

TripleQuad™ / QTRAP®

LC-MS/MS System

シリーズ

初級定量トレーニングテキスト

- SCIEX OS ソフトウェア説明用資料 -

(測定 : SCIEX OS, 定量 : SCIEX OS)

メソッド開発

ソフトウェアのバージョンにより、画面や操作方法が若干異なる場合があります。

予めご了承ください。

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

2023年11月



目次

1	講義資料	1-1
2	ソフトウェアの概要	2-1
3	SCIEX OS ソフトウェアの起動と各モードについて	3-1
4	測定	4-1
4.1	測定の流れ	4-1
4.2	ソフトウェアの起動	4-2
4.3	プロジェクトの作成	4-2
4.4	装置の Configuration	4-3
4.5	機器の平衡化	4-4
4.6	最適化	4-5
4.7	測定メソッド(Acquisition Method)の完成	4-30
4.8	測定	4-35
5	停止操作	5-1
6	データの確認	6-1
7	SCIEX OS Software を用いた定量解析	7-1
7.1	SCIEX OS Software の Analytics の起動	7-3
7.2	Project の選択	7-3
7.3	初期設定の変更	7-3
7.4	Result Table の作成	7-6
7.5	Results Table の確認、編集	7-11
7.6	クロマトグラムの表示	7-12
7.7	パラメータの変更	7-12
7.8	手動積分	7-13
7.9	検量線の表示、重みづけ、検量線の種類を変更	7-14
7.10	データの追加と削除	7-15
7.11	Report の作成	7-16

本マニュアル中での装置の表示について、一部下記のように表示しております。

機種		略称
SCIEX Triple Quad™ 4500 LC/MS/MS System	SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS System	4500 シリーズ
SCIEX Triple Quad™ 5500 LC/MS/MS System	SCIEX QTRAP® 5500 LC/MS/MS System	5500 シリーズ
SCIEX Triple Quad 5500+ LC-MS/MS System – QTRAP® Ready	SCIEX QTRAP® 5500+ LC-MS/MS System – QTRAP® Activated	5500+シリーズ
SCIEX Triple Quad™ 6500 LC/MS/MS System	SCIEX QTRAP® 6500 LC/MS/MS System	6500 シリーズ
SCIEX Triple Quad™ 6500+ LC/MS/MS System	SCIEX QTRAP® 6500+ LC/MS/MS System	6500+シリーズ
SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS System – QTRAP® Ready	SCIEX Triple Quad™ 7500 LC-MS/MS System – QTRAP® Activated	7500 シリーズ

1 講義資料

SCIEX
Answers for Science.
Knowledge for Life.™

It's Time to
See the Future
Differently

初級定量トレーニングコース - 講義資料 -
サイエックスアプリケーションサポート
2017/09
1

目次

- LC-MSの概要
- 測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)
 - ルーチン分析の方は参考資料になります。
- その他のTips

★ ルーチン分析コースの方は
このマークのあるページ以外は参考資料になります。

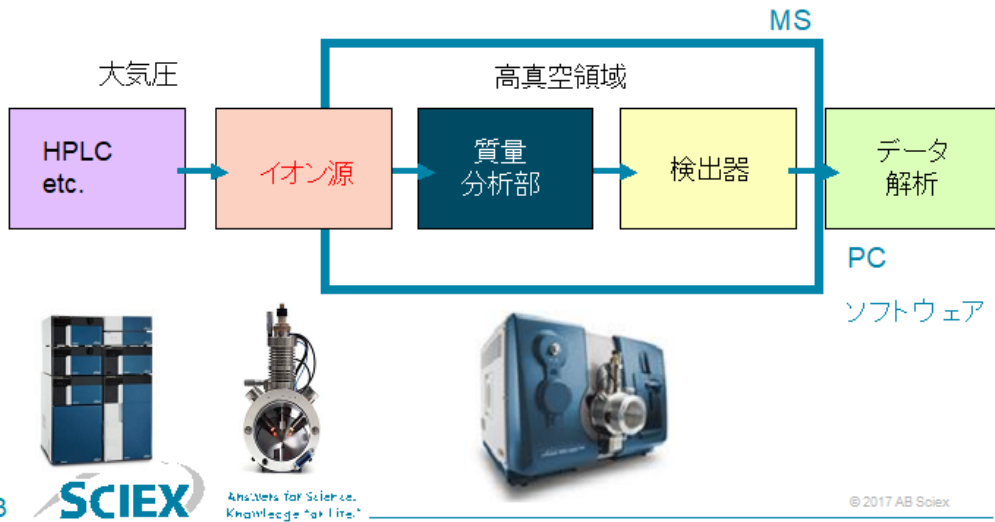
MS用語について:

Updateされることがありますので、正式な定義などにつきましては 以下を参照ください。

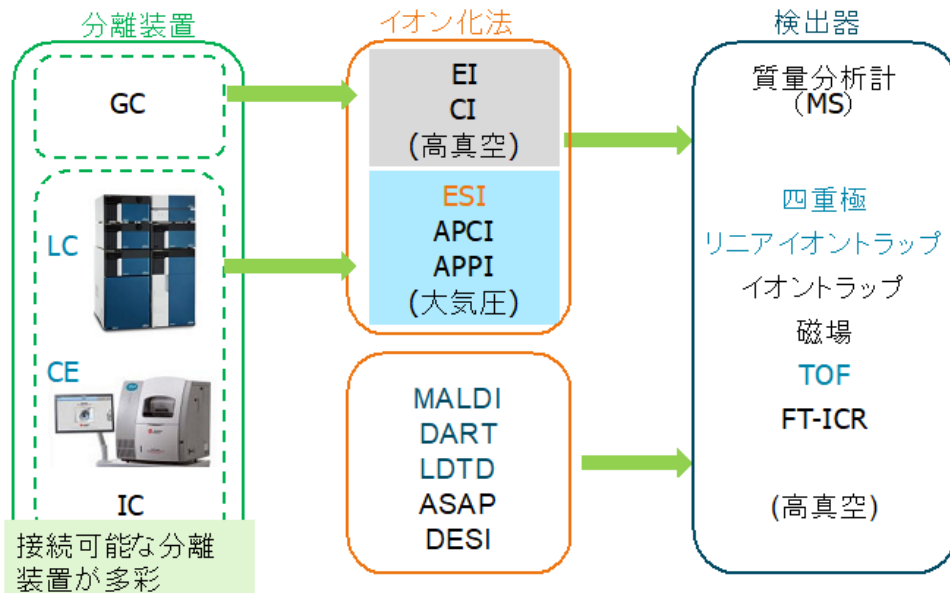
http://www.mssi.jp/publications/pdf/MS_Terms_2009.pdf

LC-MSの概要

- 試料溶液をHPLCで分離した後、溶出物質をイオン化し、質量分析部に導入
- イオンを質量/電荷比(m/z)によって分離・検出する方法
- LCの保持時間と物質固有の m/z の両面から解析できる



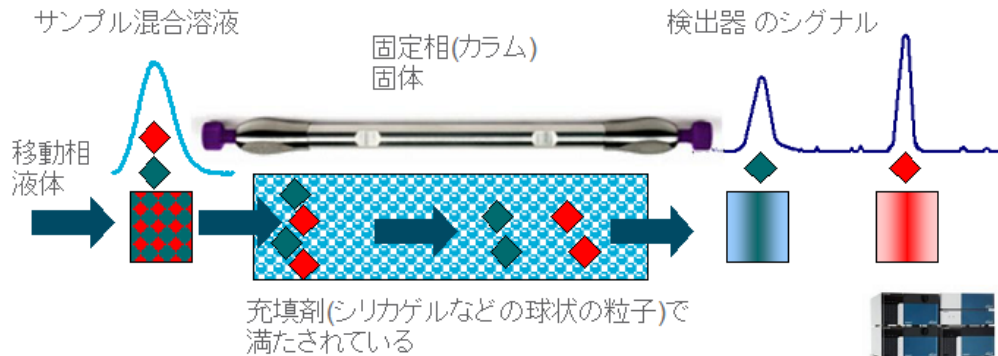
LC-MSの概要 -質量分析計のタイプ-



高速液体クロマトグラフ(LC)とは



- 試料中の検出したい成分の分離
 - 各成分と固定相・移動相との親和性・相互作用の違いにより、溶出する時間が異なる



5

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB SCIEX

質量分析装置(MS)とは



物質の質量を測定する装置

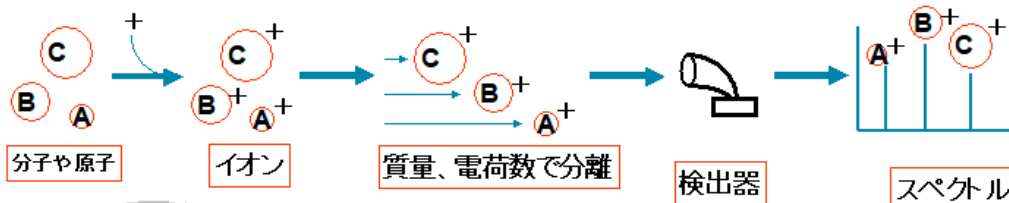
目に見えない、手に取れないものを、どうやって量るの？

イオン化(正イオン・負イオン)
化合物に電荷を帯びさせる

電場/磁場
で分離

検出器

➤分子や原子をイオン化し、質量と電荷数の違いで分離・検出する。



6

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

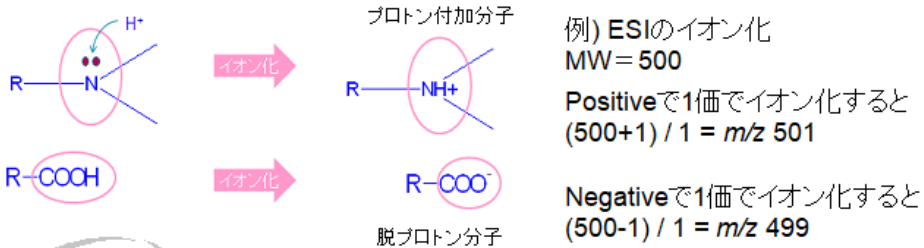
© 2017 AB SCIEX

質量分析装置(MS)とは



物質の質量を測定する装置

MSが検出する値は
 m/z (m オーバー z)
m … イオンの質量
z … イオンの電荷数
 m/z の値と電荷数から、質量を算出



7

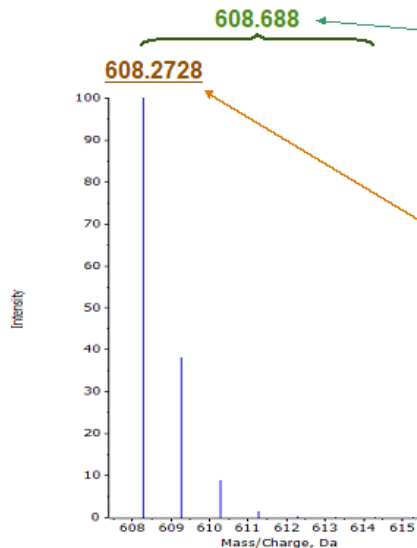


Adv. Tech. for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

平均質量とモノアイソトピック質量

例: Reserpine($C_{33}H_{40}N_2O_9$)



平均質量: 608.688
(同位体の平均値)

試薬ビンのラベルなどに記載されている値は、平均質量(分子量)です

モノアイソトピック質量: 608.2728

質量分析装置では
モノアイソトピック質量
の関連イオン
を測定します!

(同位体が分離されている場合)

8



Adv. Tech. for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

平均質量(分子量)とは

その化学種を構成するすべての元素の原子量の和 (average mass)

平均質量(分子量): 原子量から計算された数値
ex. 炭素Cの安定同位体の質量と存在度

	質量	天然同位体存在度
^{12}C	12.00000	98.93%
^{13}C	13.00336	1.07%

※原子量とは、同位体存在比を重率として、かけて求めた平均値

H 1.00794
C 12.0107
N 14.0067
O 15.9994

試薬ビンのラベルなどに記載されている値は、平均質量(分子量)です

$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9$ (Reserpine) の分子量: **608.688**

9

SCIEX

Adv. Weis for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

モノアイソトピック質量とは

各元素について天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算したイオン
または分子の計算精密質量(exact mass)

モノアイソトピック質量 (Monoisotopic Mass):

安定同位体中、最も存在比の高い質量
から計算された数値

ex. 炭素Cの安定同位体の質量と存在度

	質量	天然同位体存在度
^{12}C	12.00000	98.93%
^{13}C	13.00336	1.07%

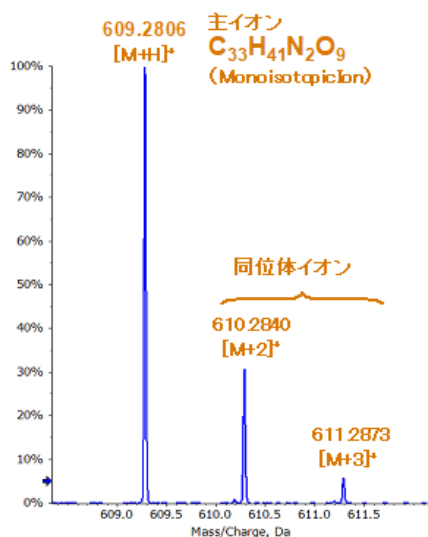
天然存在比が最大の同位体の質量

^1H 1.0078
 ^{12}C 12.0000
 ^{14}N 14.0031
 ^{16}O 15.9949

$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9$ のモノアイソトピック質量: **608.2728**

モノアイソトピックイオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 608.2728 + H

= **609.2806**



10

SCIEX

Adv. Weis for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

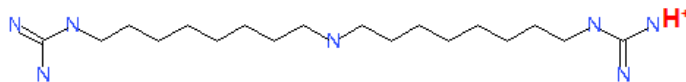
m/z と多価イオン

多価イオンの m/z の計算 (H⁺ 付加の場合)
 (モノアイソトピック質量 + H⁺ の数) / (H⁺ の数)

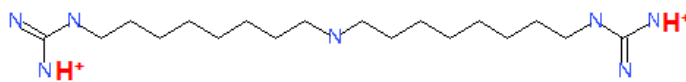
- 質量分析装置では、**m/z** が観測されます。(M.W.ではありません。)
- エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)では、**多価イオン** が観測されることがあります。

イミノクタジンの正イオンの例 ※プロトンが付加している位置は一律ではありません。

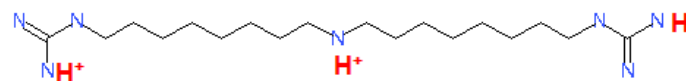
1価の場合(H⁺が1つ付加) $(355.34 + 1) / 1 = 356.34$



2価の場合(H⁺が2つ付加) $(355.34 + 2) / 2 = 178.67$



3価の場合(H⁺が3つ付加) $(355.34 + 3) / 3 = 119.44$



11

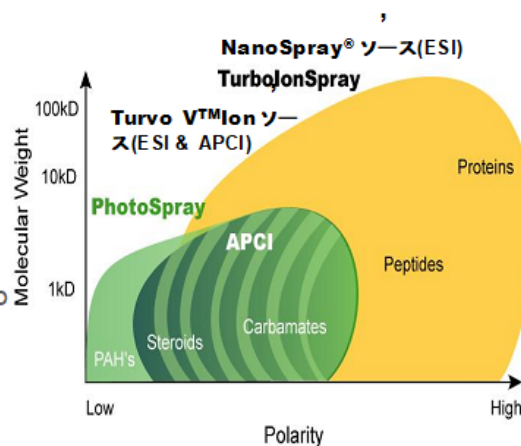
SCIEX

Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

LC/MSのイオン化法の種類

- エレクトロスプレーイオン化法
 - ElectroSpray Ionization, **ESI**
- 大気圧化学イオン化法
 - Atmospheric Pressure Chemical Ionization, **APCI**
- 大気圧光イオン化法
 - Atmospheric Pressure Photo Ionization, **APPI**



各イオン化法での測定可能な範囲

12

SCIEX

Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

Turvo V™ Ion Source

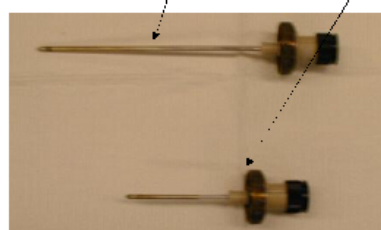


ESIからAPCIに簡単に切り替えられます



The Innovative Turbo V™ ion source

ESI用プローブ APCI用プローブ



- 別のイオン源を用意する必要なし、ESI、APCI共用の1つのイオン源
- ESIおよびAPCIプローブは、MSシステムに標準装備
- プラグアンドプレイ、プローブを交換するだけでMSが自動認識
- プローブの交換は、1分間の簡単な作業
- 詳細は「**APCI操作マニュアル**」をご確認下さい

13

イオン化法の特徴



		ESI	APCI
対象 サンプル	最大分子量	数10万Da	約1300Da
	極性	中極性～高極性	低極性～高極性
	熱に不安定な サンプル	可能	適さない
	揮発性	影響なし	揮発性成分に対して有効
対応流速		数nL～3mL/min	0.2～2.0 mL/min
イオンサプレッション/ イオンエンハンスメント		起こる	少ない
LC溶媒の影響		影響されやすい	影響されにくい
その他		<ul style="list-style-type: none"> • 広範囲の化合物測定に有効 • 多価イオンが生じるので高分子化合物の分析にも有利 • クラスター(多量体)が生成するため、高濃度側での検量線の直線性が低下する場合がある。 	<ul style="list-style-type: none"> • 気化を促進するためプローブを熱している • 生体サンプルなど不揮発性の物質を多く含む場合、長時間の測定によりコロナニードルが汚れるため感度が低下する。(コロナニードルのクリーニングを行えば感度は復帰する。)

14

SCIEX

Adv. Tech. for Science.
Knowledge for Life.

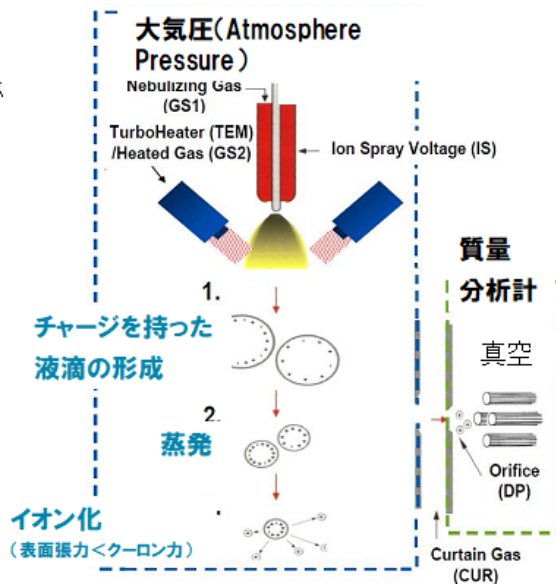
© 2017 AB Sciex

イオン化法



ESIのイオン化

- 1) イオンを多量に含む液滴が形成される。
- 2) 液滴の溶媒が蒸発するにつれ液滴は小さくなりイオンが凝集する。
- 3) さらに蒸発が進むと液滴は表面張力により内側に集まろうとするがイオンは電荷の反発により気相に飛び出す。



15

SCIEX

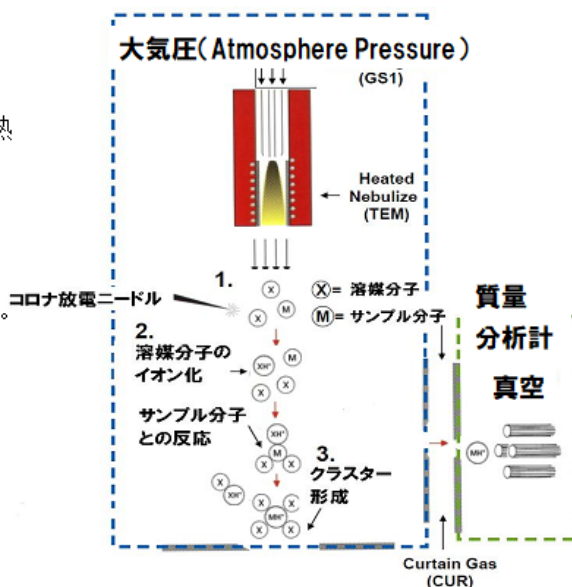
Adv. Nets for Science. Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

イオン化法

APCIのイオン化

- 1) キャピラリから噴霧されたサンプル溶液の液滴を熱で気化される。
- 2) コロナ放電で生成させたイオン種(反応イオン)と反応させてイオン化する。



16

SCIEX

Adv. Nets for Science. Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

イオン化法とイオン化されやすい部分構造

	最大質量	Positive Mode	Negative Mode
ESI	10000以上	R-NH ₂	R-SO ₃ H, R-SO ₃ X, R-O-SO ₃ H, R-O-SO ₃ X, R-COOH, R-COOX
APCI	1000程度	R-NH ₂ , R-COOR', R-CHO, R-CONH ₂	R-SO ₃ H, R-SO ₃ X, R-O-SO ₃ H, R-O-SO ₃ X, R-COOH, R-COOX

$\text{R1}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H}-\text{R3}$ $\text{R1}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}=\text{C}-\text{H}-\text{R3}$ $\begin{matrix} \text{N} \\ \text{C} \\ \text{N} \\ \text{CH} \end{matrix}$

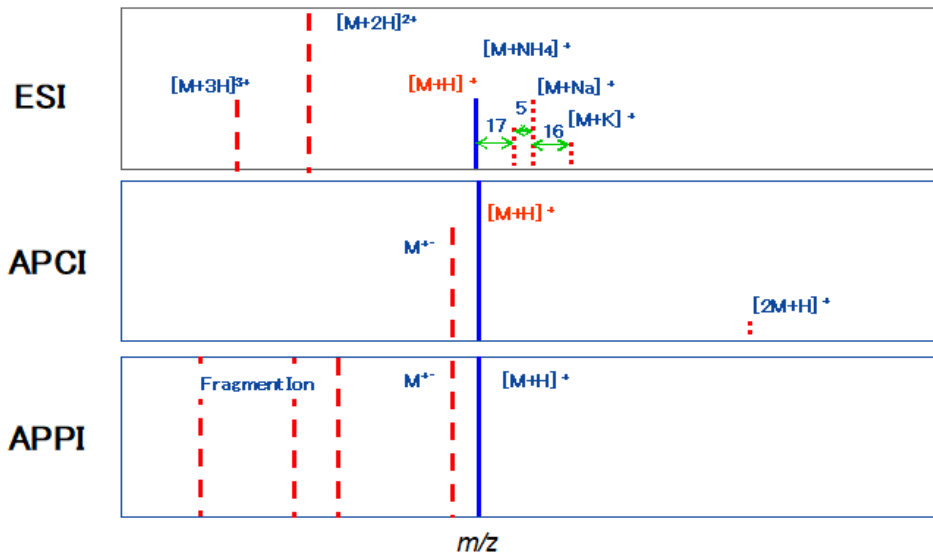
17

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

生成する主なイオン種 (Positive Mode)



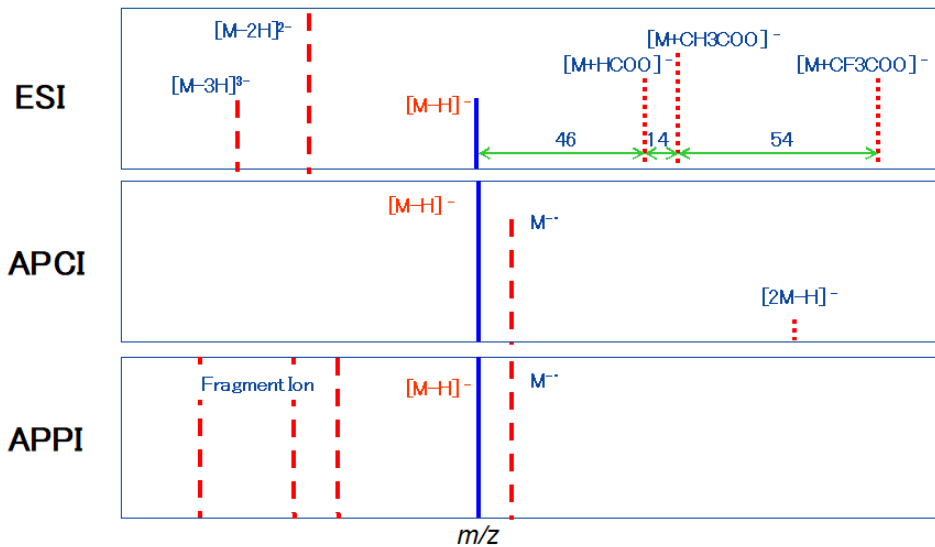
18

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

生成する主なイオン種 (Negative Mode)



19

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

LC/MS(/MS)で使用される質量分析部の種類



Sciexで販売している種類のみ表記

- **四重極質量分析計**
 - 小型で定量性が良好
 - 質量範囲は数千Da、分解能は数千程度
- **イオントラップ質量分析計**
 - 小型で、単独でフラグメントイオンを測定できるため、構造解析等に使用される
 - トラップできるイオンの量に制限があるため、定量性は低い
 - 質量範囲は数千Da、分解能は通常数千程度(狭い範囲に限れば分解能は向上する)
 - 3Dイオントラップ
 - リニアイオントラップ
 - トラップする空間が広く、トラップの問題点を解消している
- **飛行時間型(Time of flight)質量分析計**
 - 質量範囲が広く(理論的には無限大)、分解能も高い(数万程度)
 - 比較的大型で、定量性も兼ね備えた装置は高価
- **その他**
 - 磁場型(分解能が高く、定量性もあるが、大型で、重い)
 - フーリエ変換型など(最も分解能が高い)

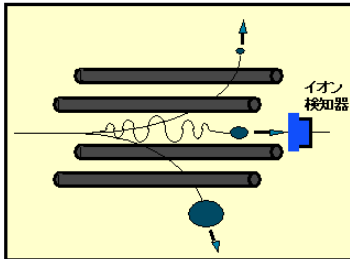
20

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

四重極質量分析計



四重極 Quadrupole

4本の電極の対向する電極にそれぞれ、直流電圧と交流電圧を印加し、各質量特有の周波数を利用して、質量のふるいわけを行う。

【特長】

- 比較的安価で操作性が良い
- 分解能は0.7u程度だが、定量の場合十分
- 検量線の直線性が高く、ダイナミックレンジが広い

21

SCIEX

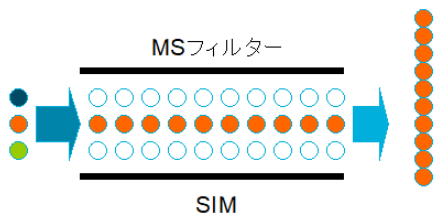
Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

四重極質量分析計の測定方法

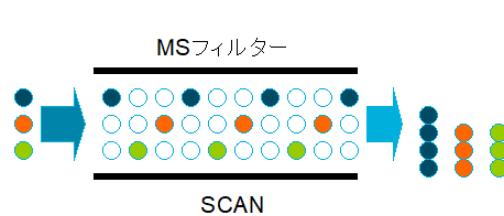
SIMモード

- 質量固定でマスフィルターとして機能
- マスフィルターの条件(m/z)は固定され、ターゲットのイオン全てが検出器に到達するため、高感度
- 固定したイオン以外は検出されない



スキャンモード

- 質量の順にイオンが選択されていく
- マスフィルターの条件(m/z)を連続的に変化させるため、検出器に到達せず排除されるイオンがある
- 指定した m/z の範囲のすべてのイオンが検出される



22

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

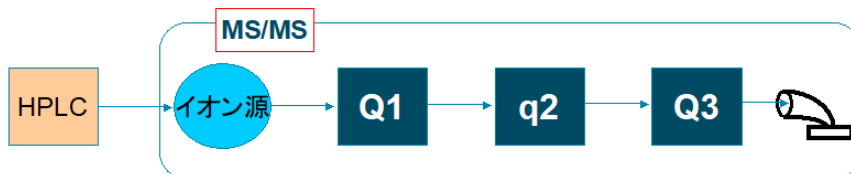
© 2017 AB Sciex

トリプル四重極(タンデム)LC/MS/MSとは？



質量を分離できる部分を2箇所持っているLC/MSのこと

トリプル四重極LC/MS/MSの例



【用語解説】

Precursor Ion(プリカーサーイオン):

元のイオンのこと。前駆イオンともいう

Fragmentation(フラグメンテーション):

イオンが結合開裂により、小さい質量のイオンを生成する反応、断片化ともいう

Product Ion(プロダクトイオン):

ある特定のイオンから生成したイオンを指す。フラグメントイオンともいう

(参照:日本質量分析学会マスペクトロメリー用語集)

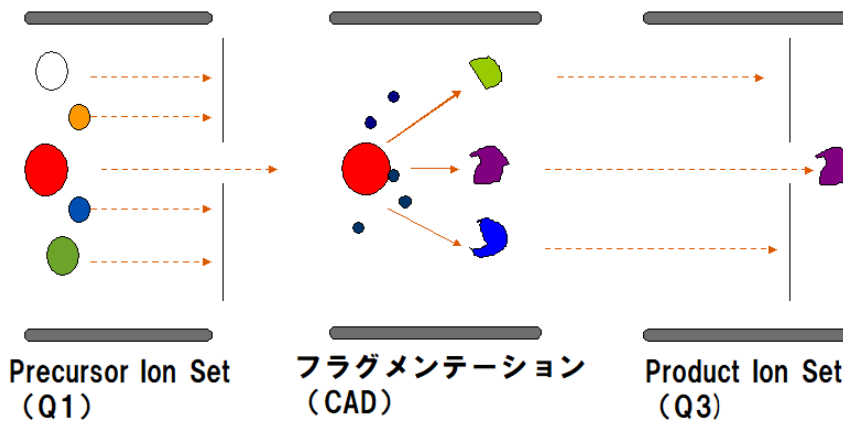
23

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

トリプル四重極 Multiple Reaction Monitoring(MRM)



Q1:主にPrecursor Ionをスキャン/選択します。

q2:Q1で選択されたPrecursor IonイオンをFragmentationします。

Q3:Q2で生成されたProduct Ionをスキャン/選択します。

24

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

トリプル四重極 -MRMモードの特長-



MRM: Q1およびQ3がペアとなる固有のセットで測定される

- 複数のPrecursor Ion(Q1)とProduct Ion(Q3)のペアを設定できる

	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Time (msec)	ID
1	142.000	124.900	100	Methamidophos 1
2	142.000	94.000	100	Methamidophos 2
3	192.100	119.100	100	DEET 1
4	192.100	91.000	100	DEET 2
5	199.100	128.100	100	Cymoxanil 1

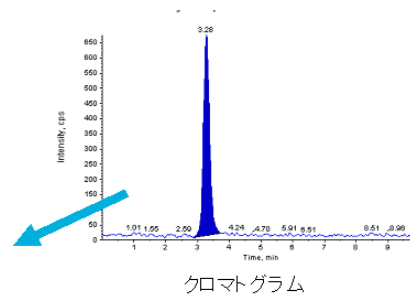
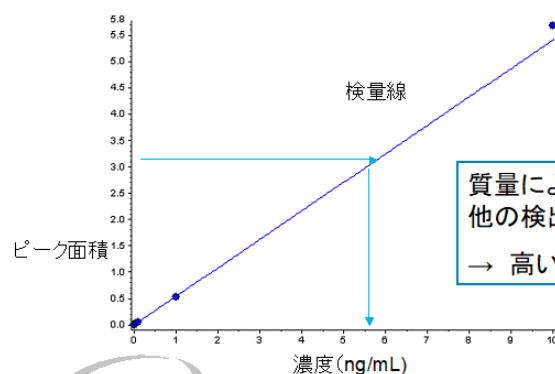
- バックグラウンドが低く、高S/Nが得られるためMS/MSモードの中で最も検出限界値(LOD)が低い
- 高感度微量定量に向いており、マスクロマトグラムの面積を基に、スタンダードから得た検量線と比較し定量が可能
- 検量線の範囲が広い
- 選択性が高いため、一斉分析に有効
- 1成分あたりの測定時間(dweltime)で連続測定

25

定量分析とは？(絶対定量)



- 標準物質で検量線を作成
- 検量線とピーク面積から、サンプルの濃度を計算で求める



質量による分離のため、UVや蛍光検出器など他の検出器と比較すると特異性が高い

→ 高いS/Nにより、検出感度が良い

26

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

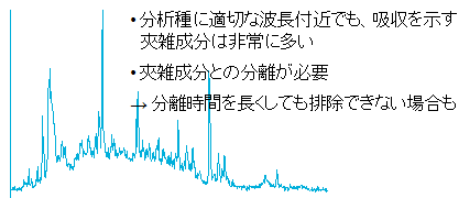
© 2017 AB Sciex

UV vs MS vs MS/MS

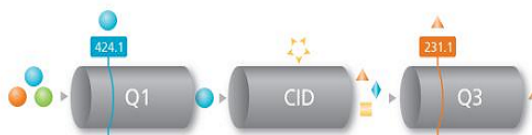


トリプル四重極のSRMモードのダブルフィルタリング効果は、定量分析に最適

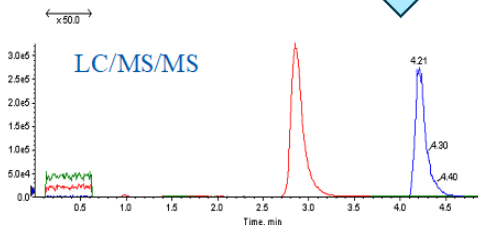
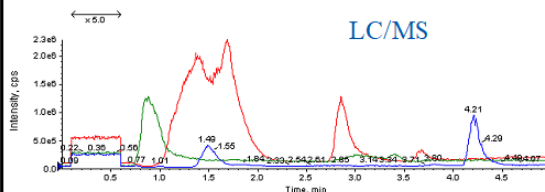
HPLC



- 分析種に適切な波長付近でも、吸収を示す夾雑成分は非常に多い
- 夾雑成分との分離が必要
- 分離時間を長くしても排除できない場合も



Retention Time
夾雑ピークが多く、バックグラウンドも高い



27



夾雑ピークが少なく、バックグラウンドは低い

さらに、夾雑ピークが少なく(高選択性)バックグラウンドが低い(高S/N)

目次

- LC-MSの概要
- 測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)
 - ルーチン分析の方は参考資料になります。
- その他のTips

★ ルーチン分析コースの方はこのマークのあるページ以外は参考資料になります。

MS用語について:

Updateされることがありますので、正式な定義などにつきましては以下を参照ください。

http://www.mssj.jp/publications/pdf/MS_Terms_2009.pdf

28



Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

四重極質量分析計のスキャンタイプ



- MSモード
- Q1 Scan
 - Q1 Multiple Ions (SIM)
 - Q3 Scan
 - Q3 Multiple Ions
- MS/MSモード
- MRM
 - Product Ion Scan
 - Precursor Ion Scan
 - Neutral Loss Scan

29



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

メソッド作成のワークフロー



1.MRM(SRM)条件の検討

- 新しく作成する場合でも、自動最適化機能で簡単に作成できます



2.イオンソースパラメーターの検討

- 推奨値で測定し、さらに感度が必要な場合のみ実施します。



3.LC条件の検討

- カラム、移動相等を検討します。



分析メソッド

30



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)



Analyst®ソフトウェアによる分析条件の自動最適化

1. MS内部パラメータの最適化 (インフュージョン: シリンジを使用)

- シリンジに標準液をセットしたら、Analystが自動最適化
- Q1、Q3、DP(コーン電圧)、EP、CE、CXP

2. イオンソース最適化 (FIA: LCを使用した最適化)

- TEM (温度)、IS (イオンスプレー電圧) ...etc.

※推奨値で測定し、感度をさらに求める場合に実施します。

31



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

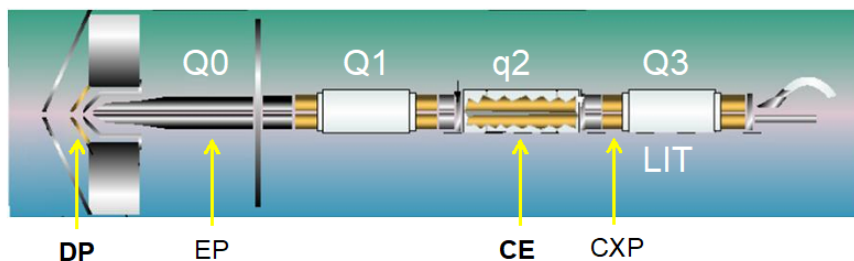
測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)



最適化が必要(可能)なパラメータ

Compound Parameters:

Voltage	Function	適合機種
Declustering Potential (DP)	オリフィスプレートにかかる電圧 イオンの引き込み	全機種
Focusing Potential (FP)	フォーカシングリングにかかる電圧 イオンの引き込み	API 2000, 3000
Entrance Potential (EP)	イオンの収束	全機種
Collision Cell Entrance Potential (CEP)	Q2へのイオンの収束	API 2000, 3200
Collision Energy (CE)	イオンのフラグメンテーション	全機種
Collision Cell Exit Potential (CXP)	イオンがQ3に入るのを補助する	全機種

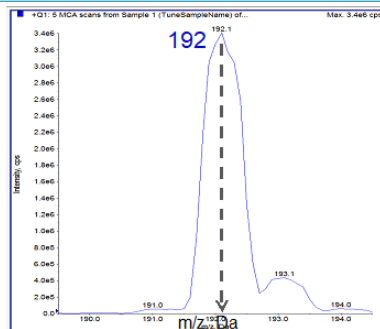


32

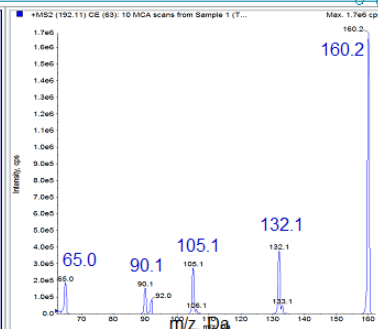
測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)



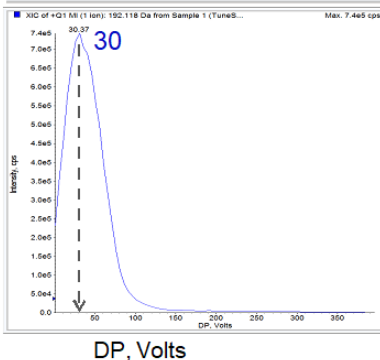
Q1



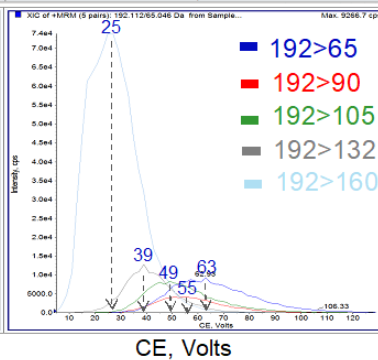
Q3



DP



CE



33

DP, Volts

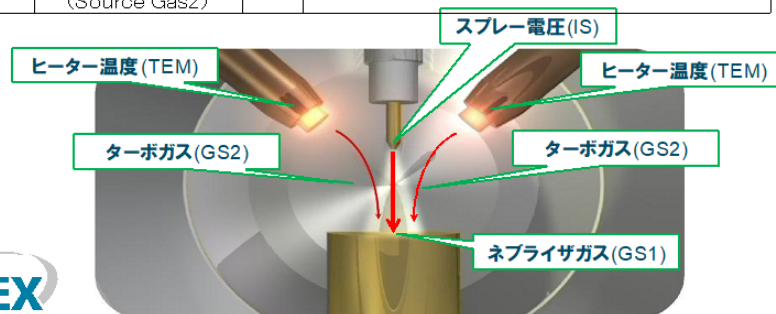
CE, Volts

測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)



TURBO V™ source (ESI)

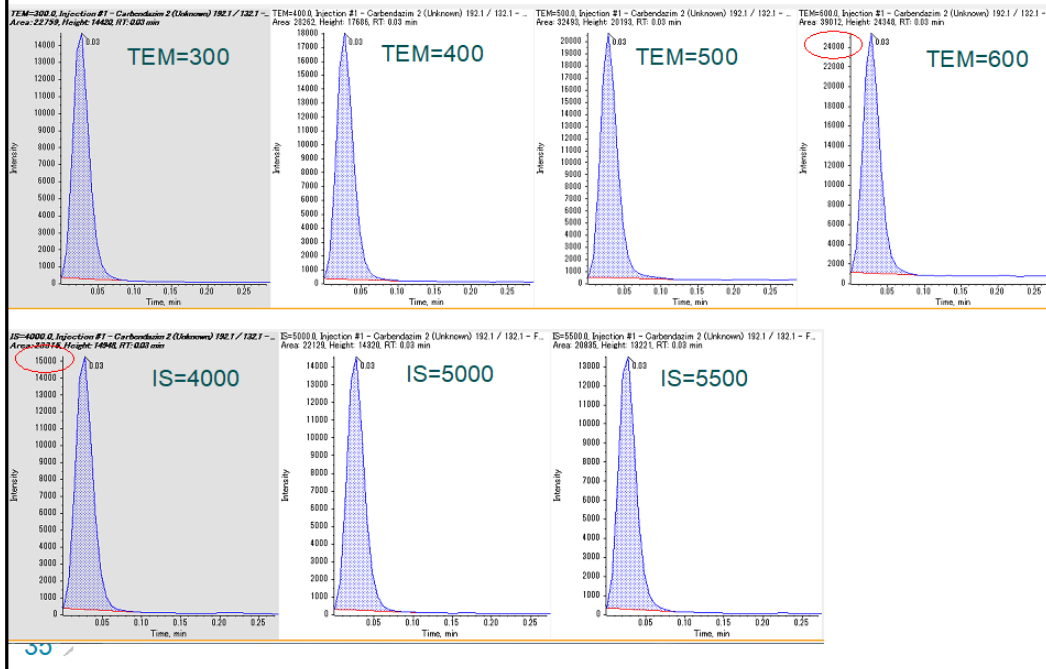
略称	Parameter	単位	適合機種
TEM	温度 (Temperature)	°C	脱溶媒を促進させるため、GS2にかかる温度
IS	イオンスプレー電圧 (Ion Spray Voltage)	V	ESI キャピラリーに印可する電圧
CUR	カーテンガス (Curtain Gas)	psi	汚染防止
GS1	ネブライザーガス (Source Gas1)	psi	ネブライザーガス
GS2	ターボガス (Source Gas2)	psi	脱溶媒を促進させるために吹き付ける加熱したガス



34

SCIEX

測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)



目次

- LC-MSの概要
- 測定メソッドと自動最適化 (メソッド作成)
 - ルーチン分析の方は参考資料になります。
- その他のTips

★ ルーチン分析コースの方は
このマークのあるページ以外は参考資料になります。

MS用語について:

Updateされることがありますので、正式な定義などにつきましては以下を参照ください。

http://www.mssj.jp/publications/pdf/MS_Terms_2009.pdf

HPLC 溶媒について



共通

- 不揮発性のバッファー(リン酸等)は、使用できません。
- ガラス瓶は洗剤を使用せず、水道水→超純水ですすいで使用します。

ESI

- バッファー濃度の上限は20mM程度です。

<推奨バッファー>

Positive ion mode: ギ酸、酢酸 (2-10mM)

Negative ion mode : ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム (2-10mM)

<推奨溶媒>

水、メタノール、アセトニトリルを推奨します。

APCI

- イオン化にバッファーや添加剤等の影響があまりありません。
- バッファー濃度の上限は、50mMです。

37



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

その他のTips



• メソッド作成時(自動最適化)の推奨の調製溶媒

- 50%メタノール水溶液
- 50%アセトニトリル水溶液

※付加体での検出が必用な場合は、ギ酸(0.1%程度)や酢酸アンモニウム(5mM程度)を添加します。

• LC/MS測定では、内径2mm前後のカラムを一般的に使用します。

• 移動相中の有機溶媒濃度

- 有機溶媒濃度が上がるほどスプレー状態は安定します。
- 有機溶媒100%で使用することはお勧めできません。
- 水は1-5%程度含有以上が望ましいです。

理由: 水の含有により、水自体が若干乖離してプロトン付加/脱離するため、イオン化が促進されます。有機溶媒100%ではイオン化効率が下がります。

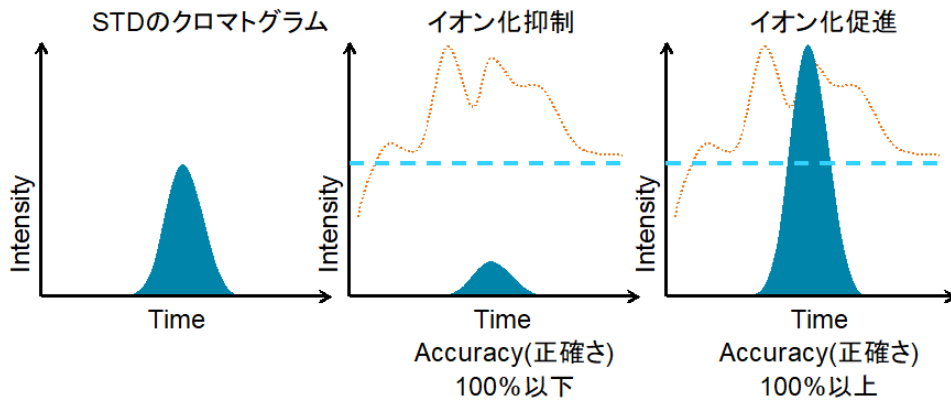
38



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

© 2017 AB Sciex

参考) ESI法におけるマトリックス効果



- 共溶出してくるマトリックスの影響によりイオン化効率が変化
- ⇒ 正確さの低下
- 原因となる成分は様々(無機・有機、水溶性・脂溶性、低・高分子、揮発性)
- ⇒ 事前の予測は難しい

39

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

参考) マトリックス効果の回避・低減

対応策①: マトリックスの量を減らす

- (1) 注入量の削減
- (2) サンプルの希釈

対応策②: 内部標準物質(IS)を使用する

重水素体や¹³C

対応策③: 分離を変える

- (1) 分離カラムの変更
- (2) 移動相、グラジエント条件の変更

対応策④: 前処理の変更

40

SCIEX

Answers for Science.
Knowledge for Life.

© 2017 AB Sciex

略語一覧

ESI: Electrospray Ionization

(大気圧下で行われるイオン化の一つで、エレクトロスプレー技術を使ったイオン化法)

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization

(大気圧下で行われるイオン化の一つで、通常は大気圧スプレーによって生成した気体試料を、コロナ放電で生成させたイオン種(反応イオン)と反応させてイオン化すること)

LC: Liquid Chromatography(液体クロマトグラフィ)

IC: Ion Chromatography(イオンクロマトグラフィ)

FIA: Flow Injection Analysis

(注入したサンプルを LC カラムを使わずに分析する方法)

m/z : Mass-to-charge ratio

(質量電荷比。イオンの質量(m)を電荷数(z)で割った値)

MRM: Multiple Reaction Monitoring

(Q1 で選択された特定の**前駆イオン (Precursor ion)** から生じる特定のイオンの質量を連続的に検出する方法)

Q1MS: Q1 MS Scan

(マスペクトルを測定するために、Q1 で走査したイオンを検出する方法)

Q3MS: Q3 MS Scan

(マスペクトルを測定するために、Q3 で走査したイオンを検出する方法)

EMS: Enhanced MS Scan

(Liner Ion Trap を利用して、走査したイオンを検出する方法)

MS2: Product Ion Scan

(特定の**前駆イオン (Precursor ion)** から生じるイオン (**Product ion**) を検出する方法)

EPI: Enhanced Product Ion Scan

(Liner Ion Trap を利用して **Product Ion** を検出する方法)

Prec: Precursor Ion Scan

(特定の**プロダクトイオン**を生じる**総ての前駆イオン**を検出する方法)

NL: Neutral Loss Scan

(特定の**中性化学種**を脱離する**総ての前駆イオン**を検出する方法)

IDA: Information Dependent Acquisition

(サーベイスキャンで取得した MS スペクトルから強度の強いイオンを選択し、リアルタイムで MS2 あるいは EPI のデータを取得する方法)

DP: Declustering Potential

(イオンを MS 内部へ引き込むための電圧であり、オリフィスプレートに電圧がかかる)

CE: Collision Energy

(MS/MS などの CAD 実験において、Q2 でイオンを加速させるための電圧であり、Q0 と Q2 の電位差で表示される)

LLOQ: Low Limited of Quantification(定量下限値)

LOD: Low Limited of Detection(検出下限値)

%CV: Coefficient of Variance (in percent)

RT: Retention Time(保持時間)

S/N: Signal to Noise

IS: Internal Standard(内部標準物質)

4500 シリーズ : Triple Quad™ 4500、QTRAP® 4500

5500 シリーズ : Triple Quad™ 5500、QTRAP® 5500

5500+ シリーズ : Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Ready
Triple Quad™ 5500+ QTRAP® Activated

6500 シリーズ : Triple Quad™ 6500、QTRAP® 6500

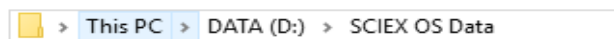
6500+ シリーズ : Triple Quad™ 6500+、QTRAP® 6500+

7500 シリーズ : Triple Quad™ 7500 QTRAP® Ready
Triple Quad™ 7500 QTRAP® Activated

2 ソフトウェアの概要

SCIEX OS®ソフトウェアのファイル構造

- ワークステーションの C ドライブに OS、x ドライブ(x : 納入先仕様により D、E、F 等異なります)に SCIEX OS®ソフトウェアにて取得したデータ等が保存されています。



- また全てのデータ、分析メソッド等は項目(日付、分析者、成分名等)ごとに分類することができ、これを Project と呼びます。

この Project にはそれぞれの【Project 名】をつけることができます。

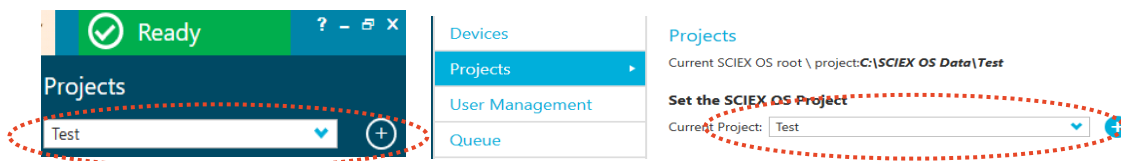
- データ等は該当【Project 名】フォルダ内の Data フォルダ内に保存されます。

(x:// SCIEX OS Data/【Project 名】/Data)

- SCIEX OS®ソフトウェアによって作成されるファイルの種類は様々ありますが、ファイルの種類により特定の拡張子が自動的に付けられます。高い頻度で用いられるのは、.msm(MS メソッド)、.lcm(LC メソッド)、.bch(バッチ)、.wiff(データ)、.qmethod(解析メソッド)及び.qsession(定量結果)です。

Project

- SCIEX OS®ソフトウェアでは、データや測定法、定量結果などを、Project ごとに管理しています。Project は、SCIEX OS®ソフトウェア上部の Status Panel をクリックあるいはホーム画面の Configuration から Project を選択することで表示され、プルダウンメニューにより選択できます。



- データや測定法、定量結果などは、そのファイルが保存されている Project を選択している時にのみ開くことができます。ただし、すでに開いているデータなどは、Project を変更しても表示されたままです。
- 新たに測定を開始する時や、測定者が変わる時などは違う Project を作成し、使用します。
- 例えば、ある測定者が Project を作成し、その Project の中に自分のファイルを保存していると、該当する Project を選択するだけで自分のファイルだけを見ることができるようになります。(x:// SCIEX OS Data/【Project 名】)

バックアップについて



- バックアップを取る際は、SCIEX OS®ソフトウェアがインストールされているドライブ x:// SCIEX OS Data のフォルダごとバックアップすることをお勧め致します。

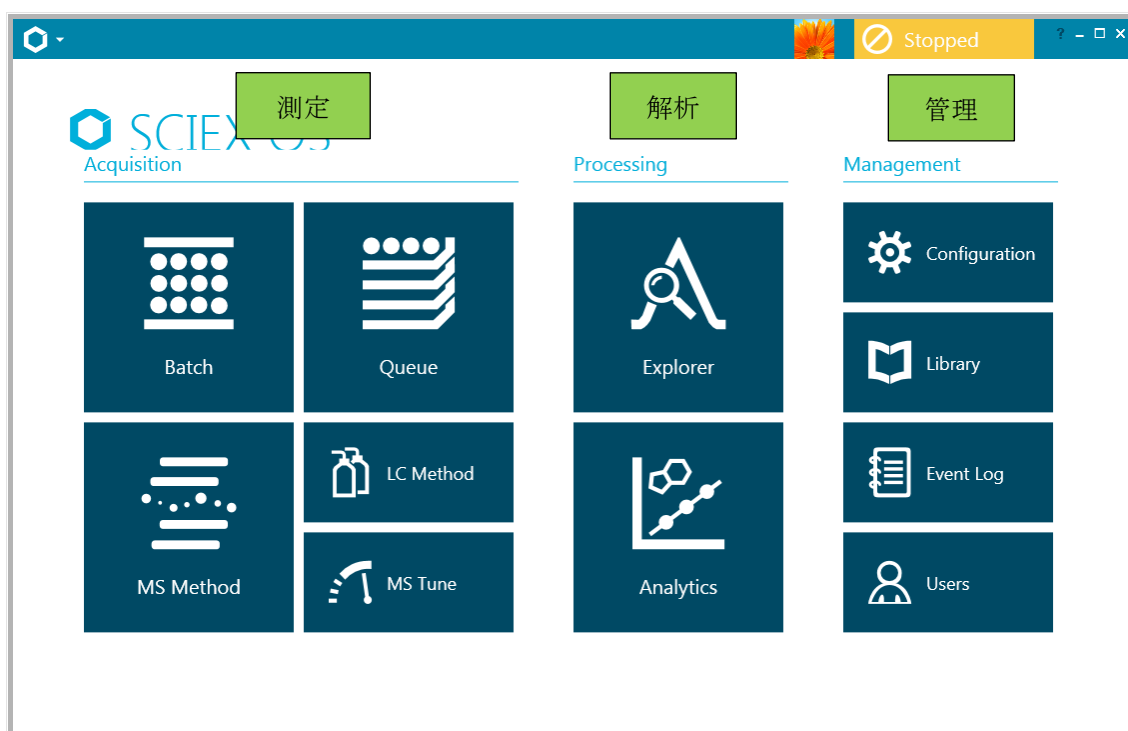
3 SCIEX OS ソフトウェアの起動と各モードについて

SCIEX OS Software ホーム画面

① Desktop の右図アイコンをダブルクリックし、software を起動します。

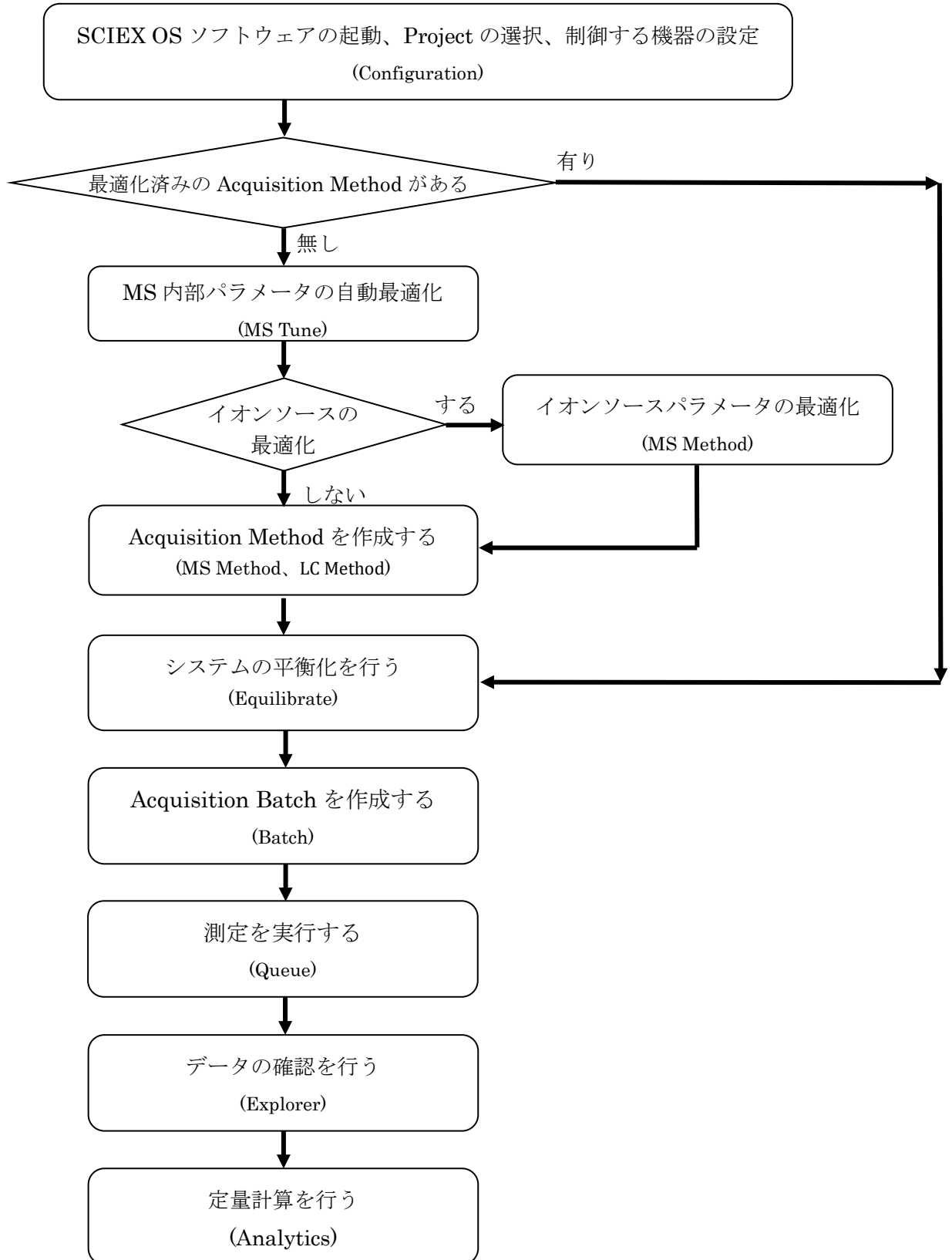


- Acquisition : 装置のチューニングや測定用のメソッドおよびバッチを作成し、データを取り込みます。
- Processing : データの閲覧や組成解析等の定性解析、定量解析、ライブラリー検索等を行います。
- Management : 機器の認識やライブラリーのインポート、ユーザー登録等を行います。
- 複数の Window を表示した際、最初の画面に戻る際は  アイコンをクリックするか、別の設定に移る際は  アイコンをクリックします。




4 測定

4.1 測定の流れ



4.2 ソフトウェアの起動

SCIEX OS ソフトウェアの起動


デスクトップ上の SCIEX OS ソフトウェアのアイコン  をダブルクリックします。

または、Start メニュー> SCIEX OS>SCIEX OS から、SCIEX OS ソフトウェアを起動します。

4.3 プロジェクトの作成

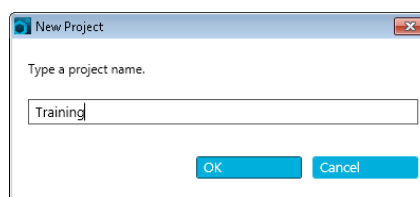
- ① 画面上部右上の Status Panel(例 : ) をクリックします。

クリックを繰り返すことで表示/非表示になります。

- ② Projects の  をクリックし、新規プロジェクトを作成します。

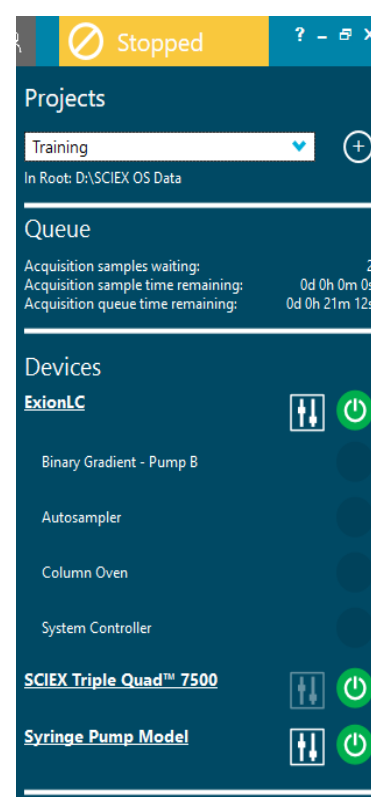
既存のプロジェクトを選択する場合はプルダウンから選択します。

Training では Project 名は Training とします。



- ③ 名称を入力し OK をクリックします。

プロジェクトの保存先 : D:\SCIEX OS Data

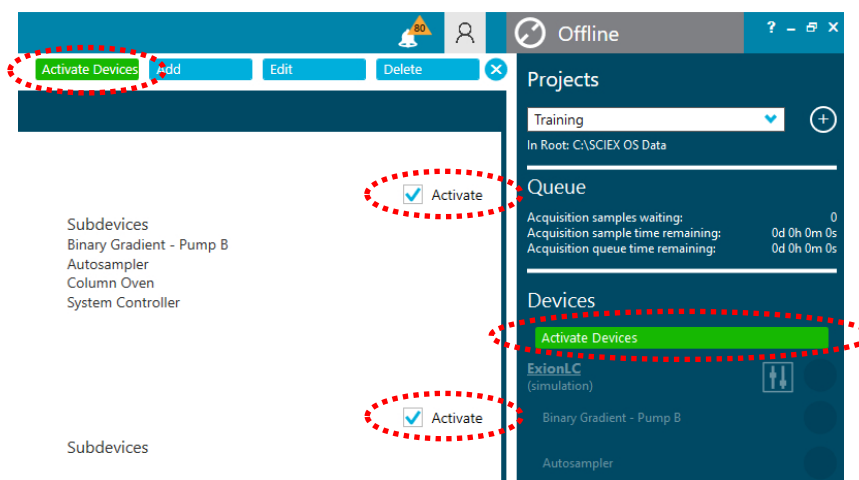
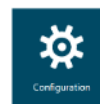


制御する機器を設定する

SCIEX OS ソフトウェアで制御する機器を設定します。

4.4 装置の Configuration

- ① Home 画面から Configuration をクリックし画面を開きます。
- ② Devices をクリックし、MS と LC(ここでは Exion LC)の Active にチェックが入っていることを確認して、**Active Devices** をクリックします。



- ③ アイコンの色で各装置の状態を確認します。
青 : Running → 測定中
緑 : Standby → 正常
赤 : Error → 接続状態を確認してください

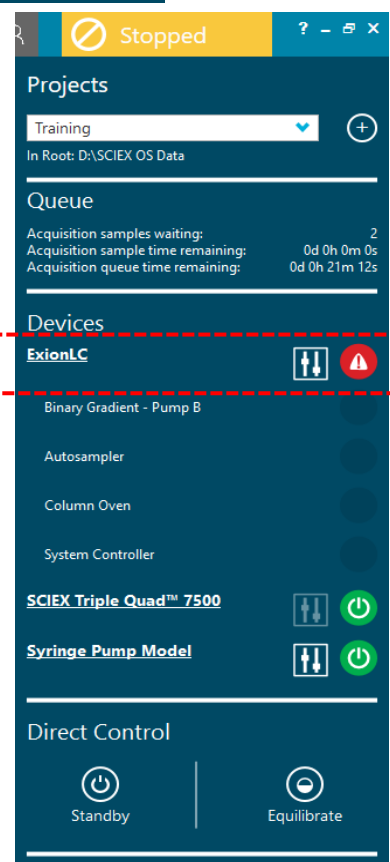
※ 接続されている全ての装置を Standby にするには下部の Direct Control パネルの Standby アイコンをクリックします。

※ Devices の装置名あるいはアイコン(上下矢印と電源)をクリックすることでその装置の詳細な状態を表示することができます。

(LC であれば流速や温度、MS であれば真空度やイオンソースの種類など)

※ 上下矢印アイコン(点線)をクリックすることでその装置に接続されている Device の制御をすることができます。

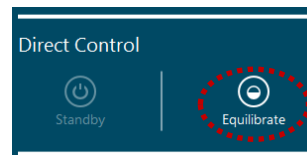
- ④ 画面上部の × をクリックして画面を閉じます。



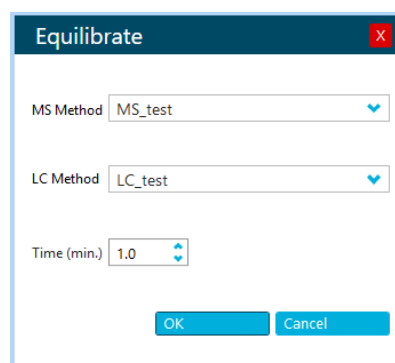
4.5 機器の平衡化

機器の設定が完了しそのまま測定を始める場合や、機器を初期条件に設定する場合は平衡化を行います。

- ① **Status Panel** をクリックし、下部の **Direct Control** の **Equilibrate** アイコンをクリックします。




- ② 平衡化に使用する **MS Method** および **LC Method** をプルダウンより選択します。



- ③ 平衡化する時間を入力し、**OK** をクリックします。

※ **Training** では 1 分とします。

※ 実際の測定では 15 分以上を推奨します。

- ④ **LC** の溶媒が流れ、ガスやターボガスの加熱が始まります。入力した平衡化時間が経過後に画面右上の **Status Panel** が  **Ready** に変わります。

4.6 最適化

ここでは最適化を実施しその結果に基づいた MS メソッドを作成します。

測定用 MS メソッドを作成するには、A)MS 内部パラメータと B)イオンソースパラメータの 2 種類の最適化を行います。まず MS 内部パラメータの最適化を行い、その後イオンソースパラメータの最適化を行います。

A) MS 内部のパラメータの最適化

- DP、EP、CE、CXP などの MS 内部パラメータを最適な値に設定します。
- シリンジポンプを使って、一定の低流速で対象標準物質の溶液を持続注入しながら最適化を行います。※この操作を Infusion(IF)の最適化と呼びます。

【ヒント】

- ✓この最適化は成分ごとに行う必要があります。
- ✓可能な限り単成分の標準液を使用します。
- ✓イオン源の種類(ESI または APCI)が変わっても、最適化し直す必要はありません。
※APCI での最適化は別冊の APCI 操作ガイドをご参照ください。

B) イオンソースのパラメータの最適化

- CUR、CAD、IS、TEM、GS1、GS2 などを最適な値に設定します。
- カラムを付けない状態で LC/MS として複数回注入動作を繰り返しながら最適化を行います。
- この操作を FIA(Flow Injection Analysis)の最適化と呼びます。

【ヒント】

- ✓10 成分まで同時に測定できます。
- ✓イオン源の種類や LC 条件(流速や溶媒比率)が大きく変更された際には、再□最適化を行います。

- Training では Reserpine 標準物質を用いて最適化から定量までを説明していきますが、他の成分でも同様の手順にて測定を行うことが出来ます。

※参考

Calculator を用いたモノアイソトピック質量(精密質量)と平均分子量の計算方法

※ 目的の化合物のモノアイソトピック質量を計算する方法です。

- ① Explorer から Show > Mass Calculators を選択します。
- ② Mass Property のタブをクリックし、Formula に計算する組成式(アダクトを加味したもの)を入力します。
- ③ Calculate をクリックすることで、Monoisotopic m/z にモノアイソトピック質量が表示されます。(平均分子量は Charged average mass に表示されます。)


The image shows two side-by-side calculator windows. The left window is titled 'Positive Mode' and the right is 'Negative Mode'. Both have 'Mass Property' selected in the top tabs. The 'Formula' field in both is 'C33H40N2O9'. In the 'Positive Mode' window, the 'Charge state' is '1' and the 'H+' checkbox is checked. The 'Negative Mode' window has a 'Charge state' of '-1' and the 'H+' checkbox is also checked. Below the 'Calculate' button, various mass values are displayed: Charged monoisotopic mass, Monoisotopic m/z, Charged average mass, Nominal mass, and RDB.

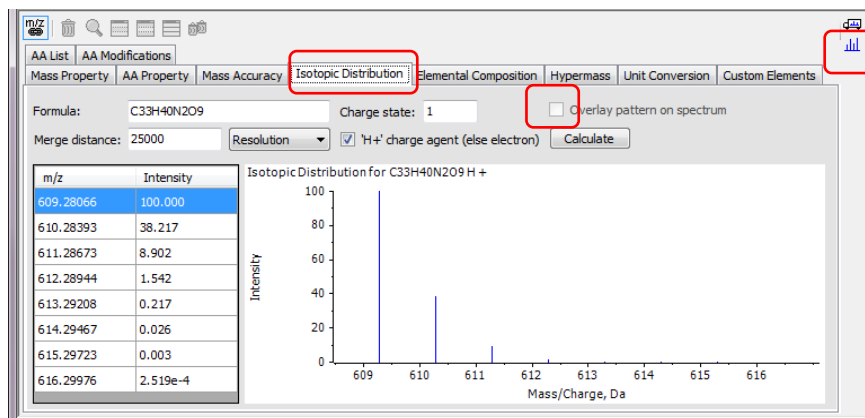
※ Formula には中性の組成式、'H+' charge agent (else electron)のチェックボックスにチェックを入れ、Charge State には 1 ないしは -1 と入力すると、Positive Mode は+H、Negative Mode は-H として精密質量を自動計算できます。

※ Charge State 入力例: Positive Mode: 1, Negative Mode: -1

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、 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 にチェックを入れてください。



A) MS 内部のパラメータの最適化(Infusion による自動最適化)

Infusion による最適化では MS のみを使用するため、先述の機器の Configuration は MS のみ Activate のチェックを入れて Active の状態にしておきます。

【Infusion 最適化の準備 – シリンジの接続 –】

① 標準物質の溶液を調製します。

※ Training では Reserpine を使用します。

※ Infusion の最適化時に使用する標準液の目安となる濃度

機種	濃度
4500 シリーズ	100 ng/mL
5500 および 5500+ シリーズ、6500 および 6500+ シリーズ、7500 シリーズ	10 ng/mL

② 標準溶液を、5 mL のシリンジに詰めます (1mL のシリンジも使用可能です)。

③ シリンジポンプにセットします。

④ ターボイオン Sprey が装着されていることを確認します。

⑤ イオンソースのタイプは Status Panel の装置名あるいはアイコンをダブルクリックすると表示されます(P.4-3 参照)。

⑥ シリンジから繋がるピークチューブをバルブを経由しイオンソースへ接続します。



スプレー位置の調整： (7500 シリーズは必要ありません)

・ Infusion 測定時

(流速：5～20uL/min 程度)

縦 (X) 位置：5

横 (Y) 位置：5

※オリフィスに一番近い位置
になります。

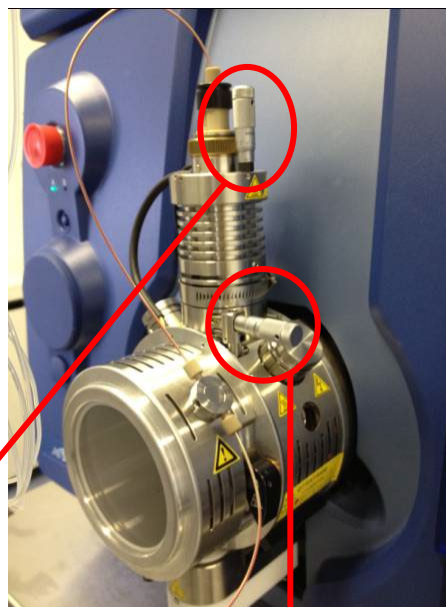
・ LCMS 測定時

(流速：200～500uL/min 程度)

縦 (X) 位置：3 or 2

横 (Y) 位置：7

※オリフィスから少し離すことで
感度が向上すると共に、
汚れにくくなります。



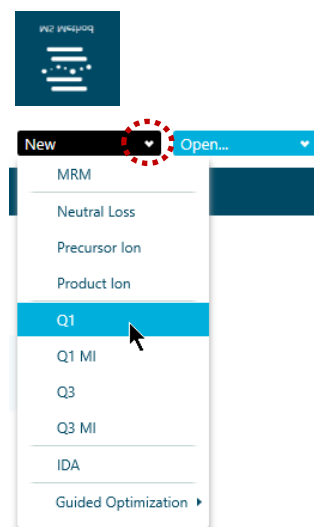
縦 (X) 位置



横 (Y) 位置

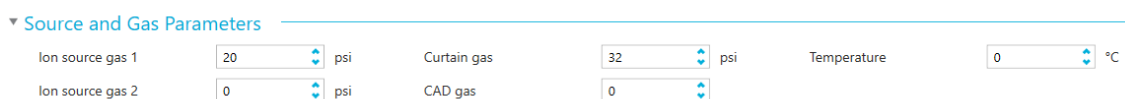
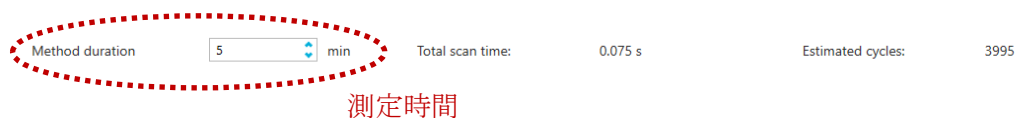
【Infusion 最適化の準備 –ピークの確認–】

- ① Home 画面の MS Method アイコンをクリックします。
- ② 上部にある New の下矢印(右図参照)をクリックします。
- ③ [Q1]を選択します。



- ④ Method duration に測定時間を入力します。

※ 持続注入が安定しているかどうかを確認するには 5~10 分程度を入力します。



Mass Table [Import from file...](#)

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	EP (V)
1	590.000	660.000	0.0701	10.0
*				

スキャンする質量範囲

Scan rate

- ⑤ Scan rate を 1000 Da/s に設定します。
- ⑥ Start mass および Stop mass にスキャンする範囲を入力します。Reserpine(分子量 608)の場合、Start-Stop には 590 から 660 までを入力します。

【ヒント】

- ※ 分子量の 10Da 程度小さい値から、50Da 程度大きい値 (アダクトイオンを確認するため) を入力します。
- ※ 複数化合物を同時に最適化する場合、全ての化合物が見られる範囲とします。


- ⑦ 下部にある Data Acquisition バーの Start をクリックします。

- ⑧ 以降を参考に流速は、5~10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度でシリンジポンプをスタートします。

【ヒント】

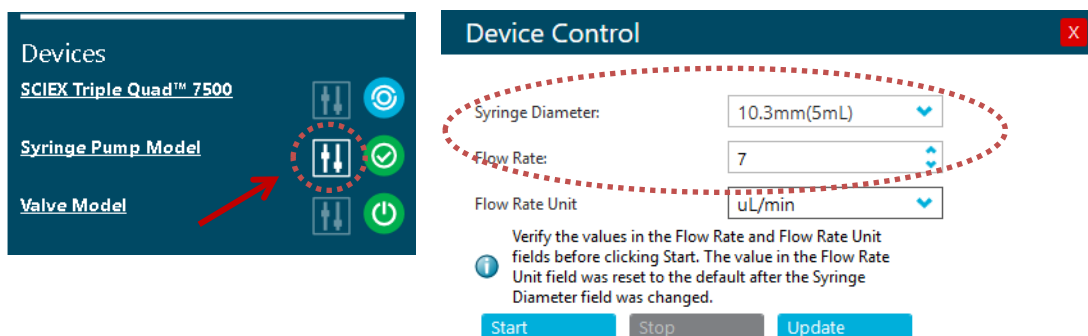
- ※ 最初はチューブの中にエアが入っているので、スペクトルが不安定になることがあります。しばらく経つと安定します。急ぐ場合は、シリンジを少し手で押すか、流速を最初だけ 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程に上げることで、安定するまでの時間を短縮することができます。

シリンジポンプのスタート方法

- ① Status Panel の Devices の Syringe Pump Model  のアイコンをクリックし、Syringe Pump 情報を表示させます。

- ② Syringe Diameter にシリンジの内径を、Flow rate に流速を入力します。

- ※ 納品時付属の 5 mL ガスタイトシリンジ(TRAJAN 社製)の内径は 10.3 mm になります。



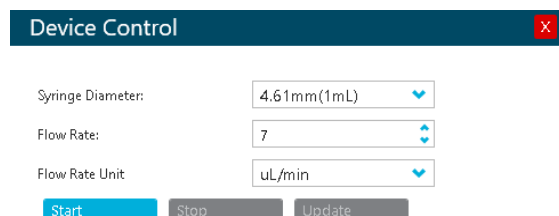
- ③ Start ボタンをクリックします。

- ※ 測定途中で流速をかえたいときは、Flow rate に流速を入力後 Update ボタンをクリックします。

- ※ シリンジポンプを止めたいときは、Stop ボタンをクリックします。

- ※ 1 mL ガスタイトシリンジ(ハミルトン社製など)でも可能です。

その場合は下記のように選択します。



⑨ 以下の4項目を確認し、安定していれば **Stop** をクリックします。

- a. 左下のクロマトグラム画面の **TIC** が安定していること
- b. 画面下部の **Data Acquisition** バーをクリックすると **TIC** が表示できます。



Positive、Negative Mode のどちらでイオン化するか確認すること

※ Training で使用する Reserpine の場合、Positive モードの方がよりイオン強度が大きくなります(m/z 609)。

- c. 目的化合物由来のイオンが観測されていること
- d. 目的化合物由来のイオンのイオン強度が $10^5 \sim 10^6$ cps ($e^5 \sim e^6$ cps) 程度であること

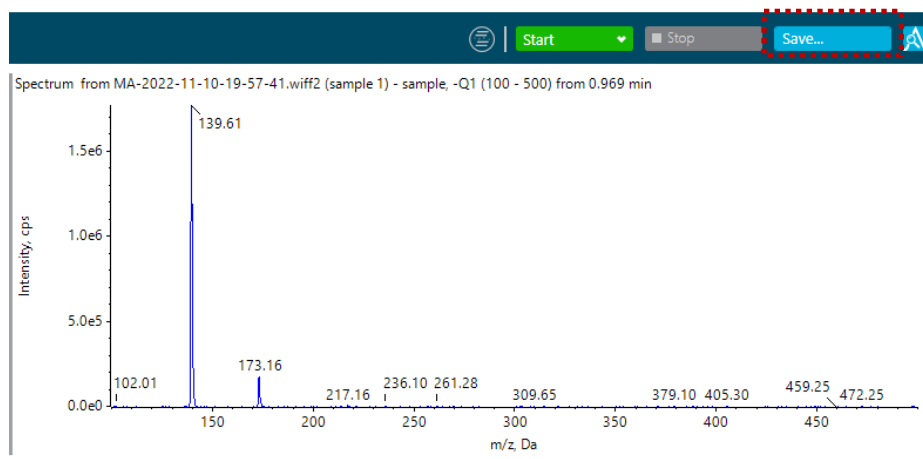
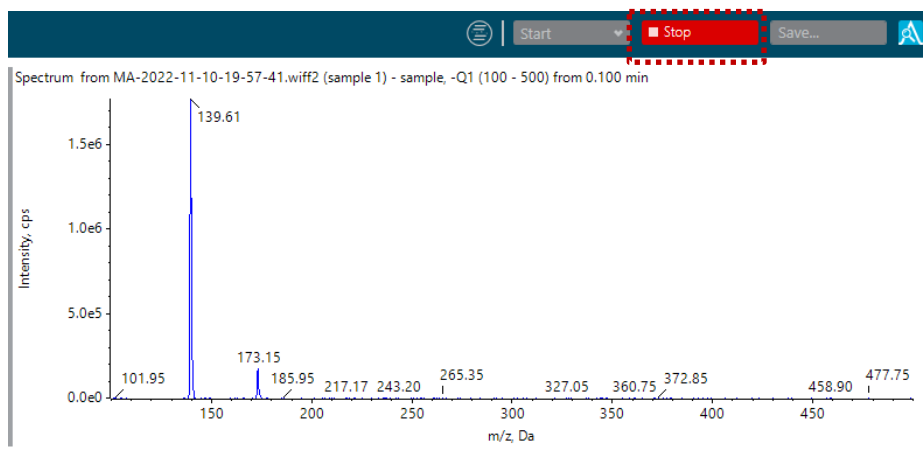
⑩ 測定後に右上の **Save** ボタンから結果を保存することができます。

(Training では **Reserpine_Q1_posi** と名前をつけて保存します)

※ このメソッドは下記の場所に保存されます。

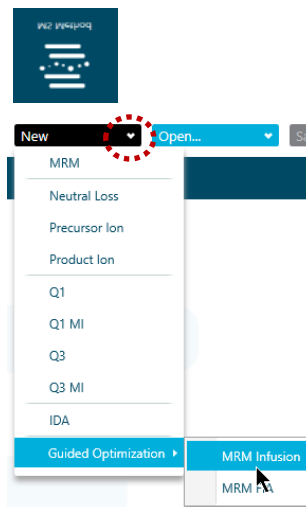
D:\¥SCIEX OS Data¥【Project名】¥Data ¥Reserpine_Q1_posi.wiff2

D:\¥SCIEX OS Data¥【Project名】¥Data ¥Reserpine_Q1_posi.wiff.scan



【Infusion 最適化の開始】

- ① Home 画面の MS Method アイコンをクリックします。
- ② 上部にある New の下矢印(右図参照)をクリックします。
- ③ Guided Optimization を選択し [MRM Infusion] を選択します。



- ④ Preparation の画面が開きます。

Preparation

Select the mode of optimization.

Method Creation Automatic (all done for you) ← メソッドの作成方法を選択
 Guided (you have some control)

Polarity Positive ← 極性を選択
 Negative

Find transitions automatically

Compound Name:

Charge: ▼

Precursor Ion: Da

Number of Fragments to Use: ▼

化合物名および価数を入力
プリカーサーイオンの m/z
最適化に使用する
フラグメントイオン数を入力

- ⑤ メソッドの作成方法を選択します(Training では Automatic を選択)。
Guided にすると任意でパラメータ値の設定が可能になります。
- ⑥ 極性を選択します(Training では Positive を選択)。
- ⑦ Find transitions automatically(通常はこちらを使用します)
- ⑧ 化合物名および価数を入力します(Training では Reserpine、価数は 1 とします)。
- ⑨ プリカーサーイオンの m/z を入力します。
※ Training では Q1 Scan で確認した値を入力します。
- ⑩ 最適化するフラグメントイオンの数を入力します(Training では 3-5、最大 10)
- ⑪ 右上の Continue をクリックします。

⑫ MS が Running の状態になり、初期パラメータの設定の画面に切り替わります。

【ヒント】

Use known transitions(既知のフラグメントイオンについて最適化するとき)

① MRM の表に化合物名と Q1 および Q3 を入力します。

※ この表は複数行入力することができます。また Excel にも対応しています。

② 右上の Continue をクリックします。

※ このモードを使用した場合は、後のプロダクトイオンの選択は実施されません。

Use known transitions

Enter the transitions:

▼ MRM

Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)
1	Reserpine 609.0000	195.0000

<パラメータの設定の画面>

MS パラメータ

▼ Source and Gas Parameters

Curtain gas 32 psi Ion source gas 1 20 psi Ion source gas 2 0 psi

Spray voltage 5500 V Temperature 0 °C

▼ Q1

Start mass 5 Da Stop mass 1250 Da Polarity Positive

Scan rate 200 Da/s

← スキャンする範囲を入力します

⑬ MS パラメータは下記の初期パラメータを入力します。

<Infusion 最適化のイオンソースのパラメータ初期値>

4500 シリーズ、5500 および 5500+ シリーズ、6500 および 6500+ シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (7 µL/min, Infusion)
Gas1	0~90	20
Gas2	0~90	0
CUR	32~55	35
CAD	0~15	9
TEM	0~750	0
IS	0~5500	5500 (4500)

7500 シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (7 µL/min, Infusion)
CUR	32~55	40
Gas1	0~90	20
Gas2	0~90	0
IS	0~5500	5500(4500)
TEM	0~750	0
CAD	0~15	9

※ カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します。

- ⑭ Q1 の Start mass および Stop mass にスキャンする範囲を入力します。Reserpine(分子量 608)の場合、Start-Stop には 590 から 660 までを入力します。

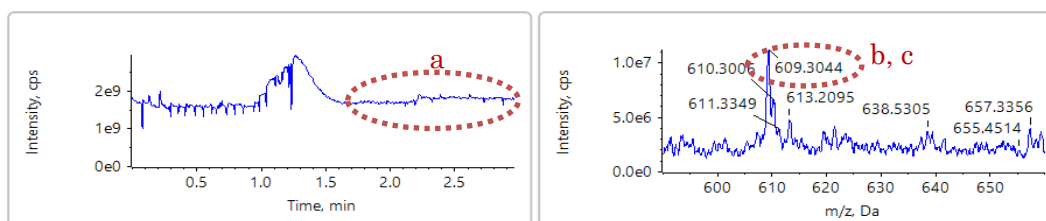
※ 一度 Stop した後に再度 Start をクリックすることで範囲が再設定されます。



- ⑮ Q1 測定の際と同様に以下の 4 項目を確認します。

自動最適化を実行するためには、以下の条件が満たされている必要があります。確認後、Next ボタンを押して自動最適化を開始します。

- 左下のクロマトグラム画面の TIC が安定していること
- 目的化合物由来のイオンが観測されていること
- 目的化合物由来のイオンのイオン強度が $10^5 \sim 10^6$ cps ($e^5 \sim e^6$ cps) 程度であること

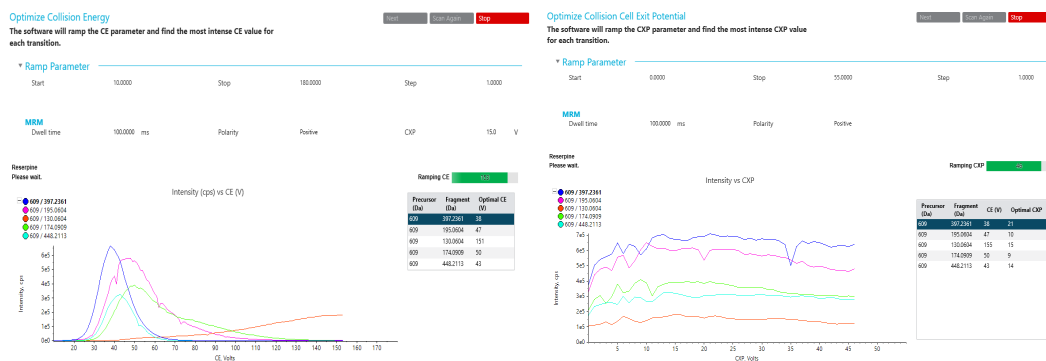
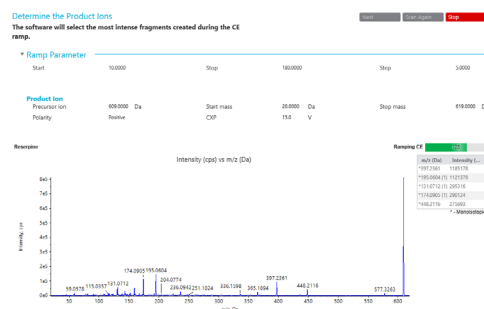


- ⑯ プロダクトイオン、DP、CE、CXP の最適値が自動で選択されます。(DP は 7500 シリーズ以外)

右 : プロダクトイオンの選択画面

左下 : CE の最適化画面

右下 : CXP の最適画面



⑰ 自動で結果が出てくるので必要に応じてデータを保存します。

※ 最適化したデータは、自動で下記フォルダ内に保存されます。

※ D:\¥SCIEX OS Data¥TempData¥OPT- 【測定日時】

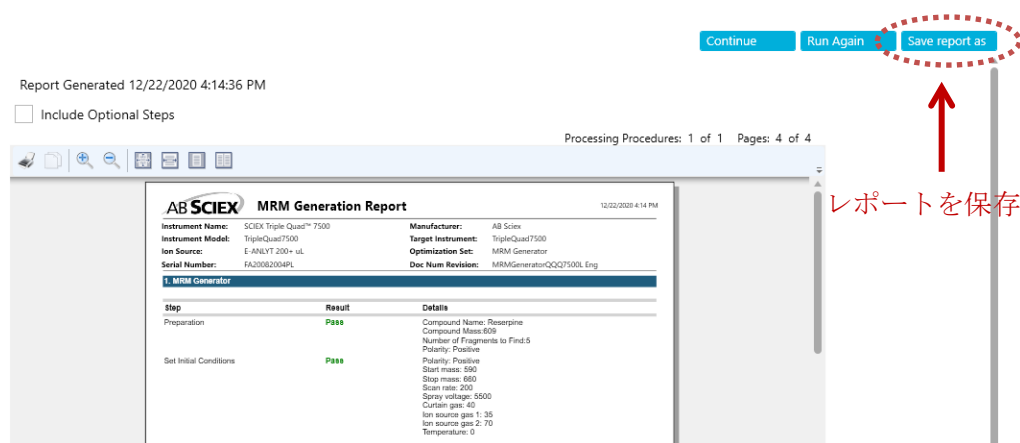
※ 結果のレポートは自動では保存されませんのでご注意ください。

※ 保存形式は XPS ファイルとなります。

※ Window10 は XPS Viewer が標準でインストールされていないため、上記⑰で保存しても開くことができません。開かない場合は Print を選び、PDF として保存します。

※ 保存先はお使いのプロジェクト内あるいは Desktop 等適宜フォルダを作成して保存します。

Report



⑱ Continue ボタンをクリックすると最適化の結果に基づいたメソッドが作成されますので名前をつけて保存します(Training では **Reserpine_MRM_posi** と名前をつけて保存します)。

※ このメソッドは下記の場所に保存されます。

D:\¥SCIEX OS Data¥ 【Project 名】 ¥Acquisition Methods ¥Reserpine_MRM_posi.msm

⑲ Devices の Syringe Pump Model の  アイコンをクリックし、Stop をクリックしてシリンジを停止します。

B)イオンソースの最適化を行う(FIAによる自動最適化)

- ※ 必須ではありません。イオン源パラメータ初期値で測定し、期待の感度に達していない場合などに行います。
- ※ FIAによる最適化ではLCおよびMSを使用するため、先述の機器の Configuration はLCおよびMSの両方の Activate にチェックを入れて Active にします。

【FIA最適化の準備—LCの接続—】

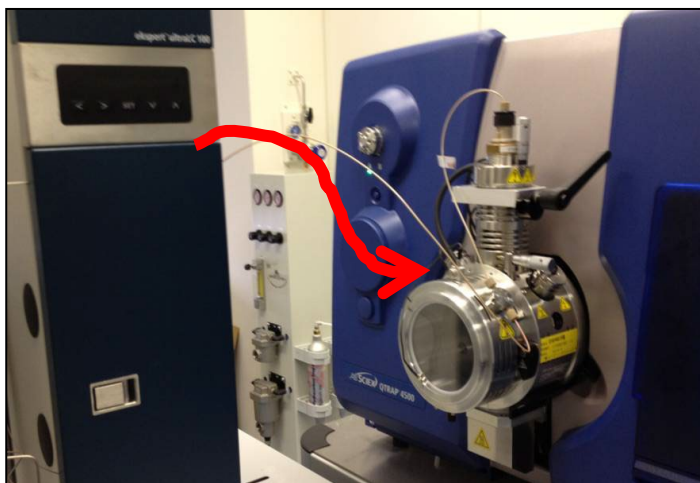
- ① LC移動相を準備します。
 - ※ 実際の測定時に使用するLC溶媒を推奨します。
- ② 標準溶液を準備します。
 - ※ 標準溶液濃度の目安は下記をご参照ください。

機種	濃度
4500 シリーズ	10 ng/mL
5500 および 5500+ シリーズ、6500 および 6500+ シリーズ、7500 シリーズ	1 ng/mL

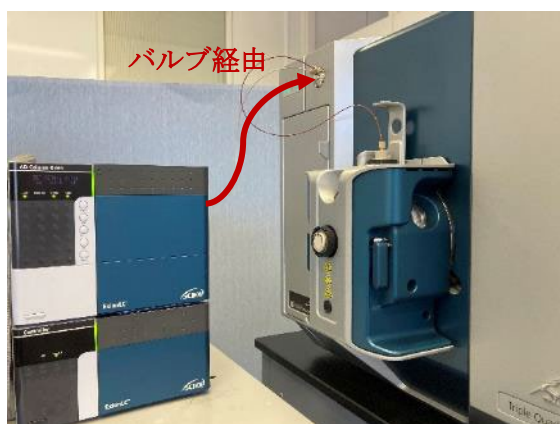
【ヒント】

- ※ Infusion 最適化時の 1/10~1/1 濃度の標準液を使用します。
- ※ Training に使用する LC 移動相と標準液 Reserpine については、講義資料のその他の Tips の項を参照ください。

- ③ LC と MS を接続します。
- ④ カラムオープンから出ているピークチューブを直接イオンソースに接続して下さい。
- ⑤ p4-8 の“スプレー位置の調整”の LC/MS の測定時の項を参考にスプレー位置を調整します。(7500 シリーズ以外)



(7500 シリーズ) カラムオープンから出ているピークチューブをバルブに接続して下さい。



【FIA 用のメソッドの作成—MS メソッド—】

① Infusion で最適化した MS メソッドを上部の Open から選択して開きます。

※ Training では **Reserpine_MRM_posi** を選択します。

② Method duration に測定時間を入力します(Training では 1 分とします)。

Method duration	1	min
-----------------	---	-----

③ Source and Gas Settings に下記のイオンソースの初期パラメータを入力します。

▼ Source and Gas Parameters

パラメータ名	入力値	単位
Ion source gas 1	50	psi
Ion source gas 2	60	psi
Curtain Gas	35	psi
CAD Gas	9	-
Source temperature	350	°C

④ 作成したメソッドを保存します。

※ Training では Reserpine_FIA_posi として保存します。

<FIA 最適化のイオンソースのパラメータ初期値>

4500 シリーズ、5500 および 5500+ シリーズ、6500 および 6500+ シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (200 µL/min, FIA)	Heated Nebulizer (1000uL/min)
Gas1	0~90	50	50
Gas2	32~55	60	N/A
CAD	0~750	9	9
CUR	0~90	35	35
TEM	0~15	350	400
IS	0~5500	5500(-4500)	2(-2)

※ カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します。

※ Negative の IS の下限は-4500 です。

※ TIS の設定温度(TEM)は最大 700℃までにご覧ください。

750℃でも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

7500 シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (200 µL/min, FIA)	Heated Nebulizer (1000uL/min)
Gas1	0~90	50	30
CUR	32~55	40	40
TEM	0~750	400	300
Gas2	0~90	60	N/A
CAD	0~15	9	9
IS	0~5500	5500(4500)	2(-2)

※ カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します。

※ CUR の推奨値は 40 以上です。感度が十分な場合は 40 に設定して下さい。

※ TIS の設定温度(TEM)は最大 700℃までにご覧ください。

750℃でも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

【FIA用のメソッドの作成—LCメソッド—】

FIA最適化では、Infusionで最適化したMSメソッドの他にLCメソッドが必要です。
続いてLCメソッドを作成します。

- ① Home画面のLC Methodアイコンをクリックします。
- ② 上部にあるNewをクリックします。
- ③ 以降の各LCの入力方法を参考に以下のLC条件を入力します。



カラム	なし	
移動相 : A : B	0.1%ギ酸を含む精製水、または0.1%酢酸を含む精製水 アセトニトリル、またはメタノール	
グラジエント Time [min.]	0	1.0
A [%]	50	50
B [%]	50	50
流速(μl/min)	200	
カラム温度[°C]	40	
サンプルクーラー[°C]	5	
注入量[μL]	10	

【Exion 2.0 の場合】

① LC System をクリックします。

※ バツマークが入っている場合はその上を右クリックし、Use を選択します。
ださい。

② Binary Pump タブをクリックします。

③ Stop Time に 1.0min、
Flow (流速)、B Conc.に
適当な値を入力します。

※ 流速、移動相組成は、
実際に使用する組
成、流速を入力して
ください。

※ 将来、グラジェント
で分析される場合
は、対象成分が検出
される時の溶媒組成
を入力して下さい。

※ Training では 0.2 (mL/min) 、に 50 (%) を入力してください。

④ Autosampler タブをクリックします。

⑤ Rack setting の Use a specific rack にチェックをいれます。使用するラックタイプを選択します。

⑥ Advanced settings の「▶」をクリックし、Injection method の設定を行います。

※ 下図のように設定します。

▼ Advanced settings

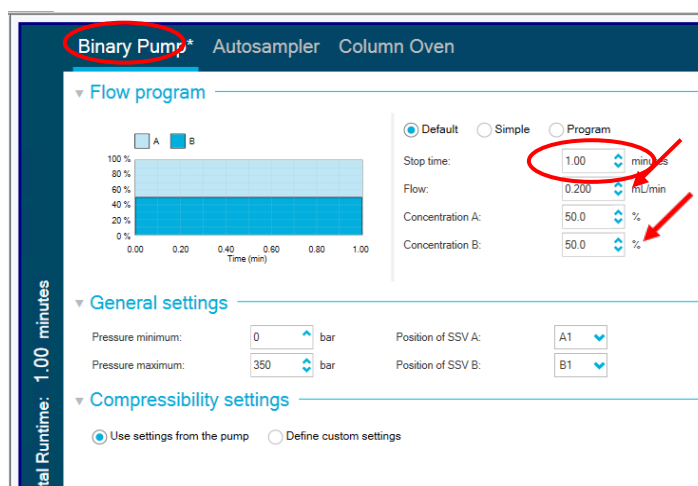
Syringe speed:	Low	Injection method:	μL pickup plus
Syringe speed factor:	0.8	Transport segment:	35.0 μL

⑦ 必要に応じて Rinse mode、Tray themostatting を使用します。

⑧ Injection をクリックし注入量を入力します。

⑨ File メニュー > Save as を選択し、適当なファイル名を入力し、保存します。

※ Training では Reserpine_FIA.dam と入力します。



▼ General settings

Use autosampler:	<input checked="" type="checkbox"/>
Injection volume:	10.0 μL

【ExionLC、島津社製 LC の場合】

① Binary Gradient タブをクリックします。

② Stop Time に 1.0min、Flow (流速)、B Conc.に 適当な値を入力します。

※ 流速、移動相組成は、実際に使用する組成、流速を入力してください。

※ 将来、グラジェントで分析される場合は、対象成分が検出される時の溶媒組成を入力して下さい。

※ A Conc.には入力できません。必ず B Conc.に入力して下さい。

※ Training では 0.2 (mL/min) 、に 50 (%) を入力して下さい。

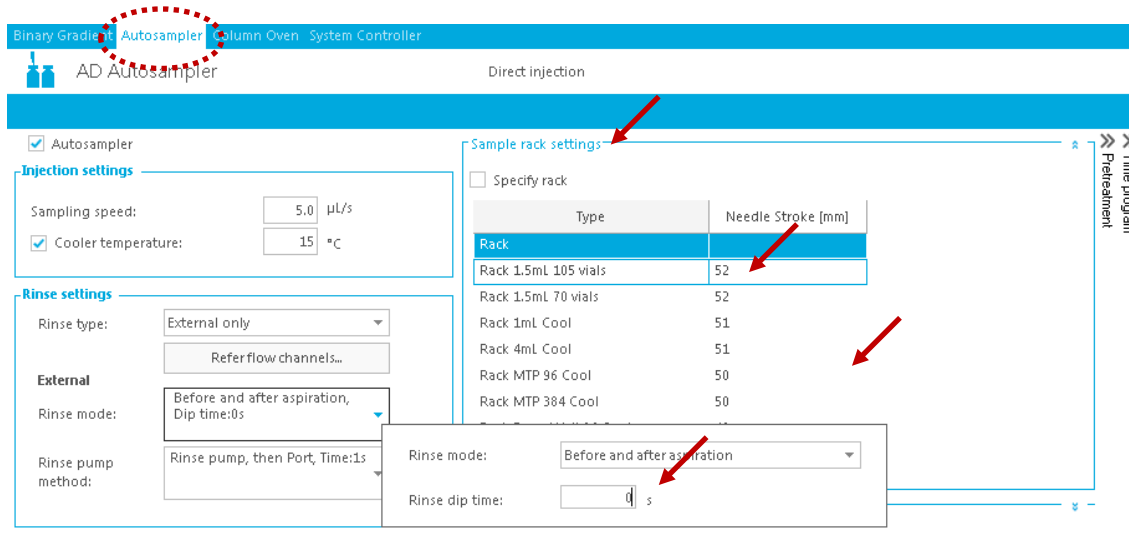
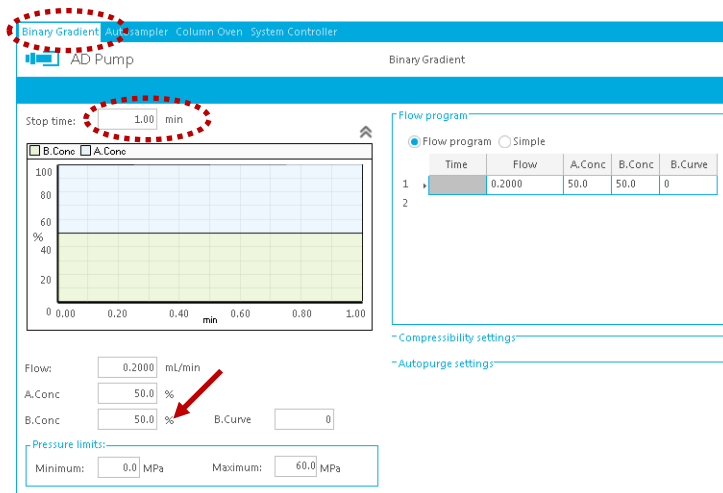
③ Autosampler タブをクリックします。

④ Sample Rack Settings をクリックします。

⑤ 1.5mL バイアルの場合は、Needle Stroke を 52 mm に変更します。

96well プレートの場合は、Needle Stroke を 50 mm に変更します。

⑥ Rinse Settings の Rinse Mode を Before and after aspiration に、Rinse Dip Time (オートサンプラーのニードル Wash 時間) に 0 sec を入力します。




⑦ 必要に応じて Rinsing Volume、Rinse Method、Cooler Temperature を入力します。

⑧ メソッド上部にある Injection Volume に注入量を入力します。

※ Training では 10 μ L とします。

Injection Volume μ L



【注意】

※ Injection Volume は 100 と入力することができますが、50 μ L 以上入力しないでください。

⑨ 上部にある Save ボタンの下矢印をクリックして Save as を選択し、適当なファイル名を入力して保存します。

※ Training では **Reserpine_FIA** と入力します。

【Agilent 社製 LC の場合】

- ① LC Pump : Binary Pump タブをクリックします。
- ② 画面の左側に Pump のパラメータ、右側にタイムテーブルが表示されます。

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]	Max. Pressure Limit [MPa]
0.00	50.0	50.0	0.200	40.000
1.00	50.0	50.0	0.200	40.000

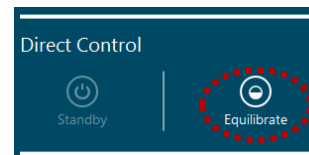
- ③ 流速、移動相組成は、実際に使用する組成、流速を入力してください。
 - ※ Training では流速 0.2 mL/min 、Solvents に B 50 % を入力してください。
- ④ タイムテーブルにグラジエント条件を入力します。
 - ※ Training では③の条件で 1 分間とします。
- ⑤ Column Oven : Column Comp.タブをクリックします。
- ⑥ Temperature を 40°C と入力します。
- ⑦ Autosampler : Sampler タブをクリックします。
- ⑧ Injection Volume(注入量)を入力します。
 - ※ Training では 10 μ L とします。

Injection volume: 10.00 μ L

- ⑨ 上部にある Save ボタンの下矢印をクリックして Save as を選択し、適当なファイル名を入力して保存します。
 - ※ Training では **Reserpine_FIA** と入力します。

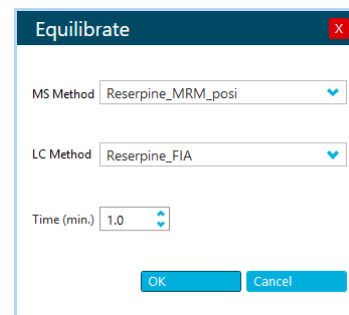
FIA 用に作成したメソッドで機器を平衡化する

- ① LC のラインが MS に接続されていることを確認します。
- ② 標準溶液の入ったバイアルをオートサンプラーに置きます。
- ③ **Status Panel** をクリックし、下部の **Equilibrate** アイコンをクリックします。




- ④ 平衡化に使用する **MS Method** および **LC Method** をプルダウンより選択します。

- ※ **Training** では下記のように選択します。
MS Method : Reserpine_FIA_posi
LC Method : Reserpine_FIA



- ⑤ 平衡化する時間を入力し、**OK** をクリックします。

- ※ **Training** では 1 分とします。
- ※ 実際の測定では 15 分以上を推奨します。

- ⑥ 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 分後に画面右上の **Status Panel** が  **Ready** に変わります。


- ⑦ この平衡化で、イオンソースの温度や LC が作動し始めます。
- ⑧ イオンソース全体が温度平衡になるのに 10 分程度かかりますので、その後 **FIA** による最適化を始めます。

【FIAによるイオンソースの自動最適化の開始】

- ① Home 画面の MS Method アイコンをクリックします。
- ② 上部にある New の下矢印(右図参照)をクリックします。
- ③ Guided Optimization を選択し[MRM FIA]を選択します。
- ④ 測定条件を入力する画面が開きます。

Set Initial Acquisition Values

Provide initial acquisition method settings to use in obtaining initial LC-MS cond

LC Method  LC Method を選択

Injection volume μL

Method duration min

Rack Type Rack Type を選択

Rack Position

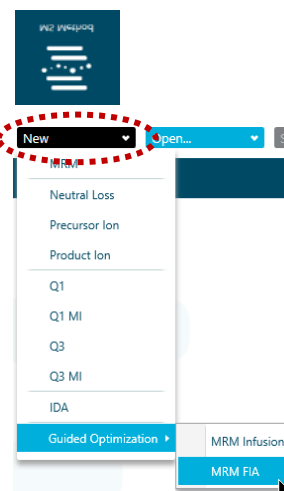
Plate Type Plate Type を選択


Plate Position

Polarity

	Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	CE (V)	CXP (V)	Dwell time (ms)	Vial Position
1	Reserpine 1	609.000	397.000	38.0	21.0	100.0	1
*							

Infusion 最適化で取得した MRM を入力



- ⑤ 使用する LC Method を選択します。
- ⑥ Training では Reserpine_FIA を選択します。
- ⑦ LC Method アイコン  をクリックすると LC 条件を確認できます。
- ⑧ Rack Type および Plate Type を選択し、Injection Volume、Method duration、Polarity に間違いがないかを確認します(Injection Volume は Method の設定値が採用されます。ここで変更しても元のメソッドの Volume の値分消費します)。
- ⑨ Infusion 最適化で取得した MRM 情報を入力します(最大 10 まで)。
 - ※ Training ではそのうちの 1 つを入力します。
 - ※ Excel で編集したものをコピー&ペーストでも入力可能です。
 - ※ Dwell time は 100 ms とします(デフォルト設定)。
- ⑩ セットしたバイアル位置を入力します。
 - ※ Training では Vial Position は 1 とします。
- ⑪ Next をクリックし、次の画面に進みます。

【注意】

※ 入力行ごとにバイアルポジションを変えるとそれぞれの行に対して最適化を行いますので、最適化が終了した後、複数のメソッドに分かれます。

⑫ FIA 最適化で使用する MS の初期パラメータを入力します。

⑬ Source and Gas Parameters に下記の初期パラメータを入力します。

Set Initial LC-MS Conditions **初期パラメータ入力**

Next Start Stop

Set the initial LC-MS conditions to be used in the optimization step, by testing with different parameter values per compound.

Initial conditions with **Reserpine 1** Vial position: 1

▼ Source and Gas Parameters

Ion source gas 1: 35 psi Curtain gas: 40 psi Temperature: 0 °C
 Ion source gas 2: 70 psi CAD gas: 9 Spray voltage: 5500 V

▼ MRM

CE: 38 V CXP: 21 V Q1 resolution: Unit
 Q3 resolution: Unit

<イオンソースのパラメータ初期値>

4500 シリーズ、5500 および 5500+ シリーズ、6500 および 6500+ シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (200 µL/min, FIA)	Heated Nebulizer (1000uL/min)
Gas1	0~90	50	60
Gas2	32~55	60	N/A
CUR	0~750	35	35
TEM	0~90	350	400
CAD	0~15	9	9
IS	0~5500	5500(-4500)	2(-2)

- ※ カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します。
- ※ Negative の IS の下限は-4500 です。
- ※ TIS の設定温度(TEM)は最大 700°Cまでにご覧ください。
750°Cでも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

7500 シリーズ

	設定範囲	TurboIonSpray®Source (200 µL/min, FIA)	Heated Nebulizer (1000uL/min)
Gas1	0~90	50	30
CUR	32~55	40	40
TEM	0~750	400	300
Gas2	0~90	60	N/A
CAD	0~15	9	9
IS	0~5500	5500(4500)	2(-2)

- ※ カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します。
- ※ CUR の推奨値は 40 以上です。感度が十分な場合は 40 に設定して下さい。
- ※ TIS の設定温度(TEM)は最大 700°Cまでにご覧ください。
750°Cでも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

⑭ 上部の Next ボタンをクリックします。

⑮ イオンソースパラメータの検討方法を設定します。

※ パラメータの振り方は範囲指定(Range)と値指定(Discrete)があります。

※ 最適化の指標は強度(Intensity)と S/N(Signal To Noise)があります。

※ Training では Range および Intensity を選択します。



⑯ 下記のようにイオンソースパラメータの検討範囲を設定し Start ボタンをクリックします。

Initial Parameter Values

Optimize	Parameter Name	Initial Value	Start	Stop	Step
<input type="checkbox"/>	CE (v)	Show all...	20	50	10
<input type="checkbox"/>	CXP (v)	Show all...	5	15	5
<input checked="" type="checkbox"/>	Curtain Gas (psi)	40.0	32	48	8
<input checked="" type="checkbox"/>	CAD Gas	9.0	6	10	2
<input checked="" type="checkbox"/>	Spray Voltage (V)	5500.0	1500	2500	500
<input checked="" type="checkbox"/>	Temperature (°C)	0.0	350	550	100
<input checked="" type="checkbox"/>	Ion Source Gas1 (psi)	35.0	20	40	10
<input checked="" type="checkbox"/>	Ion Source Gas2 (psi)	70.0	50	70	10

Replicate injection for each step 1

Cycle times...

1) 最適化するパラメータは Optimize にチェックを入れます。

※ CE および CXP を最適化しない場合はチェックを外します。

※ Infusion 最適化をしているので Training ではチェックを外します。

2) CE および CXP 以外のパラメータは 1 条件につき 1 注入です。

3) 注入する回数の合計は右下の Sample injections に表示されています。

4) 1 注入が 10 μL で注入回数が 20 回の場合、溶液は合計で 200 μL 使用しますので 500 μL 程度をバイアルに準備します。

※ 下の例は 20 本中 13 条件目を測定中で合計 200 μL 使用

Sample injections: 13 / 20

Total sample volume: 200 μL

5) 最適化が完了したパラメータは下段の Optimized Parameter Values に自動で入力されます。

⑰ 最適化が完了後に Next ボタンをクリックします。

- ⑱ 結果レポート画面が出力されます。
- ※ このレポートは測定データとともに自動で下記フォルダ内に保存されます。
D:\¥SCIEX OS Data¥Optimization¥FIAOptimization-【測定日時】
 - ※ 最適化が完了した MS メソッドは下記フォルダに自動で保存されます。
また、右上の **Open in MS Method Editor** ボタンから最適化された MS メソッドを見ることができます。
D:\¥SCIEX OS Data¥【Project 名】¥Acquisition Method¥FIA-【測定日時】
- ⑲ メソッドに測定時間を入力します。
- ※ LC の測定時間が既知の場合は **Method duration** にその時間を入力します。
 - ※ **Training** では 6 分と入力します。
- ⑳ 測定メソッドとして保存します。
- 上部の **Save** ボタンの下矢印から **Save as** で名前をつけて測定メソッドとして保存します。
- ※ **Training** では **Reserpine_MRM** とします。

※ 参考(Dwell time について)

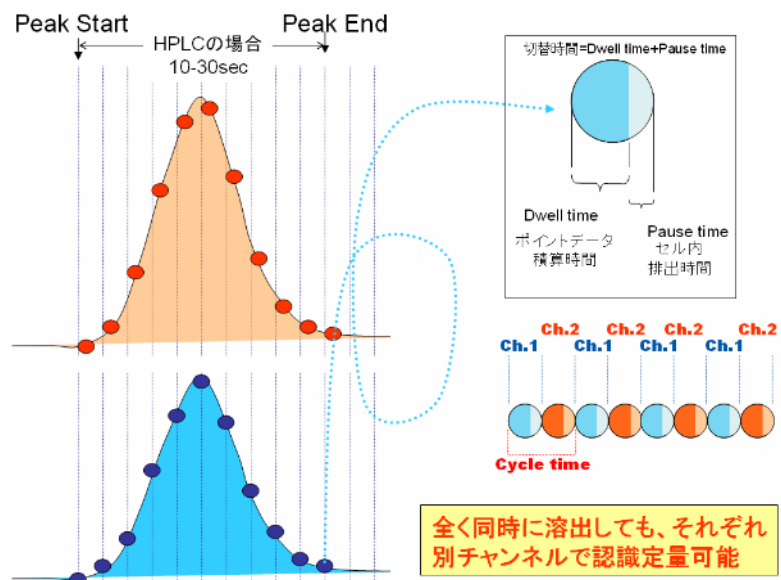
Time に Dwell Time を入力する際、Cycle Time が十分短いことを確認します。

Dwell Time はクロマトグラムにおけるピークの溶出幅とデータポイント数から換算して設定します。

【Cycle Time, Dwell Time, Pause Time】

例えば、定量する化合物(Analyte)の溶出幅が 0.1 min (6 sec)と仮定した場合、データポイント数が 10 ポイント(10 Cycle)のデータを取得するには、1 Cycle Time を 0.6 sec 以下に設定する必要があります。

Cycle Time は Dwell Time と Pause Time (通常 5msec) の合計であることから、Dwell Time は 595 msec と設定することになります。



4.7 測定メソッド(Acquisition Method)の完成

ここでは実際の測定に使用する測定メソッドを作成します。

- ① Home 画面の LC Method アイコンをクリックします。
- ② 上部にある Open をクリックし LC メソッドを選択します。
 - ※ Training では Reserpine_FIA を選択してください。
- ③ 以降の各 LC の入力方法を参考に LC 条件を入力します。
 - ※ Training では以下の条件を使用します。



流速 : 0.2 mL/min、Gradient 条件 : 下図、Injection Volume: 5 μ L

	Time	Flow	A.Conc	B.Conc
1		0.2000	90.0	10.0
2	3.00	0.2000	10.0	90.0
3	3.01	0.2000	90.0	10.0
4	6.00	0.2000	90.0	10.0

【Exion 2.0 の場合】

- ① Binary Gradient タブをクリックし、Flow program を Simple または Program を選択し、グラジエント条件を設定します。

Binary Pump* Autosampler Column Oven

▼ Flow program

Default
 Simple
 Program

Use equilibration:

	Time (min)	Flow (mL/min)	A (%)	B (%)	Event
1	0.00	1,000	90.0	10.0	00000000 ...
2	3.00	1,000	10.0	90.0	00000000 ...
3	3.00	1,000	90.0	10.0	00000000 ...
4	6.00	1,000	90.0	10.0	00000000 ...

▼ General settings

Pressure minimum: 0.0 MPa Position of SSV A: A1
 Pressure maximum: 40.0 MPa Position of SSV B: B1

- ② General settings では使用するカラムの耐圧、溶媒切り替えバルブの設定を行います。

- ③ Autosampler タブをクリックし、Injection volume を入力、Use tray thermostating に☑を入れ、Advanced settings の▶をクリックし下図左のように設定し、Advanced rinse steps よりループ洗浄の設定を行います（下図右）。

Binary Pump* Autosampler* Column Oven

▼ General settings

Use autosampler:
 Injection volume: 5.0 µL
 Rinse mode: Advanced
 Advanced rinse steps: Setup...

Use air gap:
 Use headspace pressure:
 Use tray thermostating:
 Temperature: 8 °C

▼ Rack settings

Rack	Needle offset	Use a specific rack:
2x 48 vial rack	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
2x 96 deep-well plate	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
2x 96 well plate	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
2x 384 well plate	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
108 vial rack	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
2x 12 vial rack	2.0 mm	<input type="checkbox"/>
30 vial rack	2.0 mm	<input type="checkbox"/>

▼ Advanced settings

Syringe speed: Low
 Syringe speed factor: 0.8
 Injection method: µL pickup plus
 Transport segment: 35.0 µL

ExionLC 2.0 - Advanced rinse steps

Rinse steps: 3
 Rinse delay (min): 3.0

Please note that the last step must be Transport if the µL pickup plus injection mode is used.

	Position	Volume (µL)	Valve wash
1	Wash	500	<input type="checkbox"/>
2	Transport	750	<input type="checkbox"/>
3	Transport	1000	<input type="checkbox"/>

OK Cancel

- ④ Column Oven タブではカラムオープンの温度設定を行います。

【ExionLC、島津社製 LC の場合】

- ① Binary Gradient タブをクリックします。
- ② メソッド上部にある Injection Volume に注入量を入力します。
- ③ Stop Time に 6.0 min、Flow (流速)、B Conc.に適切な値を入力します。

Injection Volume μL

← Injection Volume を入力

Binary Gradient Autosampler Column Oven System Controller

AD Pump Binary Gradient

Stop time: min

B. Conc A. Conc

Flow: mL/min

A. Conc: %

B. Conc: %

B. Curve:

Time	Flow	A. Conc	B. Conc	B. Curve	
1	0.2000	90.0	10.0	0	
2	3.00	0.2000	10.0	90.0	0
3	3.01	0.2000	90.0	10.0	0
4	6.00	0.2000	90.0	10.0	0
5					

- Compressibility settings

- Autopurge settings

↑ グラジエント条件を入力

← 初期の LC 条件を入力

【注意】

※ Injection Volume は 50 μL 以上入力しないでください。

- ④ 必要に応じてバルブの設定を行います。

※ Training では右記の通り入力します。

Time (min)	Position
0	A
0.1	B
5.5	A

- ⑤ 上部にある Save ボタンの下矢印をクリックし Save as を選択し、適当なファイル名を入力して保存します。

※ Training では **Reserpine_MRM** と入力します。

【Agilent 社製の場合】

- ① LC Pump : Binary Pump タブをクリックします。
- ② 画面の左側に Pump のパラメータ、右側にタイムテーブルが表示されます。

The screenshot shows the 'Flow' and 'Advanced' sections of the software. The 'Flow' section has a 'Flow [mL/min]' input field set to 0.200. The 'Solvents' section has 'A' set to 90.0% and 'B' checked and set to 10.0%. The 'Pressure Limits' section shows 'Min: 0.000 MPa' and 'Max: 40.000 MPa'. The 'Stoptime' and 'Posttime' sections have radio buttons for 'As Injector/No Limit' and 'Off', and input fields for 1.00 min. The 'Advanced' section shows a 'Timetable (9/69 events)' table.

Time [min]	A [%]	B [%]	Flow [mL/min]	Max. Pressure Limit [MPa]
0.00	90.0	10.0	0.200	40.000
3.00	10.0	90.0	0.200	40.000
3.01	90.0	10.0	0.200	40.000
6.00	90.0	10.0	0.200	40.000

- ③ 流速、移動相組成は、実際に使用する組成、流速を入力してください。
※ Training では流速 0.2 mL/min 、Solvents に B 50 % を入力してください。
- ④ タイムテーブルにグラジエント条件を入力します。
- ⑤ Column Oven : Column Comp.タブをクリックします。
- ⑥ Temperature を 40℃と入力します。
- ⑦ Autosampler : Sampler タブをクリックします。
- ⑧ Injection Volume(注入量)を入力します。

※ Training では 5 μ L とします。

The screenshot shows the 'Injection' section with an 'Injection volume' input field set to 5.00 μ L.

- ⑨ 必要に応じてバルブの設定を行います。
※ Training では右記の通り入力します。

Time (min)	Position
0	A
0.1	B
5.5	A

- ⑩ 上部にある Save ボタンの下矢印をクリックして Save as を選択し、適当なファイル名を入力して保存します。

※ Training では **Reserpine_FIA** と入力します。

※ 参考(バルブの設定)

通常の設定の場合、

6方バルブは

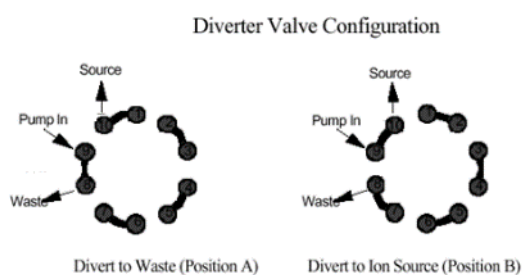
Position A : 6-1, 2-3, 4-5

Position B : 1-2, 3-4, 5-6

がつながっています。

特殊な設定になっている場合もありますので、

どの番号のポートから液が出るかをご確認の上、ご使用ください。



【注意】

- 1) Valve の切り替え時間は、MS の測定開始時間(0min)、終了時間(上のメソッドでは 12min)には設定しないでください。0-12 分の分析の場合、0.5-11.5 分の間で切り替え時間を設定します。
- 2) Valve を使用しない場合は、Integrated Valco Valve 上を右クリックして Use のチェックを外します。

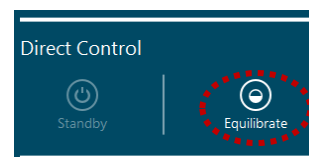
4.8 測定

カラムの接続

- ① カラムを接続します(Training では接続しません)。

システムの平衡化

- ① Status Panel をクリックし、下部の Equilibrate アイコンをクリックします。

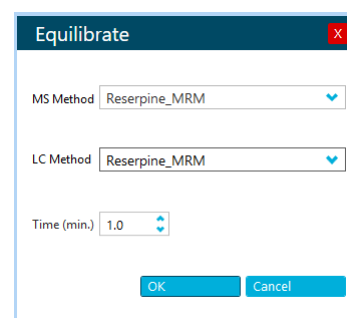


- ② 平衡化に使用する MS Method および LC Method をプルダウンより選択します。

※ Training では下記のように選択します。


MS Method : Reserpine_MRM

LC Method : Reserpine_MRM



- ③ 平衡化する時間を入力し、OK をクリックします。

※ Training では 1 分とします。

- ④ 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 分後に画面右上の Status Panel が  Ready に変わります。

- ⑤ この平衡化で、イオンソースの温度や LC が作動し始めます。

- ⑥ システム全体が温度平衡になるのに 10 分程度かかりますので、その後に測定を開始します。

Batch の作成

以下の方法で測定するサンプルの情報(サンプル名、バイアル番号等)を入力します。
Submit することで Queue に登録します(この操作で測定待ちの状態になります)。

- ① Home 画面の Batch アイコンをクリックします。



- ② Batch 入力画面で測定に使用する情報を入力します。

- ※ 既存の Batch がある場合はそれを編集して使用することもできます。
- ※ Training では下記の通り入力および選択します。
- ※ Plate Type は装置構成に従って変更してください。
- ※ Injection Volume は LC メソッドの値が自動で反映されますが、直接入力で変更することもできます。
- ※ 既存の解析メソッドがあれば Processing Method に入力し、結果ファイル名を Results File に入力しておくことで測定終了後に自動で解析まで完了させることも可能です。

	Sample Name	MS Method	LC Method	Rack Type	Rack Position	Plate Type
1	Reserpine	Reserpine_MRM	Reserpine_MRM	Vial Rack		1.5mL Cooled (70 vial)

Plate Position	Vial Position	Injection Volume (µl)	Data File	Processing Method	Results File
	1		5.0 Reserpine_Training		

- ③ Batch 表は Excel と同様に、コピー&ペーストやドラッグによる連続入力などの編集が可能です。また、行で右クリックをすると行の挿入や削除をすることができます。

- ④ 測定結果は Data File 名ごとに保存されます。Data File 名が同一の場合、複数のデータが一つのファイル(.wiff ファイル)に保存されます。Sample 名が同一でも、上書きされることはありません。

- ※ 保存場所は下記の通りです。

D:\¥SCIEX OS Data¥ 【Project 名】 ¥Data

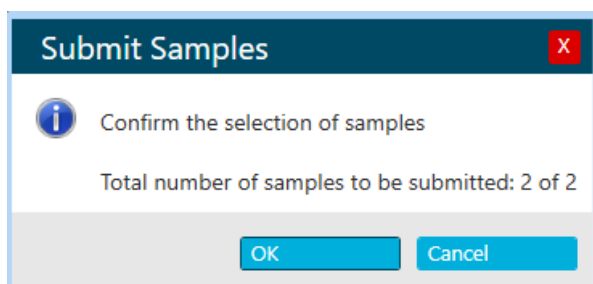
- ⑤ 上部の Save ボタンの下矢印から Save as で名前をつけて Batch を保存します。

- ※ Training では【日付】で保存します。

測定の開始

このまま測定を開始する場合は下記のように進めていきます。

- ① **Batch** のすべてのサンプルを測定する場合はそのまま右上の **Submit** ボタンをクリックします。確認メッセージが出てきますので確認後 **OK** をクリックします。
- ② 一部のサンプルを測定する場合は、その行を選択し **Submit** をクリックします。
- ③ 確認メッセージが出てきますので確認後 **OK** をクリックします。



- ④ Home 画面の **Queue** アイコンをクリックします。
- ⑤ **Submit** した **Batch** が表示されているので、それをダブルクリックすると **Submit** されたサンプルの詳細が表示されます。

Acquisition Status	Sample Name	Est. Start Time	MS Method	LC Method	Injection Volume (µl)	Data File
🕒	201227 - 2 samples					

↓

Acquisition Status	Sample Name	Est. Start Time	MS Method	LC Method	Injection Volume (µl)	Data File
201227 - 2 samples						
	Reserpine	2020/12/25 14:35:09	Reserpine_MRM	Reserpine_MRM	5	Reserpine_Training
	Reserpine	2020/12/25 14:41:14	Reserpine_MRM	Reserpine_MRM	5	Reserpine_Training

- ⑥ 測定中の **Data** を **Explore** で確認することができます。方法については以降の“データの確認”を行うの項を参照ください
- ⑦ 測定を途中で停止する場合は上部の **Stop** ボタンをクリックします。
 - ※ すぐに測定を停止する場合は **Stop now** を選択します。
 - ※ 現在測定中のサンプルが終了した後に停止させる場合は、**Stop after the current tasks are completed** を選択します。
- ⑧ **Queue** の最後のサンプルを測定後、設定時間が経過すると、**LC** は自動で止まり、**MS** は **Standby** の状態に戻ります。

※ 上記の設定時間は Configuration の Queue にある Instrument idle time の時間で適宜変更可能です。

Configuration

Queue Settings

Instrument idle time 60 min

Maximum number of acquired samples allowed 300

- If a sample is missing, then proceed to the next sample
- If calibration fails, then proceed to the next sample
- Save the calibration data to the current project folder instead of the SCIEX OS/TempData folder

Auto-Calibration with CDS

- Purge CDS at the next batch submission or when the Queue is restarted

5 停止操作



① Home 画面から **Configuration** をクリックし画面を開きます。

② **Devices** を選択し上部の **Deactivate** をクリックします。

※ 必要に応じて **LC** のみ **Deactivate**

③ ソフトウェアを閉じます。

④ **HPLC** の電源を切ります。

⑤ 必要に応じて **PC** の電源を切ります。

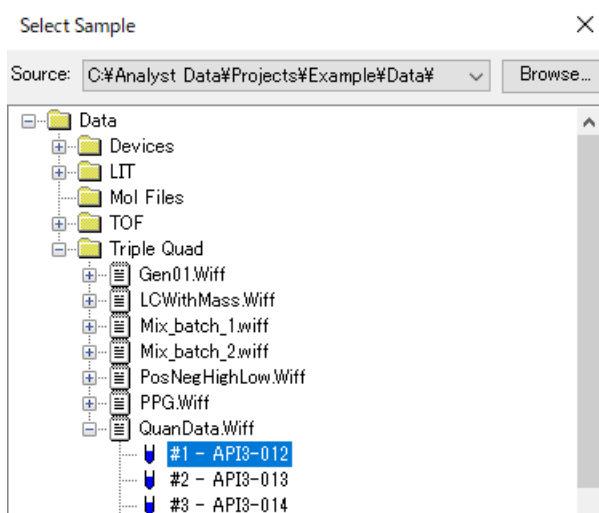
The screenshot shows the Configuration interface. At the top, there is a navigation bar with buttons for 'Deactivate', 'Add', 'Edit', and 'Delete'. The 'Deactivate' button is highlighted with a red dashed circle. Below the navigation bar, the 'Devices' section is visible, listing two devices:

Device Name	Type	Manufacturer	Subdevices	Activation Status
ExionLC	Integrated System	Shimadzu	Binary Gradient - Pump B Autosampler Column Oven System Controller	<input checked="" type="checkbox"/> Activate
SCIEX Triple Quad 4500	Mass Spectrometer	Sciex	Valve Model	<input checked="" type="checkbox"/> Activate

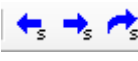



6 データの確認

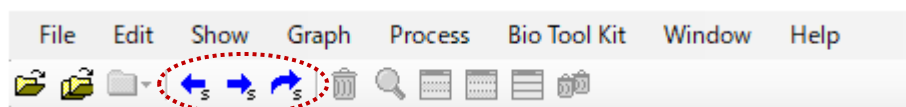
データを開く

- ① Project を、目的の Data の保存されている Project(Training では Example)に変更します。
- ② Home 画面から Explorer をクリックし Explorer を開きます。
- ③ メニューバーの File から、あるいはアイコンの Open Sample を選択します。
- ④ Training では、Triple Quad フォルダ中の QuanData.wiff 中の API3-012 のデータを使用します。
- ⑤ 目的のデータの Wiff ファイル>目的の Sample を選択し、OK をクリックします。
- ⑥ 該当のデータファイルが開きます。



前後のクロマトグラムを表示する

- ① 上記の順序で該当のデータを開きます。
 - ② 前後のクロマトグラムに移る場合は、メニューバーの  アイコンをクリックします。
- ※ 左矢印  : 一つ前のクロマトグラムが表示されます。
 - ※ 右矢印  : 次のクロマトグラムが表示されます。
 - ※ 曲がった矢印  : データを選択する画面が開き、任意のクロマトグラムを表示させることができます。



マスクロマトグラム(XIC)の表示

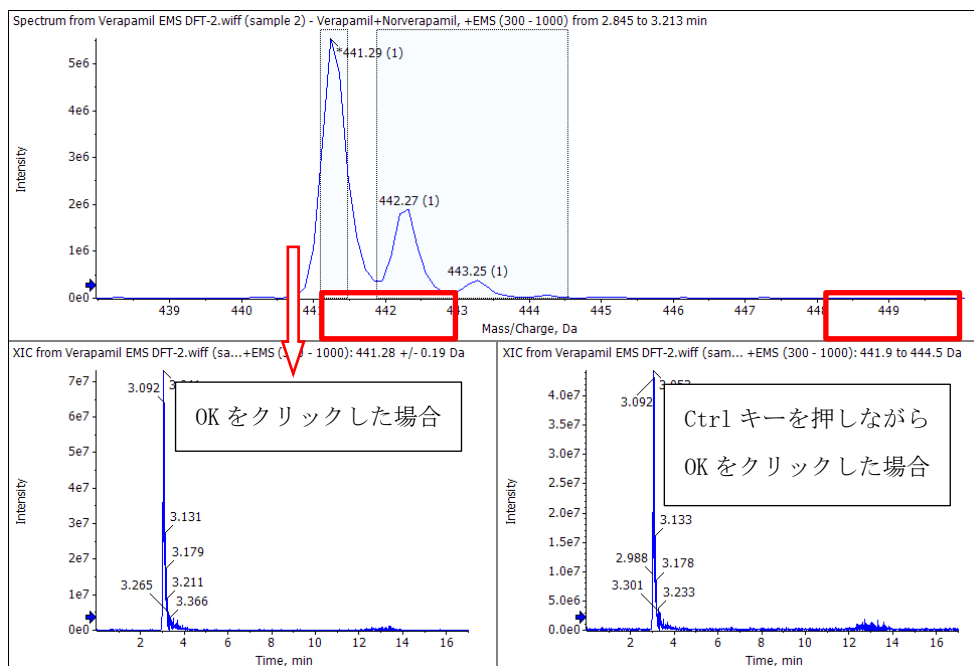
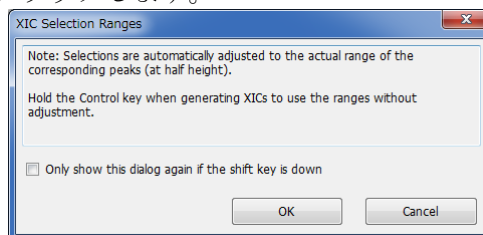
<数値を入力する場合>

- ① メニューバーの Show から Extracted Ion chromatogram(XIC)を選択します。
- ② m/z 、Width、化合物名を入力し OK をクリックします。
- ③ Training では右図のように入力します。
- ④ Center は m/z あるいは組成式(中性)を入力します。
- ⑤ あらかじめ Excel でリストをしておくとコピー&ペーストができます。


Center	Width	Compound
C26H36N2O4	0.5	Norverapamil
C27H38N2O4	0.5	Verapamil

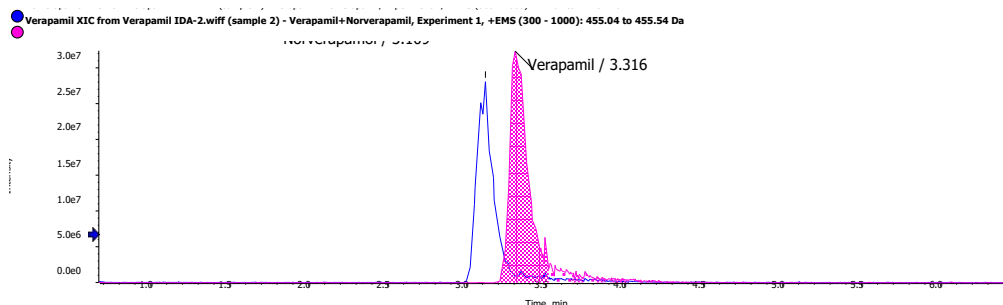
<マススペクトルから表示する場合>

- ① 目的のマススペクトルを拡大します。
 - ② スペクトルを左ドラッグで選択し、ダブルクリックします。
 - ③ 右図のようなメッセージが表示されます。
 - ④ OK をクリックします。
 - ⑤ 選択範囲の中で一番強度の強い MS 値 ± 0.2 Da で抽出した XIC が表示されます。
- ⑥ キーボードの Ctrl キーを押しながら、OK をクリックすると、選択した MS レンジで抽出した XIC が表示されます。

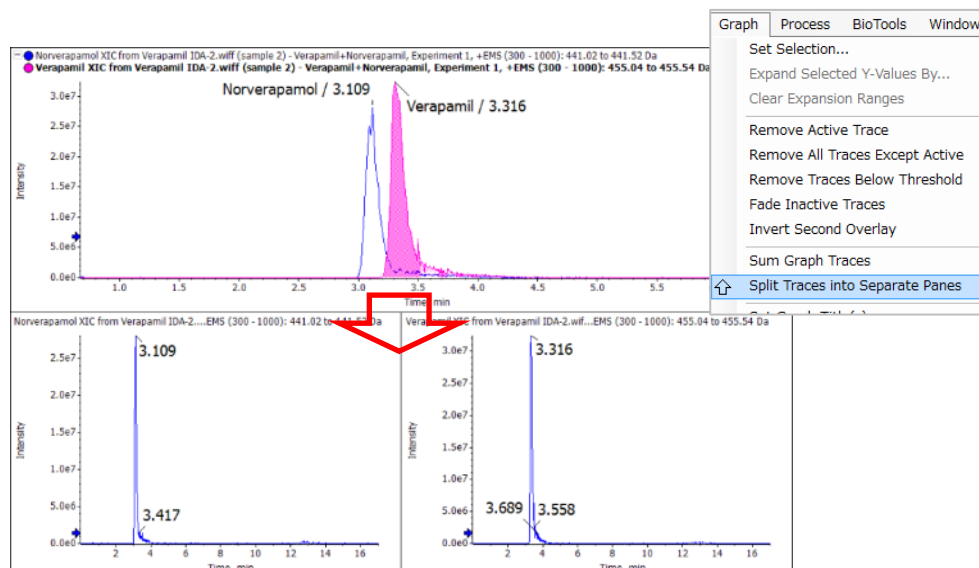


- ⑦ 重ね書きされたクロマトグラムに名前を割り当てたり、ピークを塗りつぶす□は


 アイコンを選びます。

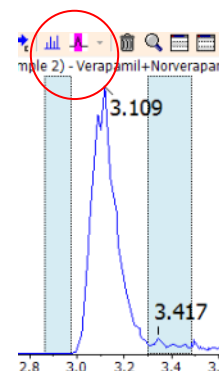


- ⑧ 重ね書きされた Pane を個々の Pane にする場合は、メニューバーの Graph から Split Traces into Separate Panes を選択します。

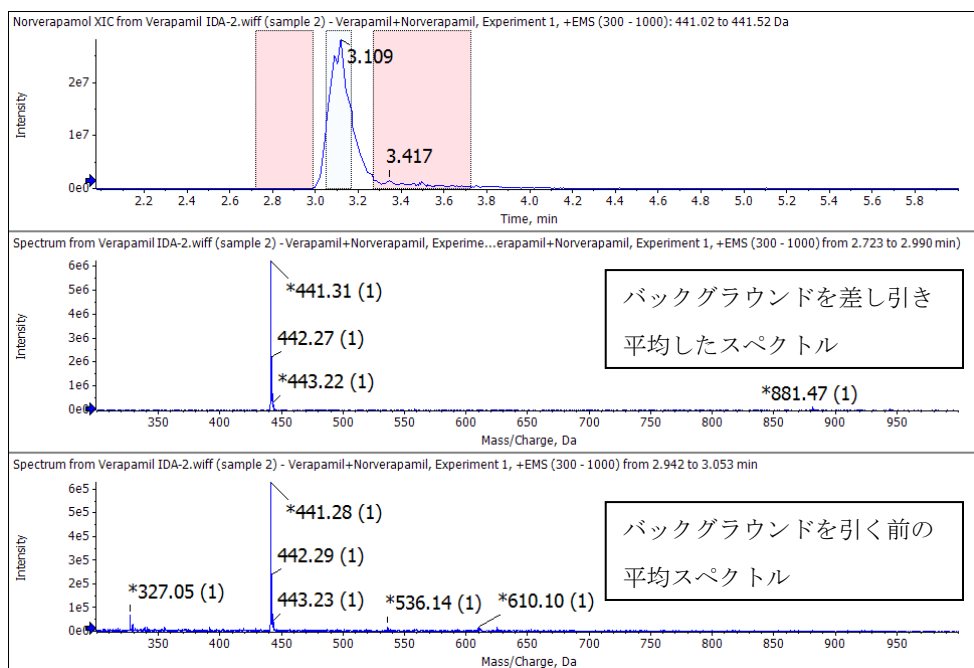



Background の差し引き

- TIC、XIC などのクロマトグラムで、目的付近の横軸をドラッグして拡大します。
- バックグラウンドとなる部分をドラッグして選択した後に、画面上部の  Set Subtraction Range を選択します。
- 2箇所選択する場合はシフトキーを押しながら選択します。
- バックグラウンド領域がピンクで表示されます。
- 解除する場合はアイコン左の下矢印から、Clear Subtract Range を選択します。



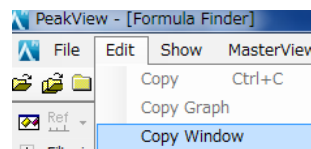
- ⑥ 目的のピーク付近(下図では 3.1 分付近)を再度左ドラッグで選択し、ダブルクリックすることで、バックグラウンドを引いたスペクトルが表示されます。
- ⑦ 選択した部分はマウスのドラッグで移動可能です。
- ⑧ 特定の時間の測定結果を表示させる場合は、目的の時間をダブルクリックします。



- ⑨ 必要に応じて、 アイコンの右の下矢印から、Clear Subtract Range を選択し、バックグラウンドの指定を解除します。
- ⑩ Training ではバックグラウンドの指定を解除します。

画面のコピー

- ① クロマトグラム等をコピーするには、メニューバーの Edit から Copy Graph あるいは Copy Window を選択します。
- ② Copy Graph : メタファイル形式、Copy Window : ビットマップ形式です。
- ③ ペイントやパワーポイント等にペーストします。



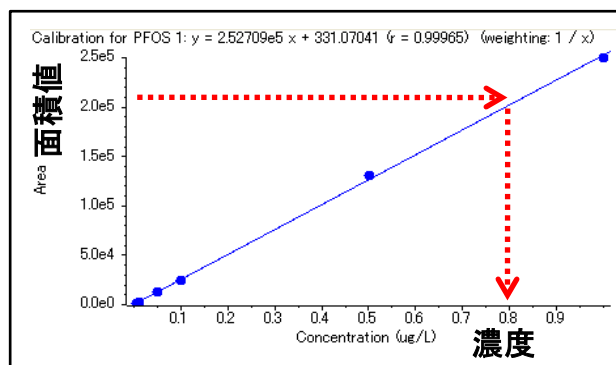
7 SCIEX OS Software を用いた定量解析

本マニュアルでは SCIEX OS Software の Analytics モードを用いて解析を行う方法を示します。Analyst® Software を使用する場合は Analyst® Software 用の Manual を、MultiQuant™ Software を使用する場合は MultiQuant™ Software 用の Manual を参照ください。

- 濃度既知の標準液から作成した検量線をもとに、濃度未知のサンプルの定量を行います。
- 内部標準物質(IS)を使用した場合は、解析時に指定した内部標準物質によって自動補正されます。
- Training では Project: SCIEX OS_Quad Data_Example 内の curve_sulfa の Data を使用し、以下を行います。
 - Sulfadiazine (SDZ), Sulfamerazine (SMZ)の検量線の作成
(内部標準物質 Sulfadimethoxine (SDMX)による補正)
 - 未知試料中の SDZ と SMZ の定量

<参考> 検量線について

検量線(標準濃度曲線)とは、既知の濃度の標準試料と未知の試料とを比較することにより、未知の試料に含まれる物質の濃度を求める手法です。検量線は、検体(測定対象物質)の濃度の変化に応じて検出器がどのように反応するかを示したグラフ(分析シグナル)です。検量線を作成するために、未知の検体の想定濃度を中心とする各種濃度で調整された標準物質を準備する必要があります。



<参考> 内部標準物質について

内部標準物質は、測定時の注入量、MS のイオン化時のサプレッションなどの効果を補正するために使用します。生体試料など、複雑なマトリックス中で定量解析を正確に行う必要がある場合に特に推奨されます。

<SCIEX OS Software Analytics モード定量画面>

定量結果

検量線

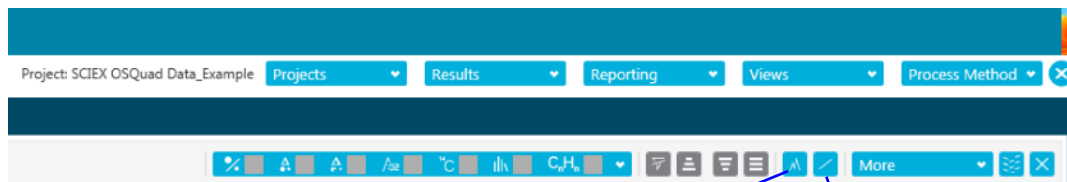
クロマトグラム

化合物リスト
※ 化合物リストをクリックすると、定量結果やクロマトグラムが表示されます。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Compound Type	IS Name	Component Group Name	Actual Concentration	Area	Height	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
4	Blank	Blank	SDZ	Quantifier	SDMX		N/A	N/A	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A
7	1:1	Standard	SDZ	Quantifier	SDMX		1.30	991	12	1.71	<input checked="" type="checkbox"/>	0.13	35.72
7	1	Standard	SDZ	Quantifier	SDMX		1.10	6135	629	1.71	<input checked="" type="checkbox"/>	1.00	100.34
11	1:1	Standard	SDZ	Quantifier	SDMX		10.00	63171	6041	1.71	<input checked="" type="checkbox"/>	9.93	95.52
23	1:10	Standard	SDZ	Quantifier	SDMX		100.00	540132	40914	1.71	<input checked="" type="checkbox"/>	100.00	100.00
28	Sample1	Unknown	SDZ	Quantifier	SDMX		N/A	32384	3097	1.71	<input checked="" type="checkbox"/>		
33	Sample2	Unknown	SDZ	Quantifier	SDMX		N/A	356291	26490	1.67	<input checked="" type="checkbox"/>		

Calibration for SDZ: $y = 0.44751x + 1.32641$ ($r = 1.0001$, $r^2 = 1.0001$) (weighting: 1 / x)

<よく使用するアイコン>



Displays the Peak Review

クリックするとクロマトグラムが表示されます。

Displays the Calibration Curve

クリックすると検量線が表示されます。

7.1 SCIEX OS Software の Analytics の起動

- ① デスクトップ上の SCIEX OS Software アイコン



をダブルクリックし、起動します。

- ② ホーム画面に表示されている Analytics のアイコン



をクリックします。

7.2 Project の選択

画面上部の Projects > 目的の Data の格納されている Project を選択します。

- Training では SCIEX OS_Quad Data_Example を選択してください。



7.3 初期設定の変更

- ① Projects をクリックし、Project Default Settings を選びます。
- ② Quantitative Processing では、図を参考に、定量解析に使用するアルゴリズムや積分条件、検量線の条件等を設定します。
- ③ Qualitative Processing では、下図を参考に定性解析に使用するライブラリーサーチや各種パラメーター等を設定します。

※ 各種設定は状況に応じて変更します。

Project Default Settings

Quantitative Processing ▸

Qualitative Processing

Workspace Layout

Set Project wide defaults for quantitative processing method parameters

Method Defaults

Signal to Noise Algorithm Relative Noise ▾

Integration Defaults

Integration Algorithm MQ4 ▾

▼ Retention Time (RT)

XIC width 0.02 Da

Expected RT 0.000 min

RT Half Window 30.0 sec

Update Expected RT No ▾

Report Largest Peak

▼ Integration

Minimum Peak Width 3 points

Minimum Peak Height 100.00

S/N Integration Threshold 3

Gaussian Smooth Width 1.0 points

Noise Percentage 40.0 %

Baseline Subtract Window 0.10 min

Peak Splitting 2 points

Units & Calibration Defaults

▼ Units & Calibration Defaults

Concentration units

Regression parameter Area ▾

Regression type Linear ▾

Weighting type 1/x ▾

Project Default Settings

Quantitative Processing

Qualitative Processing ▶

Workspace Layout

Set Project wide defaults for qualitative processing method parameters

Library Search

Library Search Algorithm

Results Sorted By

Algorithm Parameters

Precursor Mass Tolerance +/- Da

Collision Energy +/- eV

Retention Time +/- min

Fragment Mass Tolerance +/- Da

Ignore Isotopes In Unknown Maximal Number Of Hits

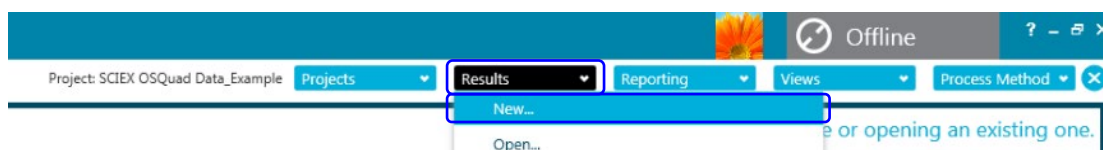
Use Polarity Intensity Threshold

Use Collision Energy Spread Minimal Purity %

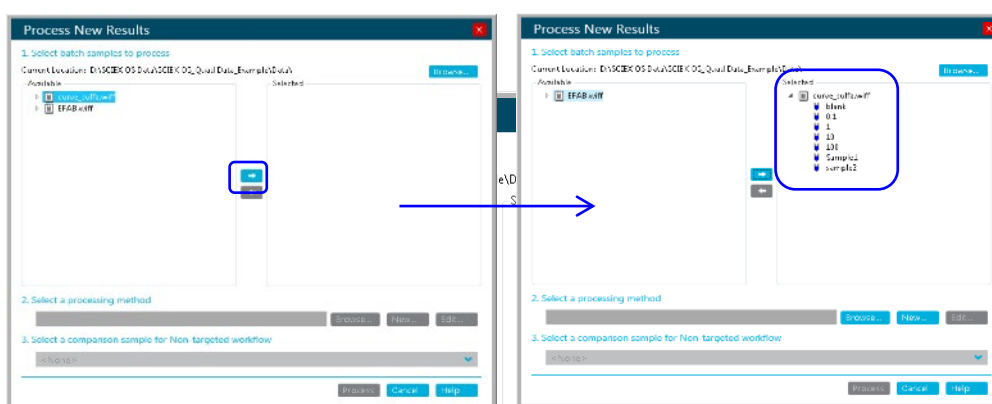
Use Compound Specific Purity Threshold Intensity Factor

7.4 Result Table の作成

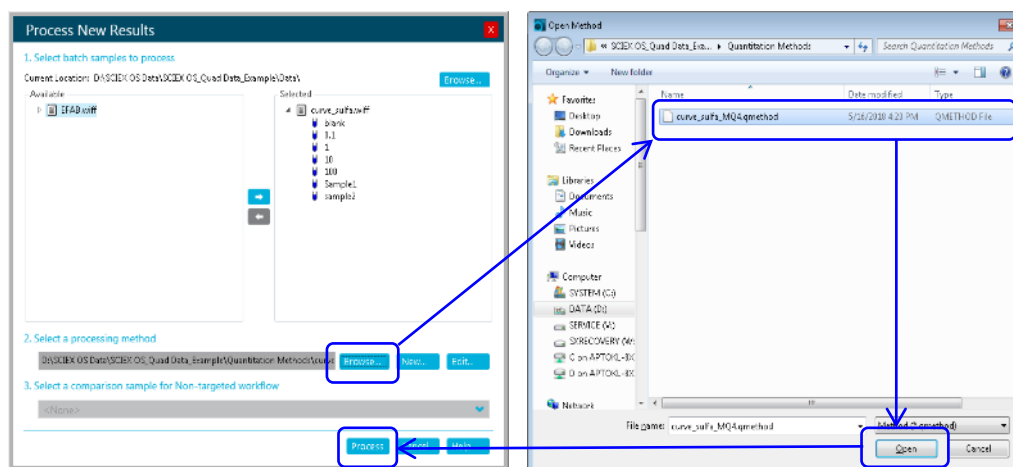
- ① 画面上部の Results > New をクリックします。



- ② Process New Results 画面を開き、1)または2)の方法でデータを選択します。
 - 1) Select batch Samples to process で、Available から解析するデータを選択して右矢印をクリックして Selected に移動します。
 - Training では curve_sulfa.wiff の全 Data を移動してください。



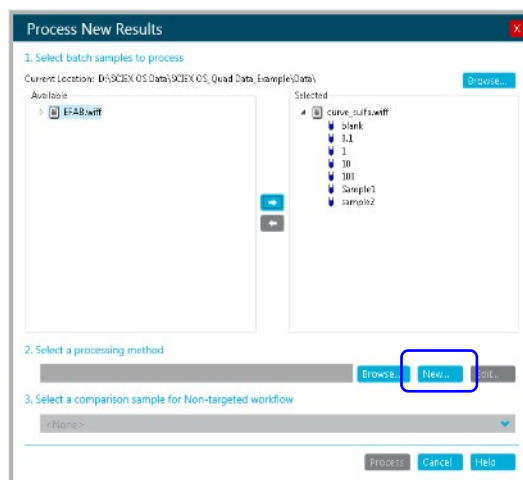
- 2) 開いた Process New Results 画面の上部右にある Browse ボタンをクリックし、目的の Data が格納されている Project を選択します。
- ③ Process New Results 画面の 2. Select a processing method で、以前に作成した Processing Method(定量解析用 Method)がある場合は Browse...をクリック、使用する解析メソッドを選択し、Process をクリックし”7.5 Results Table の確認、編集”に進みます。



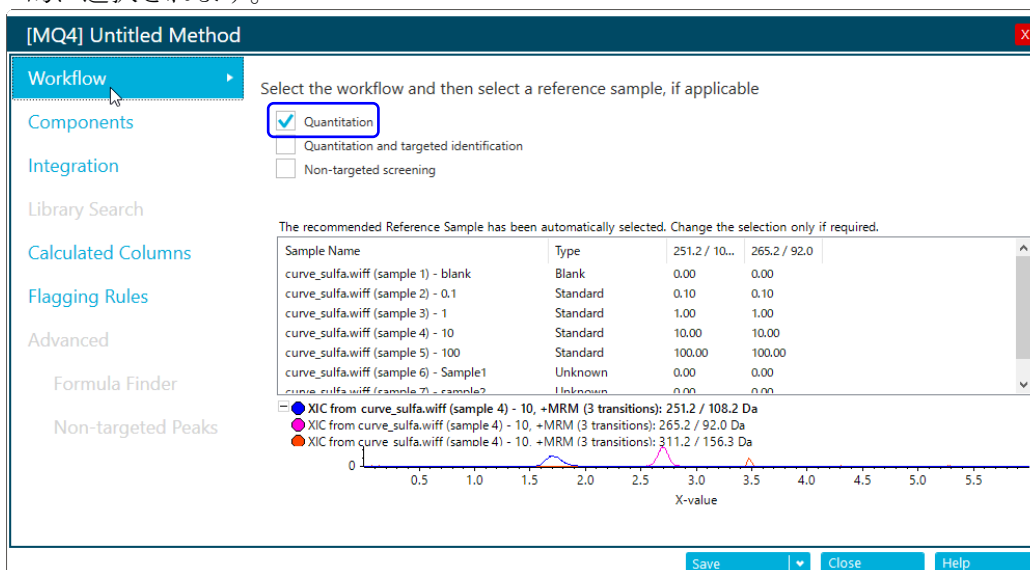
Processing Method が無い場合、次の「新規に定量解析用メソッドを作成し、Results Table を作成する方法」に進みます(Training では新規に作成します)。

新規に定量解析用メソッドを作成し、Results Table を作成する

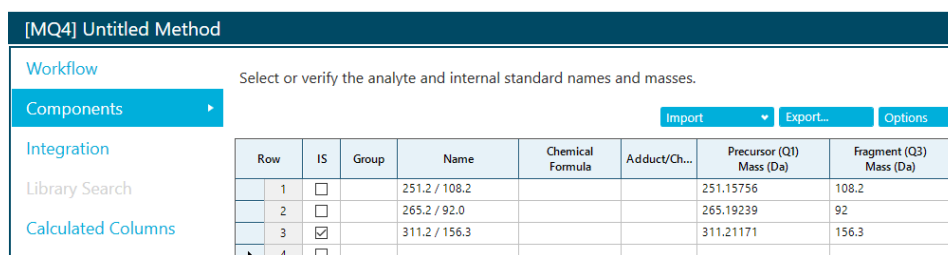
- ① Process New Results 画面の 2. Select a processing method の New をクリックします。
- ② 解析メソッドの編集画面が表示されます。



- ③ Workflow で、Quantitation and targeted identification のチェックを外し、Quantitation にチェックが入っていることを確認します。代表サンプルが自動的に選択されます。



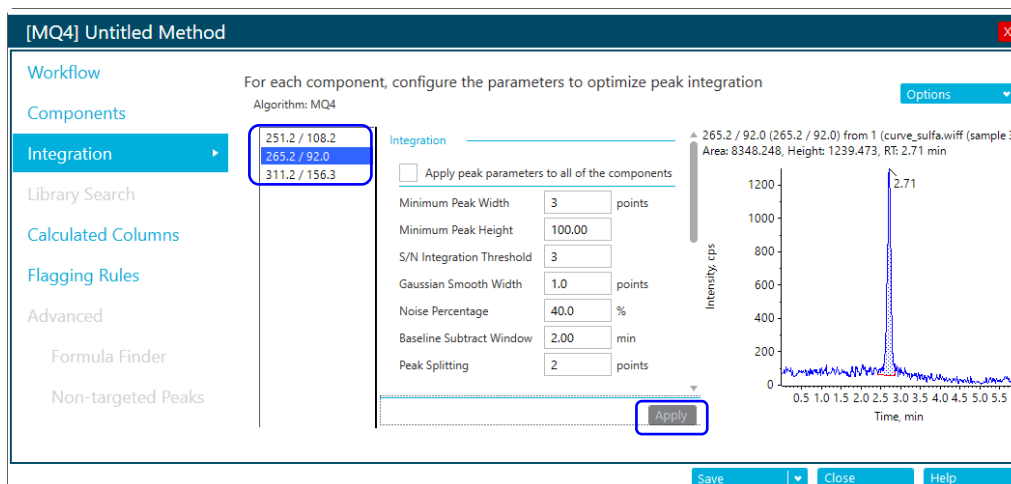
- ④ Components をクリックします。化合物名、内部標準物質(IS)の情報を入力します。
- ⑤ Training Data では、311/156 が IS になります。
- ⑥ IS が無い場合は、入力は不要です。



- ⑦ **Integration** をクリックします。代表サンプルの自動積分された結果が表示されます。

ピークがうまく積分されていない場合は、下記【**スムージングおよび積分パラメータ**】を参考に積分パラメータを変更後、**Apply** をクリックし、クロマトグラムに反映します。

- ⑧ パラメータは **Results Table** 作成後も変更できます。



- ⑨ チャンネル(成分)をクリックし、全成分についても同様に積分パラメータを設定、確認します。

【スムージングおよび積分パラメータ】

- **Gaussian Smooth Width** : スムージングをかける場合、値を入力します。
- **Min. Peak Height** : ここで設定した高さ (Intensity, cps) を超えるピークを積分します。ベースラインよりも高めに設定することで、ノイズや強度の低いピークは積分されなくなります。
- **Noise Percentage** : 値を大きくする程、ベースラインが上がり、ピーク面積値が小さくなります。
- **Baseline Sub. Window** : ベースラインとして設定する最小強度を検索する幅になります。Peak 幅の 2-3 倍程度が Default 値になります。
- **Peak Splitting** : 値を大きくする程、割れたピークを一つのピークとして認識しやすくなります。

- ⑩ **Calculated Columns** をクリックし、必要に応じて設定を行います。
- ⑪ 設定方法は中級定量トレーニングマニュアルをご参照ください。
- ⑫ **Flagging Rules** をクリックし、真度、定量値の許容誤差について設定します。
- ⑬ 基準値から外れた場合、定量結果のセルがピンクにハイライトされます。
- ⑭ 設定しない場合はチェックをはずします。

- ⑮ イオン比の表示は、中級定量トレーニングマニュアルをご参照ください。

[MQ4] Untitled Method

Workflow Define a rule to flag results in the table.

Components Add Rule Delete Rule Import...

Apply Rule	Rule Name	Formulas or Columns Used in the Rule
<input type="checkbox"/>	Ion Ratio Acceptance	Ion Ratio Confidence
<input checked="" type="checkbox"/>	Accuracy Acceptance	Accuracy
<input checked="" type="checkbox"/>	Concentration Acceptance	Calculated Concentration
<input type="checkbox"/>	Integration Acceptance	Quality, Asymmetry Factor, Total Width, Retention Time Error (%)
<input type="checkbox"/>	Qualitative Rules	

- ⑯ Accuracy Acceptance をクリックし、真度の許容誤差を設定します。設定が終わったら、Accept changes and return to Flagging Rules をクリックして戻ります。

[MQ4] Untitled Method

Workflow ← Accept changes and return to Flagging Rules

Components Identify the standards and QCs that are outside of the specifications

Integration Rule name Accuracy Acceptance

Library Search Maximum tolerance for accuracy:

<input checked="" type="checkbox"/>	Standards at Lower Limit of Quantitation (LLOQ)	+/-	20.0	%
<input checked="" type="checkbox"/>	Standards	+/-	15.0	%
<input checked="" type="checkbox"/>	Quality Controls (QC)	+/-	15.0	%

- ⑰ Concentration Acceptance をクリックし、必要に応じて定量値の許容誤差について設定します。Accept changes and return to Flagging Rules をクリックして戻ります。

Apply Rule	Rule Name	Formulas or Columns Use
<input type="checkbox"/>	Ion Ratio Acceptance	Ion Ratio Confidence
<input checked="" type="checkbox"/>	Accuracy Acceptance	Accuracy
<input checked="" type="checkbox"/>	Concentration Acceptance	Calculated Concentration

[MQ4] Untitled Method

Workflow ← Accept changes and return to Flagging Rules

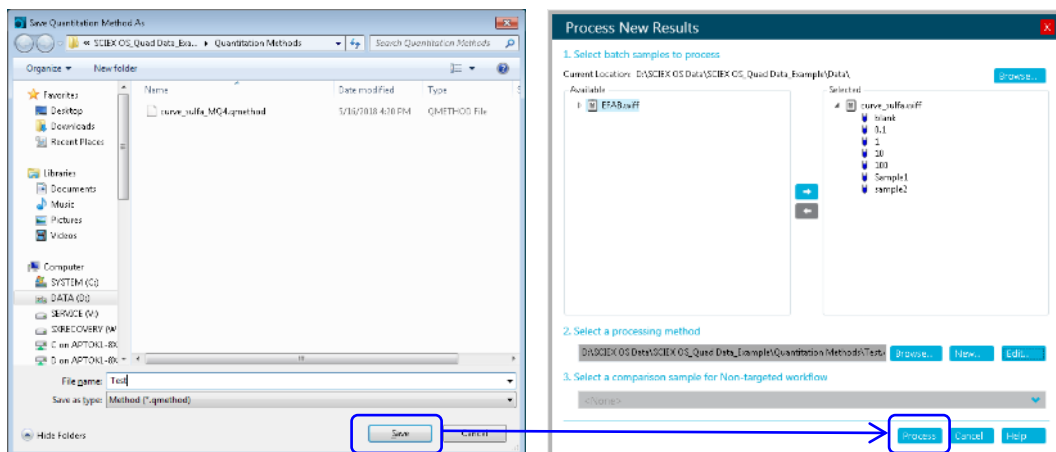
Components Identify the unknown samples that are outside of the concentration range

Integration Rule name Concentration Acceptance

Analyte	Lower Limit	Upper Limit
▶ 251.2 / 108.2		
265.2 / 92.0		

- ⑱ Save をクリックし、File Name に解析 Method 名を入力して Save をクリックします。

- ⑱ Process New Results 画面に戻ります。Process をクリックすることで、解析が開始され、終了後 Result Table(解析結果)が表示されます。



7.5 Results Table の確認、編集

The screenshot shows the 'Results' tab in the software. On the left, the 'Components and Groups' list has '251.2 / 108.2' selected. The main table has 7 rows. Callouts point to: ① 'Results' tab, ② '251.2 / 108.2' in the analyte list, ③ 'Sample' tab, ④ 'Sample Type' dropdown in the table, and ⑤ 'Actual Concentration' column.

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Compound	IS Name	Component	Actual Concentration	Area
1	blank	Blank	251.2 / 108.2	Qua			N/A	44
4	0.1	Standard	251.2 / 108.2	Qua			0.10	366
7	1	Standard	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		1.00	6115
10	10	Standard	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		10.00	64125
13	100	Standard	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		100.00	555144
16	Sample1	Unknown	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		N/A	31872
19	sample2	Unknown	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		N/A	356285

- ① 解析結果を確認後、画面上部の Results > Save as で適当な名前で保存します。
- ② 左の Components and Groups タブのリストから、任意の Analyte(Training では 251/108)を選択します。
- ③ Samples タブでは、任意のサンプルを選択できます。Results Table はサンプルごとに表示されます。

The screenshot shows the 'Samples' tab selected. The 'Components and Groups' list on the left has '10' selected. The main table shows rows 10, 11, and 12. Callouts point to: ③ 'Sample' tab and ④ 'Sample Type' dropdown in the table.

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Compound Type	IS Name	Component Group Name	Actual Concentration	Area
10	10	Standard	251.2 / 108.2	Quantifiers	311.2 / 156.3		10.00	63021
11	10	Standard	265.2 / 92.0	Quantifiers	311.2 / 156.3		10.00	77560
12	10	Standard	311.2 / 156.3	Internal Stan...	N/A		1.00	13245

- ④ Sample Type を確認、編集します。変更する場合はプルダウンメニューから、標準液 : Standard、QC サンプル : Quality Control、ブランク : Blank、サンプル : Unknown を選択してください。
- ⑤ Actual Concentration に標準液の濃度を確認、入力します。
- ⑥ Training では 0.1、1、10、100 と入力してください。
- ⑦ Excel などからのコピー(Ctrl+C)、ペースト(Ctrl+V)可能です。
- ⑧ 全化合物について濃度を確認、入力します。
- ⑨ 全化合物の濃度が同じ場合は入力後、カラム上を右クリックし、Apply Current Analyte's Actual Concentrations to All を選択します(この操作で標準液濃度が全化合物に反映されます)。

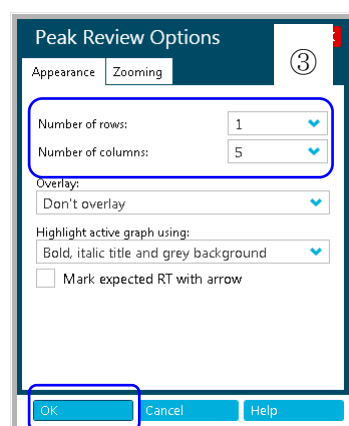
The screenshot shows a context menu with the following options: Copy, Paste, Copy Entire Table, Fill Down, Select All Rows, Apply Current Analyte's Actual Concentrations to All (highlighted), and Apply Current IS's Actual Concentrations to All.

⑩ サンプルの定量値が、Calculated Concentration に表示されます。



7.6 クロマトグラムの表示

- ① Results Table 画面右上の をクリックしてクロマトグラムを表示させます。
- ② クロマトグラム右上の **Options > Show navigation control** を選択すると、 がクロマトグラム上部に表示されます。 をクリックすると、前後のページが表示されます。
- ③ 必要に応じて、表示されているクロマトグラム数(縦、横数)について、変更します。変更する場合は、クロマトグラム右上の **Options > Peak review display settings** を選択します。Peak review Options 画面上部の Number of rows、Number of columns で変更後、OK をクリックしてください。



Apply

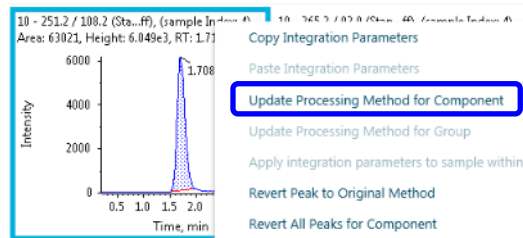


7.7 パラメータの変更

- ① 必要に応じてクロマトグラム左に表示されているパラメータ値を変更し、クロマトグラムのピーク認識方法を変更します。
- ② 各パラメータの詳細については、P.7-8【スムージングおよび積分パラメータ】を参照ください。
- ③ 変更後 **Apply** をクリックすると、選択したサンプルピークに変更したパラメータが反映されます。
- ④ 全サンプルピークにパラメータを反映させる場合は次ページを参照ください。

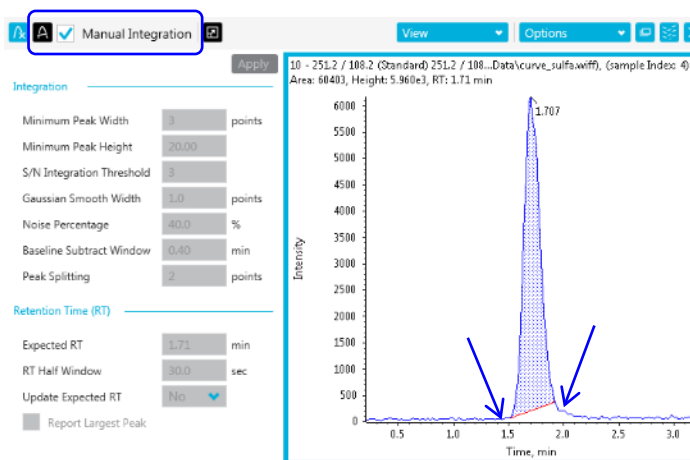
全サンプルピークに変更したパラメータを反映させる

- ① 選択したサンプルに値を反映させた後、クロマトグラム上を右クリックします。
- ② Update Processing Method for Component を選択します。



7.8 手動積分

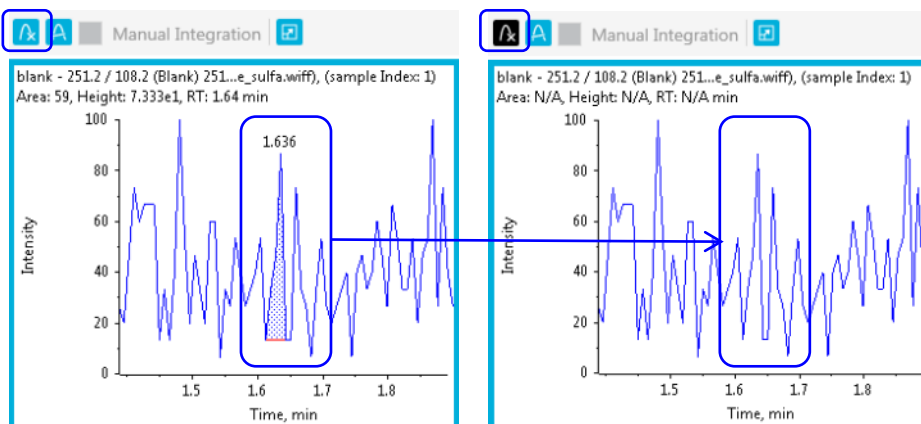
- ① 必要に応じて行います。
- ② クロマトグラム画面上部の **A** をクリックします。
- ③ ピークの左端をクリックします。
- ④ そのままドラックしてピークの右端で離します。




- ⑤ もとのパラメータに戻す場合は **Manual Integration** 右横のチェックを外してください。

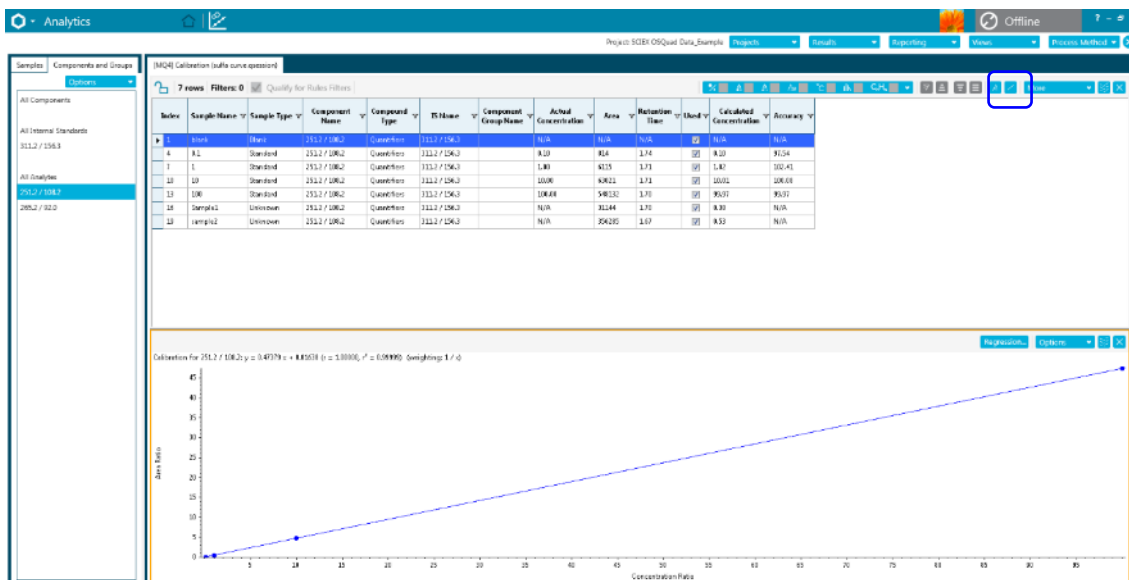
ピークとしての認識を外す

ブランク等、ピークとして認識したくない場合、ピーク不検出アイコンを押すことにより、ピークを不検出にします。

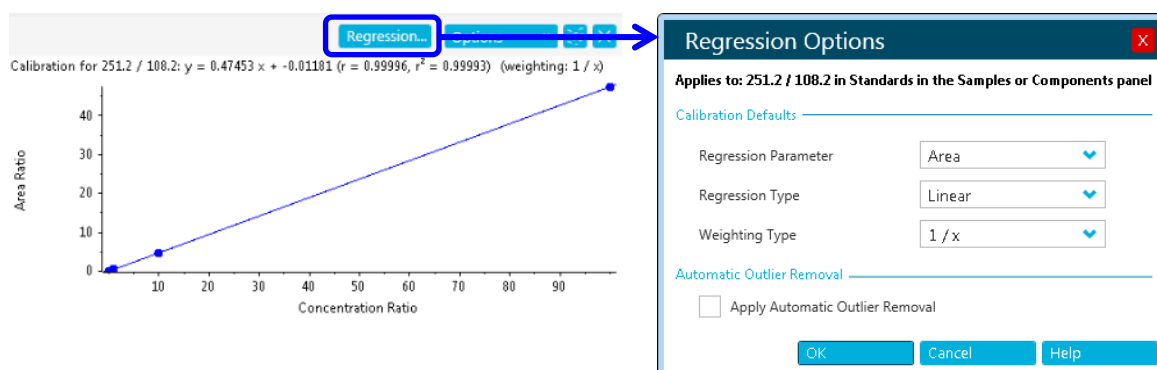


7.9 検量線の表示、重みづけ、検量線の種類を変更

- ① Results Table 画面右上の  をクリックし、検量線を表示します。
- ② 必要に応じて Regression をクリックし、重みづけや検量線の種類を変更します。



- Regression Parameter : Area→Height の変更
- Regression Type : 検量線の種類の変更
- Weighting Type : 重みづけの変更

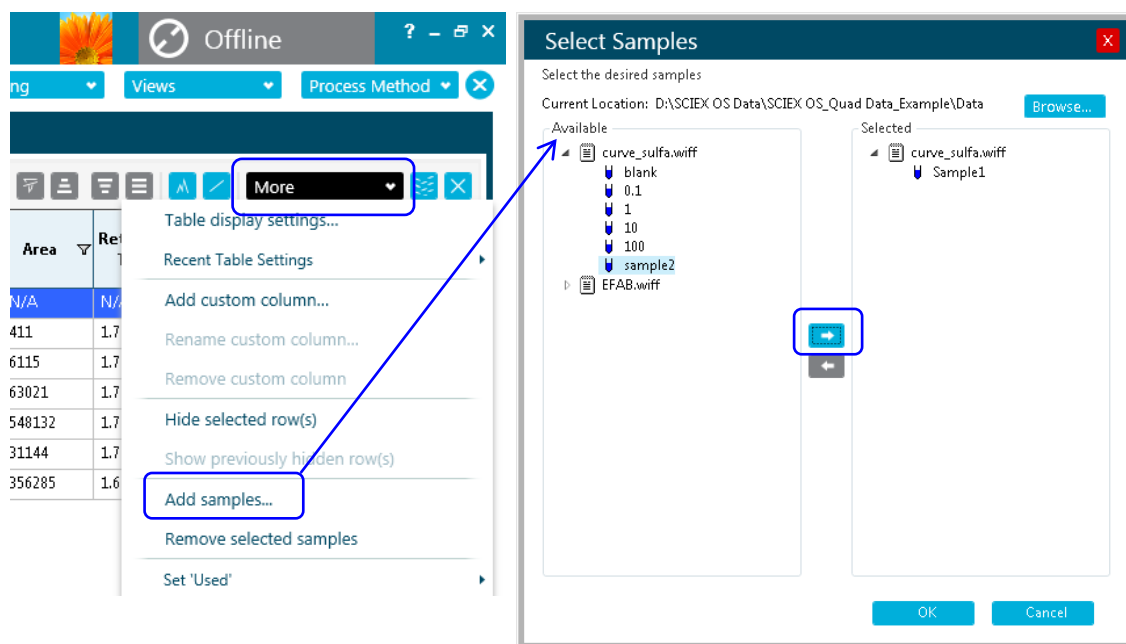


- ③ Training では上記のように変更してください。
- ④ 操作詳細は Help をご参照ください。
- ⑤ 必要に応じて画面上部の Results > Save as で定量結果を保存します。

7.10 データの追加と削除

データの追加

- ① Results Table 画面右上の More > Add Samples を選択し、Available で追加したいサンプルを選択後、→で Selected に移動します。
- ② OK をクリックすることで Results Table に追加されます。

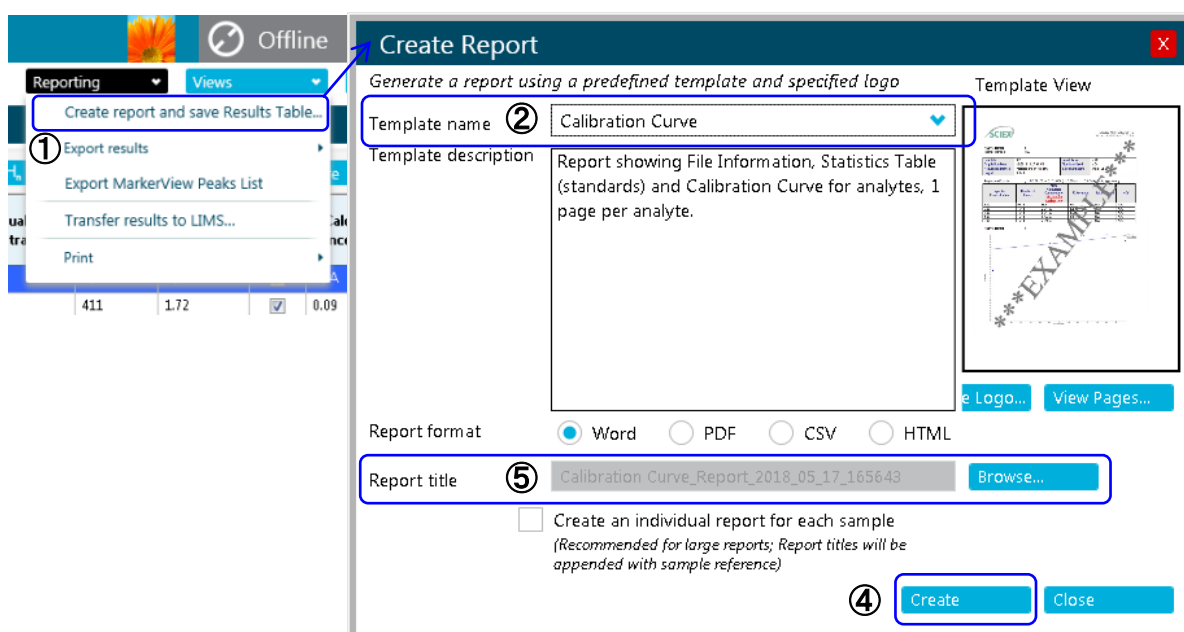


データの削除

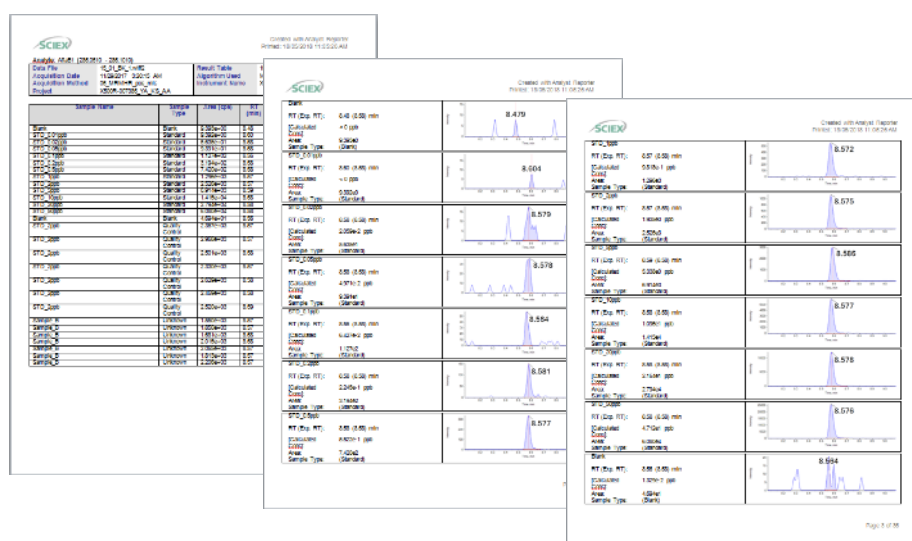
- ① Results Table で削除したい行を選択し、Results Table 画面右上の More > Remove Selected Samples を選択することで削除されます。
- ② 削除後、元に戻すことはできません。必要に応じて削除前に画面上部の Results > Save as で定量結果を保存してください。

7.11 Report の作成

- ① 画面上部の Reporting > Create report and save Results Table を選択します。
- ② Create Report 画面が表示されますので、Template Name のプルダウンで目的に沿ったレポートテンプレートを選択します。
- ③ Default の Template は C:\ProgramData\SCIEX\Analytics\Reporter に保存されています。
- ④ その他、<https://sciex.jp/support-tools/analyst-multiquant-reporttemplate> からダウンロード可能です。
- ⑤ Report title の Browse をクリックしてファイル名の入力と保存先を選択します。
- ⑥ Create をクリックするとレポートが作成されます。



<レポート作成例>



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。

AB Sciex is doing business as SCIEX.

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

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

AB SCIEX™ is being used under license.

詳細な説明や知的所有権等に関しては付属のマニュアルを必ずご確認ください。

© 2023 K.K. AB SCIEX.