定量結果' (Quantification Result). A red circle highlights the 'Component Name' column, labeled 'Component ごとに表示' (Display by Component).
- 検量線 (Calibration Curve):** A graph showing Area vs. Concentration for Reserpine-MS. The equation is  $y = 6.0692266x + -6465.29632$  with  $r = 0.99792$ . A red arrow points to the 'Area' column in the table above.
- クロマトグラム (Chromatogram):** Three small chromatograms showing peaks at 3.19 minutes. A red arrow points to the 'Height' column in the table above.

グラム、検量線はリンクしており、別の Component を選択すると表示が変わります。

- ※ 複数の化合物がある時、比較したい成分を Control キーを押しながら複数選択することができます。この場合、Result Table とクロマト表示画面には選択した化合物のすべての情報が表示され、検量線は重ね書きされます。
- ※ Blank データなど、不検出にしたいデータを選択後、クロマト表示画面の  ボタンをクリックすると、ピークの不検出指定をすることができます。
- ※ Result Table の Used カラムのチェックを外すと、そのデータポイントを検量線から除外することができます。

⑬ ツールバーの File -> Save As で名前を付けて保存します。

- ※ Training では、Training と名前を付けて保存します。
- ※ 必要に応じて、Report を作成します。ツールバーの File から Create Report を選択し、目的のテンプレート、出力形式を選択し、名前を付けて OK をクリックします。



# 装置のチューニング

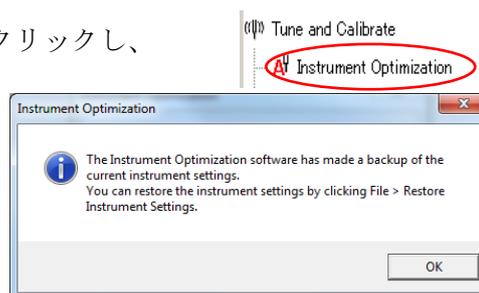
## ～Instrument Optimization～

### 8 装置のチューニング ～Instrument Optimization～

- \* 最良の感度、分解能で測定するため、質量分析計の各パラメータを自動で最適化する機能です。装置のメンテナンスによる真空の解除、復帰後など、分解能が不十分な場合に実施してください。
- \* 標準溶液として、以下の溶液を使用します。TOF MS 測定にて、あらかじめピークが検出されていることを確認しておきます。

	極性	使用する溶液
6600 & 5600+	Positive	APCI Positive Calibration Solution 原液(#4460131)
	Negative	APCI Negative Calibration Solution 原液(#4460134)
4600	Positive & Negative	Tuning Solution (CsI 500nM / Sex Pheromone Inhibitor iPD1 50nM, #4457953) : Taurocholic acid (1ng/uL, #4405241) =1:1

- ① Navigation Bar の Instrument Optimization をクリックし、Instrument Optimization を起動します。
- ② 右図のメッセージが表示された場合、OK をクリックし、Backup を取ります。



- ③ 下図を参考に Instrument Optimization 画面で、目的の Polarity、使用する Tuning Solution を選択します。
- ④ Verify Performace のチェックを外します。
- ⑤ Select the instrument components to Optimize で必要な Mode にチェックをかけて選択後、Next をクリックします。
  - \* Enhance 機能で使用する場合は Enhance Ion にチェックをかけます。
  - \* 分解能が改善しない場合は TDC Initialization にチェックをかけて実行します。

### TripleTOF® 6600 / 5600+ System の画面

Positive: APCI Positive Calibration Solution  
Negative: APCI Negative Calibration Solution

③ Tuning Solution: APCI Positive Calibration Solution

③ Polarity: Positive

④ Verify Performance Only

Select the instrument components to optimize: ⑤

TOF MS:  Tune,  Mass Calibrate

Product Ion: **High Resolution**  Tune,  Mass Calibrate; **High Sensitivity**  Tune,  Mass Calibrate

Detector:  Sensitivity,  Channel Alignment

Advanced:  TDC Initialization,  Q1 Resolution Target Width (Da) 0.70,  Q1 Calibration,  Enhance Ion

⑤ Next->

選択しないでください。

### TripleTOF® 4600 System の画面

Positive: CsI\_ALILTLVS\_Reference  
Negative: CsI-Taurocholic acid\*

③ Tuning Solution: CsI\_ALILTLVS\_Reference

③ Polarity: Positive

④ Verify Performance Only

Select the instrument components to optimize: ⑤

TOF MS:  Tune,  Mass Calibrate

Product Ion:  Tune,  Mass Calibrate

Detector:  Sensitivity,  Channel Alignment

Advanced:  TDC Initialization,  Q1 Resolution Target Width (Da) 0.75,  Q1 Calibration,  Enhance Ion

⑤ Next->

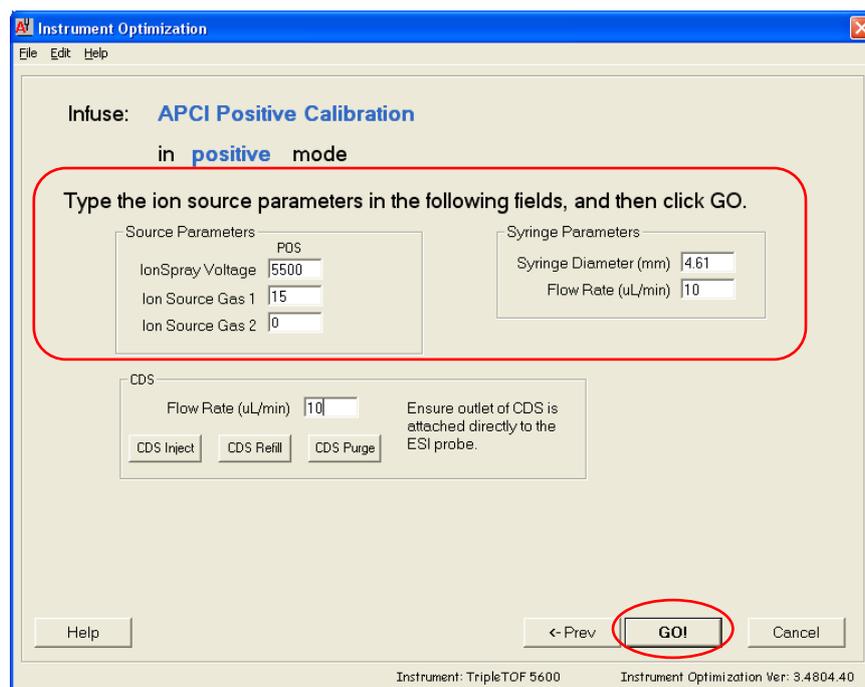
選択しないでください。

\* CsI-Taurocholic acid がリストにない場合は、Taurocholic acid の Reference Table を Copy して TOFMS の Reference Table のリン酸イオン m/z 79.9568 をヨウ化物イオン m/z 126.9050 に変更して作成してください。

- ⑥ 必要に応じ、File から Backup Instrument Settings Files を選択し、保存名を入力して保存します。  
(現在のパラメータが保存されます。以前行った設定に戻す場合は、File から Restore Instrument Settings Files を選択し、backup したファイルを選択します)。



- ⑦ 下図を参考に、イオン源の設定（初期値でも使用可能）と使用するシリンジの内径と Flow Rate を入力し、Go!をクリックします。



- ⑧ 自動最適化が実行され、結果のレポートが作成されます。
- \* 印刷にて pdf にて保存することができます。
  - \* データは、以下の場所に、取得日時の入ったフォルダ名で保存されます。  
D:\Analyst Data\Projects\API Instrument\Data\Instrument Optimization

# メンテナンス（イオンソースおよびインターフェース）

## 9 メンテナンス（イオンソースおよびインターフェース）

### イオン源、カーテンプレート、オリフィスプレートのメンテナンス

- \* 装置が稼動している状態で行うことができます。装置を止める必要はありません。
- \* 作業中は、パウダーフリーのノンラテックス製の手袋を着用してください。

- ① Tune Mode か Acquire Mode で、Tool Bar の Queue manager  をクリック後、Stand by  をクリックして装置を Standby にします。

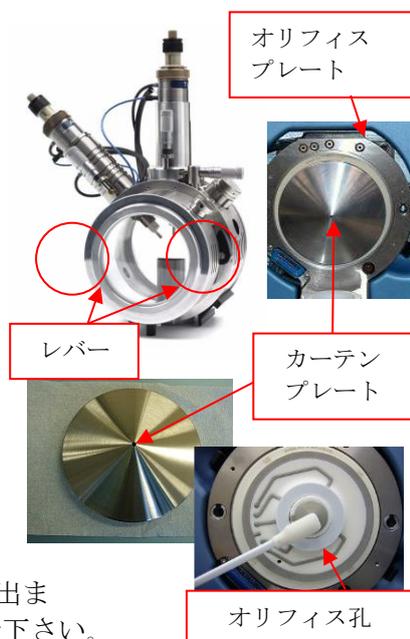
※ 測定を行っている時は、測定を中止するか終了するまでお待ちください。

- ② イオン源両側のレバーを上げて、イオン源の固定を解除します。
- ③ イオン源を軽く持ち上げながら手前に引いてはずします。
- ④ オリフィスプレートをおさえながら、カーテンプレートまっすぐ手前に引いて取り外します。
- ⑤ 取り外したカーテンプレートを 50% メタノールや 50% アセトニトリル等で拭きます。
- ⑥ オリフィスプレートのオリフィス孔の周辺を、スワブを使用して、50% メタノールや 50% アセトニトリル等で拭きます。

※ キムワイブは使っているうちに細かい屑が出ますので、オリフィスプレートには使わないで下さい。

※ オリフィス孔は薄いので変形させないように注意してください。

- ⑦ カーテンプレートを戻します。
- ⑧ イオンソースを本体へ戻します。



#### [メンテナンスに使用する備品について]

- スワブ：精密機器の清掃に使用する綿棒状の清掃用具です
- Chemtronics 社製の Foamtips が推奨です。
- 大：Cat.No.CF2050（オリフィス表面の清掃用など）
- 中：CF3050（スキマーや QJet<sup>®</sup> ion guide の清掃用など）
- 小：CF4050（オリフィス孔の清掃用など）
- ノンラテックス製手袋：MICRO FLEX 「ネオプロ」など

# 装置の再起動、停止および起動 (Shutdown & Startup)

## 10 装置の再起動、停止および起動 (Shutdown & Startup)

### 10.1 装置の再起動

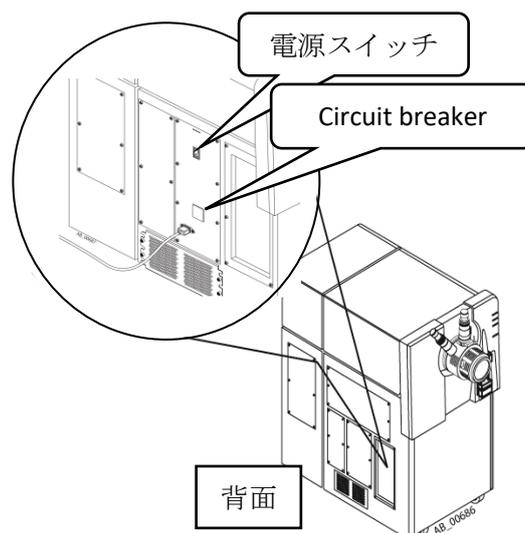
- ① 測定終了後、Tune Mode か Acquire Mode で、Tool Bar の  クリック後、 をクリックして装置を Standby にします。
- ② 本体の背面の電源スイッチを切り 15 秒程度後、再度立ち上げます。
- ③ 必要に応じて PC も再起動します。
- ④ 本体内部の真空度が戻るまで数分待ちます。

### 10.2 装置の停止

- ① 測定終了後、Tune Mode か Acquire Mode で、Tool Bar の  クリック後、 をクリックして装置を Standby にします。
- ② 本体の電源スイッチを切り、15 分程度待ちます。
- ③ 外部のロータリーポンプを切ります。
- ④ 必要に応じて PC も終了します。  
※ メンテナンスの場合は特に必要ありません。
- ⑤ 本体内部が大気圧に戻るまで 30 分以上待ちます。
- ⑥ Circuit breaker switch のカバーを外し、Circuit breaker switch を切ります。
- ⑦ 必要に応じて、電源ケーブルを抜き、ガスの供給を切ります。

### 10.3 装置の起動

- ① ガスを供給します。
- ② N2 ジェネレータの場合は酸素濃度が安定するまで (約 10 分) お待ちください。
- ③ 電源ケーブルをさします。
- ④ PC の電源を切っていた場合は PC 立ち上げ、Log in してください。
- ⑤ 外部のロータリーポンプを立ち上げます。
- ⑥ Circuit breaker switch のカバーを外し、Circuit breaker switch を入れます。
- ⑦ 電源スイッチを入れます。
- ⑧ Analyst<sup>®</sup> TF software を起動し装置の状態を確認してください。



# トラブルの回避と対処

## 11 トラブルの回避と対処

### 11.1 トラブルの回避

※ テンポラリーファイル (\*.tmp) やバックアップファイルがハードディスクを圧迫しているためにコンピューターの動きが遅くなることがあります。このため定期的に以下の作業を行うことを勧めます。

- ① すべてのソフトウェアを閉じ、PC を再起動します。
- ② 起動後、Start → Search Programs and Files に \*.tmp と入力し、エンターします。
- ③ 開いた画面で検索場所を Computer に変更し、再度検索します。
- ④ 得られた検索結果すべてを削除します。
- ⑤ Are you... のメッセージが出ますので Yes をクリックします。
- ⑥ 消去できない File 以外を delete し、検索画面を終了します。
- ⑦ デスクトップ上の Recycle Bin を右クリックし、Empty trash でごみ箱を空にします。



### 11.2 トラブルの対処 1

※ error などが生じた際に、以下の方法で対応してください。

- ① Analyst<sup>®</sup> TF software を終了します。
- ② Desktop の SERVICES をダブルクリックします。
- ③ AnalystService を選択後、あるいは Stop で AnalystService を終了します。
- ④ HPLC との接続で Error が生じた場合は、必要に応じて HPLC 再起動します。

※ Waters 社の HPLC を使用している場合は、HPLC 再起動後、②の Service 画面で Acuity Service を起動します。

- ⑤ Analyst<sup>®</sup> TF software を再度立ち上げます。

※ 以上の方法で Hardware Configuration できないなど Analyst Software が正常に起動しない場合はトラブルの対処 2 へ進んでください。

### 11.3 トラブルの対処 2

※ トラブル対処 1 の方法で解決しない場合は、以下の方法で対応してください。

- ① トラブルの対処 1 の方法で Analyst<sup>®</sup> TF software, AnalystServices を終了します。
- ② コンピューターを再起動後、Analyst<sup>®</sup> TF software を再度立ち上げます。

※ 以上の方法で Analyst Software が正常に起動しない場合はトラブルの対処 1 の方法で再度 Analyst<sup>®</sup> TF software, AnalystServices を終了後、Analyst<sup>®</sup> TF software を再起動してください。

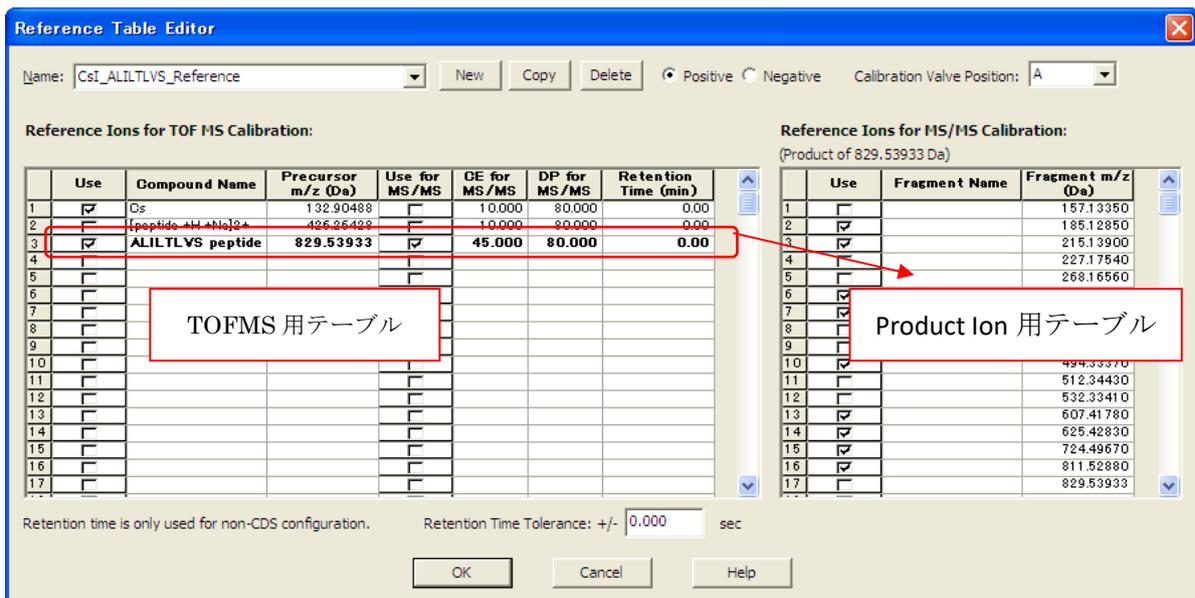
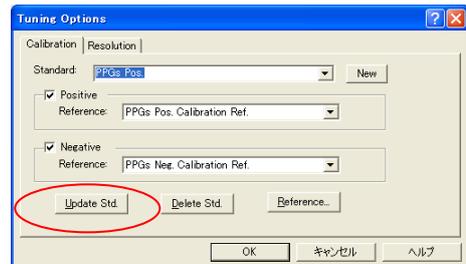
# 添付資料

## 12 添付資料

### 12.1 Reference Table の編集・作成

※ Training では行いません。

- ① Analyst のメニューバーから、Tools -> Settings -> Tuning Options... を選択します。
- ② 開いた Tuning Options のウィンドウ上で、Reference ボタンを押します。
- ③ Reference Table Editor で、New ボタンで新規にテーブルを作成するか、Copy ボタンで既存のテーブルをコピーして Name に名前をつけて編集します。



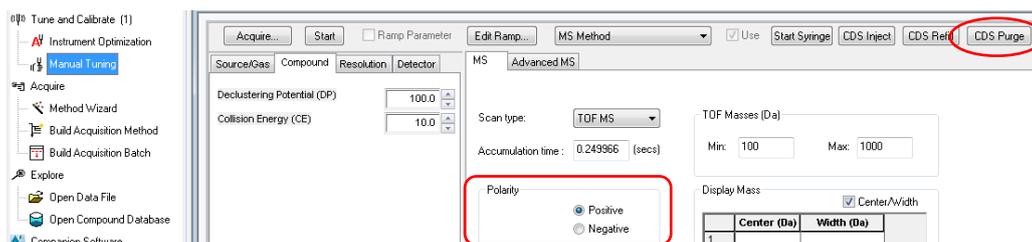
- ④ TOF MS で設定した化合物中の 1 化合物の Use for MS/MS にチェックを付け、MS/MS 用のキャリブレーションイオンに選択し MS/MS 測定の入力条件を入力します。
  - ※ MS/MS で各 2 つ以上のキャリブレーションイオンを選択 (Use にチェック) します。
  - ※ 溶液の導入に CDS を使用する場合は、右上の Calibration Valve Position に溶液ポートを接続した Valve Position を選択します。
- ⑤ OK を押して Reference Table Editor ウィンドウを閉じます。
- ⑥ Tuning Options ウィンドウで、Update Std. ボタンを押した後、OK を押して Tuning Options ウィンドウを閉じます。

## 12.2 CDS の動作について

※ CDS のラインにエアが混入していると送液が行われず、Auto Calibration が失敗する場合があります。その場合は、下記に示すように Purge を行います。

- ① Navigation Bar の Manual Tuning をダブルクリックし、Tune Method Editor 画面を起動します。
- ② Polarity には分析する極性を選び、**CDS Purge** を押します。

※ 通常、Calibration Valve Position は Positive Mode : A、Negative Mode : B です。



### CDS Inject:

ボタンを押すと、Calibration Reference Table で設定した溶媒ボトルから CDS Inject flowrate で設定した流速で標準溶液を導入します。

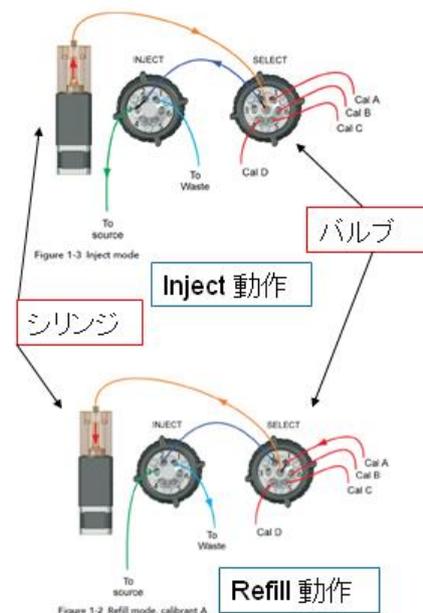
### CDS Refill:

CDS Refill/Purge flow rate で設定した流速で、溶液の補充を行います。通常は、1000 $\mu$ L/min で変更する必要はありません。

### CDS Purge:

パージ動作を行います。パージ動作は、CDS Refill/Purge flow rate で設定した流速で、現在シリンジを満たしている溶媒の排出、その後、次に使用する溶液の補充の動作をそれぞれ 2 回行います。

※ 約 5 分程度かかります。



### CDS 使用時の注意点

- CDS を APCI プローブへ導入し、キャリブレーションに使用している場合、APCI でイオン化するため、Gas2, TEM の値が必ず必要です、GS2 や TEM が 0 ではイオン化が起きません。一例として、GS2=50, TEM = 550 など、どちらも、APCI のイオン化が可能な数値を入力してください。
- ESI プローブを利用する場合、酢酸アンモニウムや、ギ酸アンモニウムなどのバッファを添加した溶媒のほうが、感度がよく安定したイオン化が期待できます。
- APCI, ESI とともに、相互にスプレーの干渉があるため、HPLC を流した状態でプローブのポジション等をある程度最適化をする必要があります。

特に ESI から、CDS 溶液を導入する場合、高分子側のピークがプローブポジションの影響を受けることがあります。これらのピークがうまく検出されない場合は、ESI プローブをオリフィス孔に対して近づけてみてください。

## 12.3 Library への登録 (LibraryView® Software)

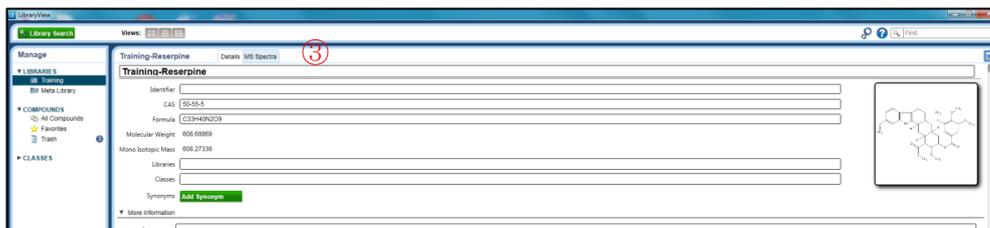
\* IDA で取得した MS/MS を LibraryView を使って登録する方法です。

① LibraryView® Software を開きます。

②  をクリックし、登録する化合物情報を入力します。

※ 化合物名と Formula は必ず入力してください。

※ Training では化合物名 Training-Reserpine、Formula: C33H40N2O9、構造式を登録します。構造式は TT\_Training\Data\Mol Files の Reserpine 構造式を使います。



③ MS Spectra タブをクリックします。

④ Save Changes のメッセージが出ますので Yes をクリックします。

⑤  Edit Mode、 Add Spectra をクリックし、登録するデータファイル (Training では Data\02\_MasterView にある 04\_Reserpine\_IDA) を選択します。

⑥ Name の三角印をクリックします。

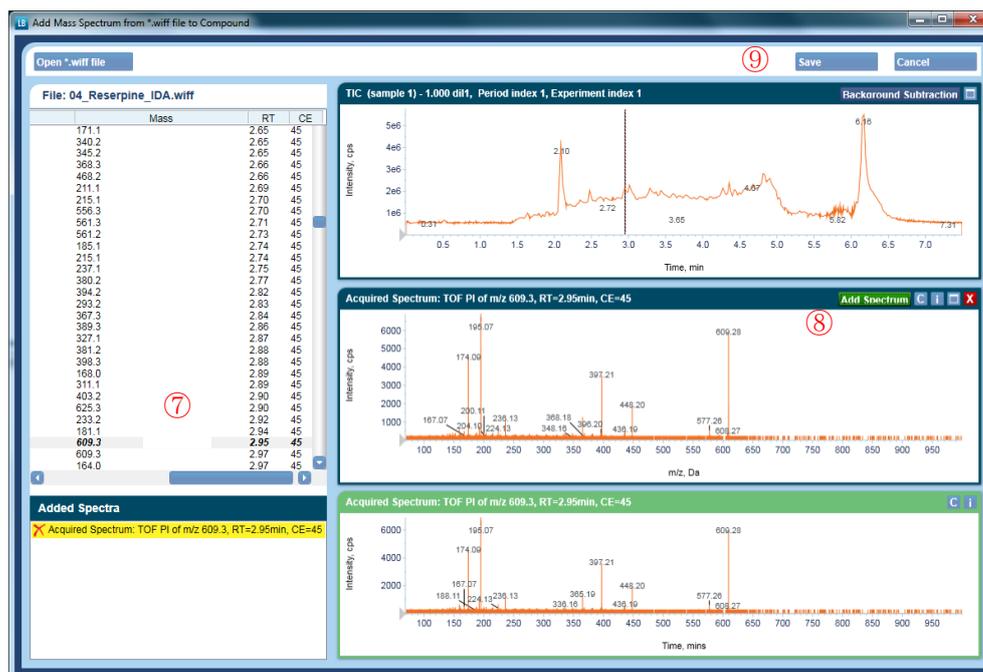
⑦ 登録したい MS/MS を Mass、RT の情報を基に選択します。

File: 04_Reserpine_IDA.wiff	
Name	Wiff File Name
▶ [DA] 1.000 dil1	04_Reserpine_IDA.wiff

\* Training では Mass: 609.3、RT: 2.95min を選択してください。

⑧ Add Spestram をクリックします。

⑨ Save をクリックすることで登録されます。



## 12.4 MasterView を利用した MRM<sup>HR</sup> の定量解析メソッドの作成

MRM<sup>HR</sup> の定量メソッド作成は MasterView を使用した方法が便利です。

- ① PeakView のツールバー-> MasterView から New Session を選択し、MRM<sup>HR</sup> で取得したデータを開きます。

\* Training では 03\_MultiQuant フォルダの MRMHR\_STD4 を使用します。

### Precursor Ion の情報のみ登録の場合

- ① 各カラムにおいて Name : 化合物名、Mass (Da) : Precursor Ion の m/z 値、Width(Da) : 幅 (例 0.02 : ±10mDa) を入力します。

\* 予め組成式が分かっている場合は Formula カラムに入力し、Adduct カラムに付加イオンを入力します。Extraction Mass (Da) カラムは自動計算されます。

\* Excel からコピー&ペーストができます。

Name	Formula	Mass (Da)	Adduct	Extraction Mass (Da)	Width (Da)	Fragment Mass (Da)	Extraction Experiment (≠)	Expected RT (min)
aminoheptanoic acid		146.11756		146.11756	0.02			0
amino-dPEG 4-acid				5981	0.02			0
clomipramine		315.16225		315.16225	0.02			0
amino-dPEG 6-acid		354.21224		354.21224	0.02			0
amino-dPEG 8-acid		442.26467		442.26467	0.02			0
reserpine		609.2806		609.2806	0.02			0
amino-dPEG 12-acid		618.36953		618.36953	0.02			0
Hexakis(2,2,3,3-tetrafluor		922.0098		922.0098	0.02			0

- ② Process ボタンをクリックしてピーク抽出を行います。
- ③ Save MultiQuant Method As Text ボタン  をクリックし、名前を付けて保存します。
- ④ MultiQuant ソフトウェアを起動し、ツールバーの File -> Import -> Quantitation Method from Text にて③で保存したファイルを選択し、Open をクリックします。
- ⑤ Select Sample 画面が表示されるので、代表サンプルを1つ選択し、OK をクリックします。

\* Training では 03\_MultiQuant フォルダの MRMHR\_STD4 を使用します。

- ⑥ ①で設定した情報を確認します。

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop
1	<input type="checkbox"/>	aminoheptanoic acid	aminoheptanoic acid		146.1076 - 146.1276
2	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 4-acid	amino-dPEG 4-acid		266.1498 - 266.1698
3	<input type="checkbox"/>	clomipramine	clomipramine		315.1523 - 315.1723
4	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 6-acid	amino-dPEG 6-acid		354.2022 - 354.2222
5	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 8-acid	amino-dPEG 8-acid		442.2547 - 442.2747
6	<input type="checkbox"/>	reserpine	reserpine		609.2707 - 609.2907
7	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 12-acid	amino-dPEG 12-acid		618.3595 - 618.3795
8	<input type="checkbox"/>	Hexakis(2,2,3,3-tetraflu...	Hexakis(2,2,3,3-tetraflu...		921.9998 - 922.0198

### Precursor Ion / Fragment Ion の情報を登録した場合

① 各カラムにおいて Name : 化合物名、Mass(Da) : Precursor Ion の m/z 値、Width(Da) : 幅 (例 0.02 : ±10mDa)、Fragment Mass : 定量に使用する Product Ion の m/z 値を入力します。

\* Training では Reserpine の Product Ion m/z195.065 を Fragment Mass カラムに入力します。

Name	Formula	Mass (Da)	Adduct	Extraction Mass (Da)	Width (Da)	Fragment Mass (Da)	Extraction Experiment (#)	Expected RT (min)
aminoheptanoic acid		146.11756		146.11756	0.02			0
amino-dPEG 4-acid		266.15981		266.15981	0.02			0
clomipramine		315.16225		315.16225	0.02			0
amino-dPEG 6-acid		354.21224		354.21224	0.02			0
amino-dPEG 8-acid		442.26467		442.26467	0.02			0
<b>reserpine</b>		<b>609.2806</b>		<b>609.2806</b>	<b>0.02</b>	<b>195.065</b>		<b>0</b>
amino-dPEG 12-acid		618.36953		618.36953	0.02			0
Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoro		922.0098		922.0098	0.02			0

② Process ボタンをクリックしてピーク抽出を行います。

\* Extraction Experiment (#) は自動認識されます。

③ 上述の③～⑤の操作を行います。

④ ①で設定した情報を確認します。

\* MasterView で Fragment Mass カラムに入力した化合物は、MultiQuant 上では Experiment 1 TOF MS から Precursor Ion 情報が除かれ、代わりに Experiment X “X TOF PI of XX (ここでは Experiment 7 TOF PI of 609.3) に、定量に使用する Fragment Mass の情報が入ります。この成分の MS 定量をするには、手入力で情報を追加します。

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop
1	<input type="checkbox"/>	aminoheptanoic acid	aminoheptanoic acid		146.1076 - 146.1276
2	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 4-acid	amino-dPEG 4-acid		266.1498 - 266.1698
3	<input type="checkbox"/>	clomipramine	clomipramine		315.1523 - 315.1723
4	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 6-acid	amino-dPEG 6-acid		354.2022 - 354.2222
5	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 8-acid	amino-dPEG 8-acid		442.2547 - 442.2747
6	<input type="checkbox"/>	amino-dPEG 12-acid	amino-dPEG 12-acid		618.3595 - 618.3795
7	<input type="checkbox"/>	Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoroproxy)ph...	Hexakis(2,2,3,3-tetrafluoroproxy)ph...		921.9998 - 922.0198

Row	IS	Name	Group	IS Name	Start - Stop
1	<input type="checkbox"/>	reserpine	reserpine		195.0550 - 195.0750

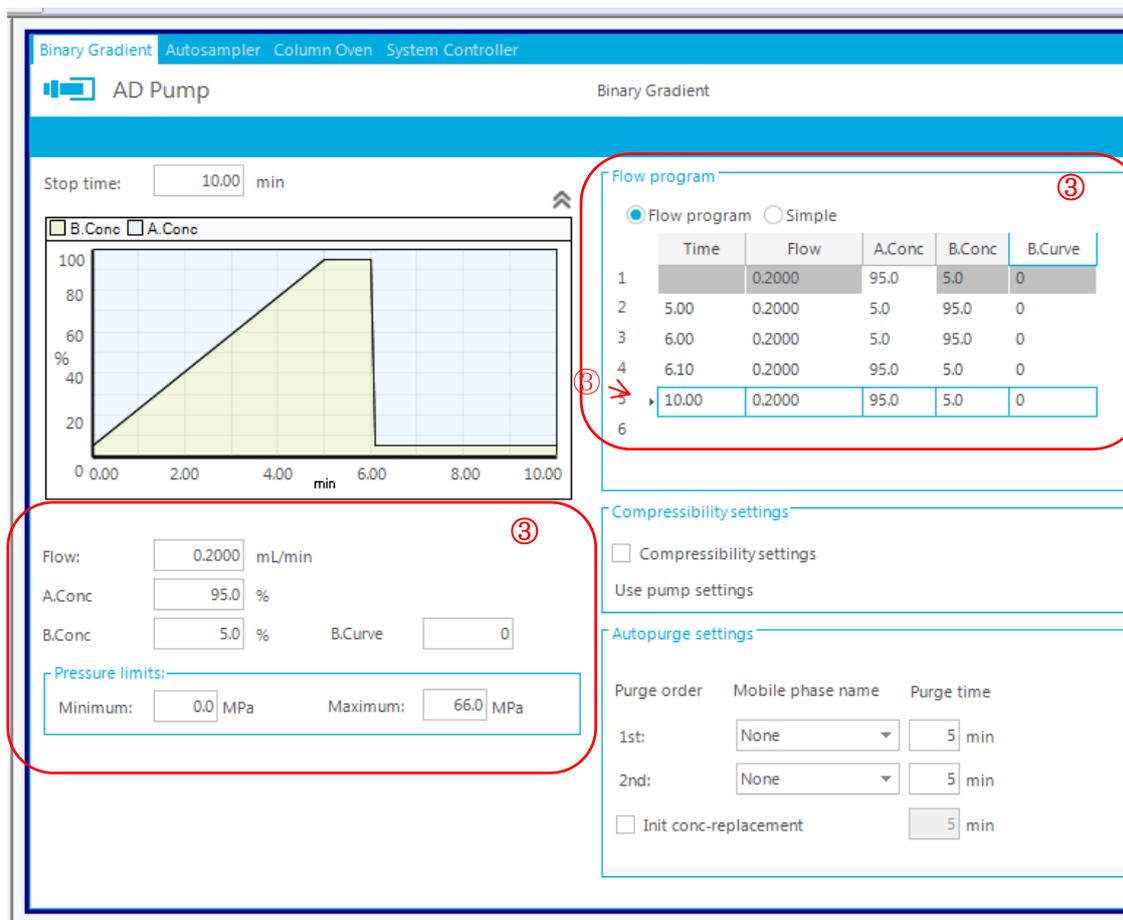
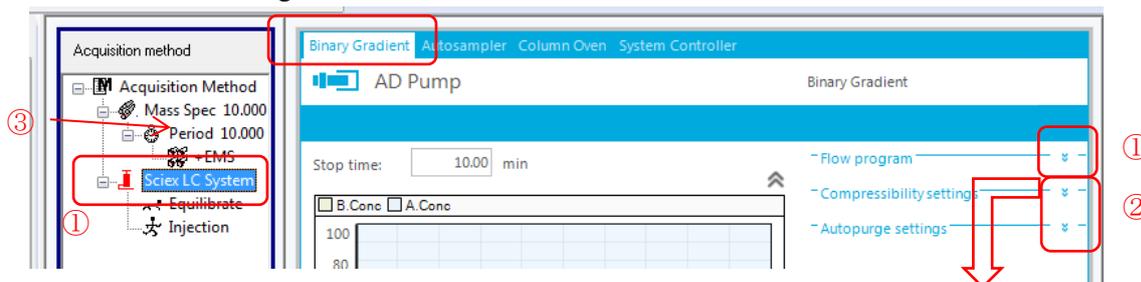
⑤ 各 Experiment の内容を確認後、File -> Save As で定量メソッドを保存します。

⑥ File -> New Results Table にて解析するデータを選択し、Next をクリックします。Choose Existing Method にチェックをかけ、Open ボタンをクリックして⑤で保存したメソッドを選択します。Open ボタンをクリックして元の画面に戻り、Finish ボタンをクリックすると定量テーブルが作成されます。

## 12.5 LC 条件の追加、修正 - ExionLC™ の場合

- ① Sciex LC System をクリックします。
- ② Binary Gradient の Tab で Flow Program 右の  をクリックして展開し、溶出条件を入力します。
- ③ 必要に応じて、Compressibility settings, Autopurge settings について  をクリックし、設定変更を行います。

※ Training では下図のように入力してください。

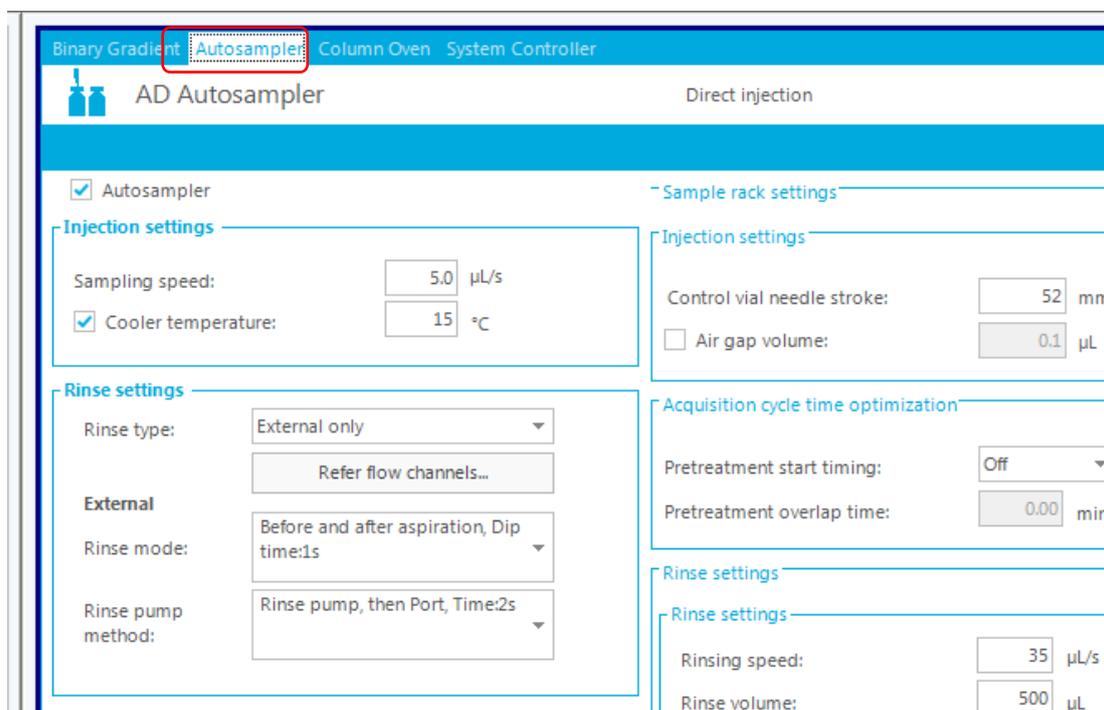


- ④ MS の測定時間と LC の時間の確認を行います。

MS の測定時間を変更する場合は、Mass Spectrometer をクリックし、Duration に適当な値を入力してください。

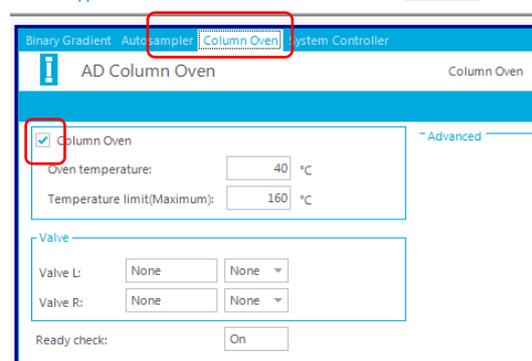
⑤ 必要に応じて、Autosampler の Tab で条件を設定、変更します。

- \* Training では変更しません。
- \* ニードルウォッシュを使用する場合は、Rinse setting で設定を行ってください。目的の Rinse Type を選択することで、詳細設定が可能になります。



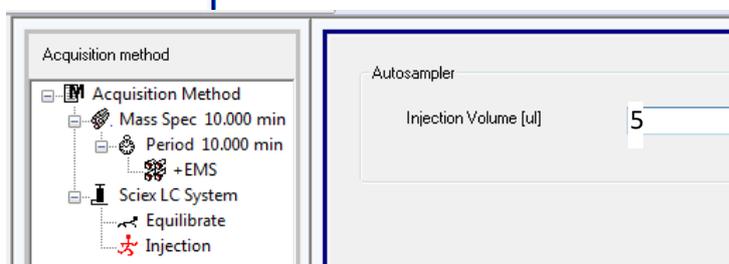
⑥ 必要に応じて、Column Oven の Tab で条件を設定、変更します。

- \* Column Oven を使用する場合、Column Oven にチェックをかけ、温度設定してください。
- \* Training では 40°C に設定します。
- \* Oven の内蔵バルブを制御する場合は、設定を行ってください。



⑦ Injection をクリックし Injection Volume を入力します。

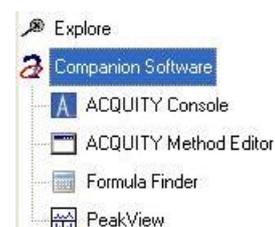
- \* Training では 5 を入力してください。



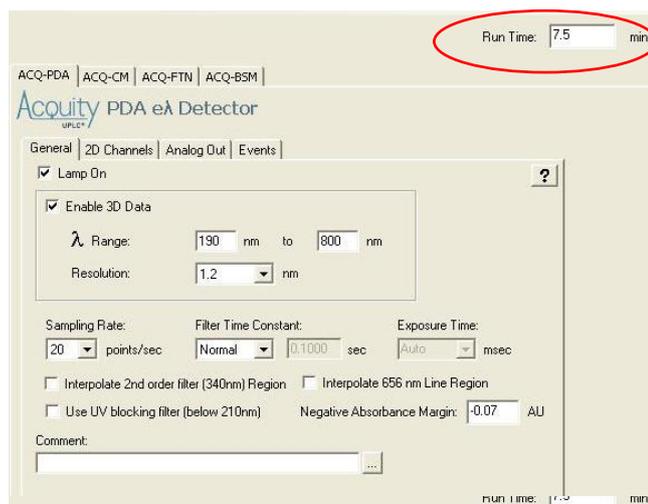
⑧ Menu Bar の File から Save を選択し、Method を保存します。

## 12.6 LC 条件の追加、修正 - Waters 社製 HPLC (Acquity I-class) の場合

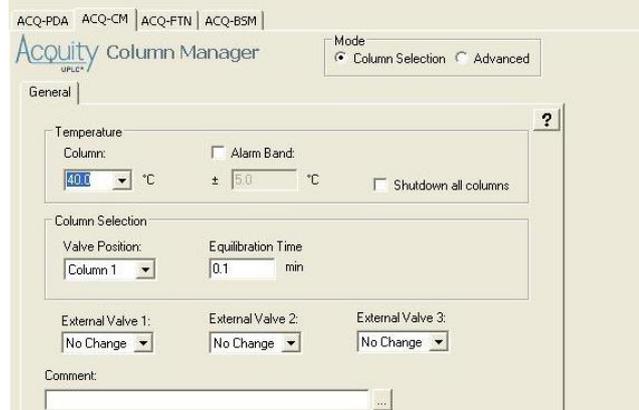
- ① Navigation Bar の ACQUITY Method Editor をダブルクリックし、Waters Method Editor 画面を立ち上げます。
- ② メニューバーの File -> Open Method から、目的の Method (Training では IDA) を選択して開きます。



- ③ Run Time に測定時間を入力します。
- ④ Training では右図のように入力してください。必要に応じて、ACQ-PDA タブで PDA の設定を行います。

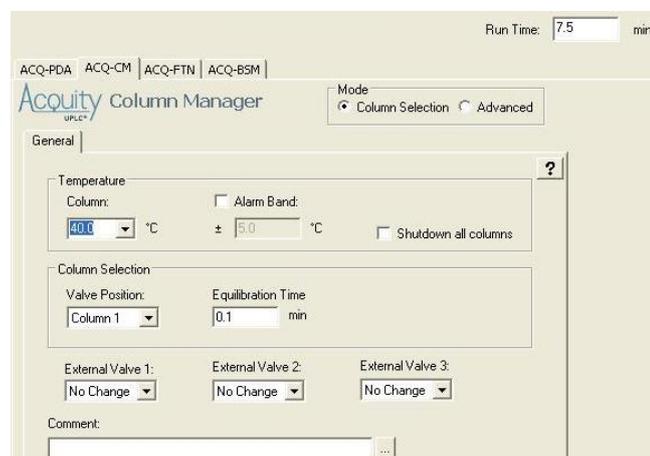


- ⑤ ACQ-CM タブをクリックし、必要に応じて温度を設定してください。



- ⑥ ACQ-FTN (Sample Manager FTN) タブをクリックし、オートサンプラーの設定をします。

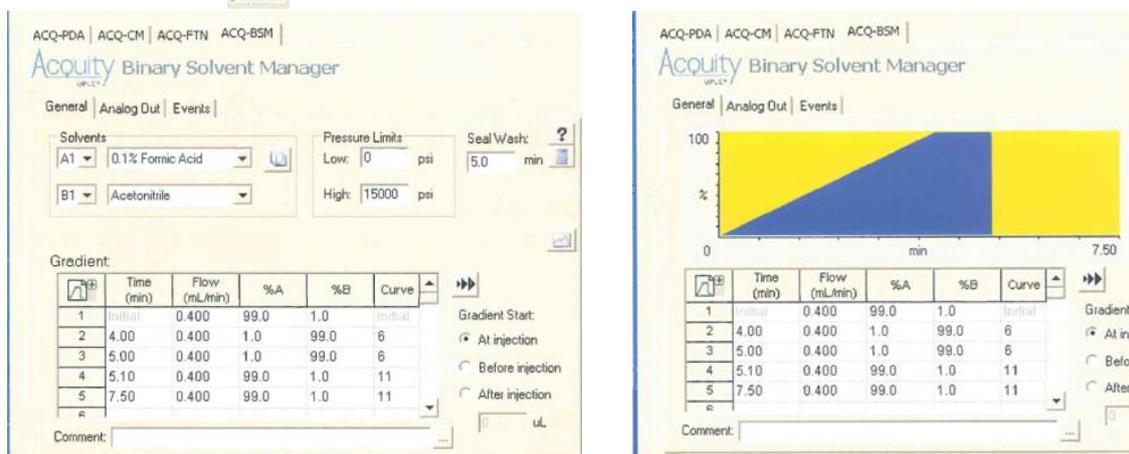
\* Training では図のように設定してください。



⑦ ACQ-BSM タブをクリックし、グラジエントの条件を入力し、入力後、MS の測定時間の確認を行います。

\* Training では下図のように設定してください。

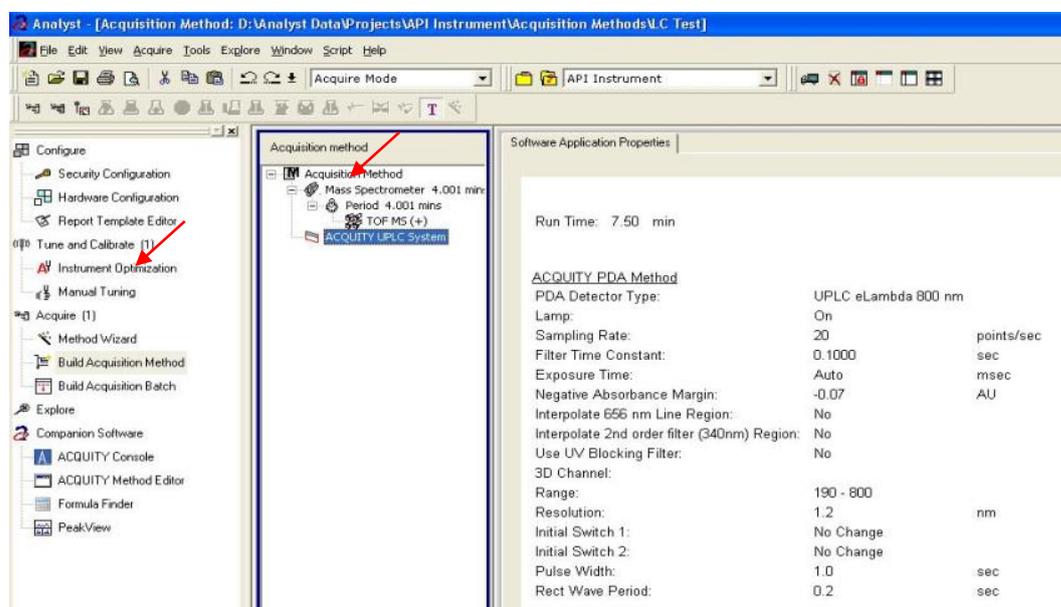
入力後、 をクリックすることで、下図のグラフが表示されます。



⑧ メニューバーの File -> Save を選択し、目的の Method (Training では IDA) に上書きします。

⑨ メニューバーの File -> Exit を選択し、画面を終了します。

⑩ Build Acquisition Method をクリックし、File メニューの Open から目的の Method (Training では IDA) を開き、ACQUITY UPLC System をクリックすると LC 条件が表示されます。



\* Injection Volume は Batch 作成時に設定します。

Batch Script:

Sample Name	Rack Code	Rack Position	Plate Code	Plate Position	Vial Position	Data File	Inj. Volume (µl)
1 Sample001	Sample Manager	1	ANSI-48Vial2mLHolder	1	1	TEST	10.000

## 12.7 LC 条件の追加、修正 - CTC PAL Autosampler を使用する場合

\* オートサンプラーのみの設定です。

① CTC PAL Autosampler をクリックします。

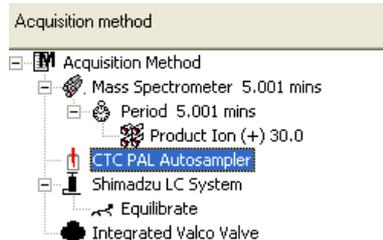
② Injection Volume に注入量を入力します。

\* シリンジ容量を超えないようにしてください。

③ Available Cycles で洗浄メソッドを選択します。

④ Syringe で装置に取り付けられているシリンジの容量を選択します。

⑤ 必要に応じて、Cycle Arguments の内容を変更します。



CTC PAL Autosampler Basic Properties

Loop Volume1 (μl): 100      Actual Syringe (μl): 25  
 Loop Volume2 (μl): 100      Injection Volume (μl): 5.000 ②

Available Cycles ⑤  
 AirSandSyringeClean37 ③

Syringe  
 25ul ④

Description

Cycle Arguments

Parameter	Value
Pre Clean with Solvent 1	0
Pre Clean with Solvent 2	0
Front Air Volume (μl)	0.1
Rear Air Volume (μl)	0.1
Filling Speed (μl/s)	7
Eject Speed (μl/s)	25
Needle clean wash1 cycles	1
Needle clean wash2 cycles	1
Injection Speed (μl/s)	5
Inject to	LC Vlv1
Post Clean with Solvent 1	1
Post Clean with Solvent 2	1
Valve Clean with Solvent 1	1
Valve Clean with Solvent 2	1

◆製品サポートのご案内◆

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部まで、  
ご使用の装置名 (TripleTOF<sup>®</sup> System) とシリアル番号をお伝えください。

Tel: 0120-318-551      Fax: 0120-318-040

E-mail: [jp\\_support@sciex.com](mailto:jp_support@sciex.com)

◆オンライントレーニング動画のご案内◆

弊社ホームページの下記サイトから、メンテナンス、ソフトウェアの使用法など、各種トレーニング動画を視聴できます。是非ご活用ください。

Home > サポート > 各種サポート資料・ツール > 操作方法に関する動画

<http://sciex.jp/support/support-tools/movie-manuals>

Home > Support > SCIEXNow > Training > Course Catalog

<http://sciex.com/support/training-front/course-catalog>

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各製品付属のマニュアルを必ずご確認ください。

© 2018 AB SCIEX.