

質量分析

QTRAP® シリーズ LC/MS/MS システム

中級定量トレーニングテキスト

SCIEX OS 測定・解析

～QTRAP を使用した測定モード～

MRM-EPI 測定

MS3 測定

株式会社 エービー・サイエックス
アプリケーションサポート



2024年7月

SCIEX OS 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、AB SCIEX 製装置を購入した顧客が、本 AB 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、AB 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	IDA 法による MRM-EPI 測定	3
1.1	EPI (Enhanced Product Ion) モード	5
1.2	IDA (Information Dependent Acquisition)	7
1.3	MRM-EPI Method 作成方法	8
1.4	MRM-EPI データの解析	15
2	ライブラリへの登録および検索	17
2.1	ライブラリの準備	18
2.2	Analytics による解析	20
2.2.1.	解析メソッドの作成	21
2.2.2.	結果の確認	27
2.3	ライブラリへのスペクトルの登録	31
3	MRM3 を用いた定量	33
3.1	MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について	34
3.2	Guided Optimization - MS ³ Infusion を用いた自動最適化	37
3.2.1.	Guided Optimization - MS ³ Infusion のメソッド作成工程	37
3.2.2.	Guided Optimization - MS ³ Infusion (自動最適化プログラム) を Run する 前の準備	38
3.2.3.	Guided Optimization - MS ³ Infusion による自動最適化	41
3.3	マニュアルでの最適化	46
3.4	イオンソースの最適化	50
3.5	MS Method の作成	51
3.6	Explore モードでのデータ確認方法	57
3.7	MS/MS/MS の定量解析	59
参考資料 1	トラップ機能の ER 測定と EPI 測定	65
参考資料 2	スキャンスピード	66
参考資料 3	スキャン範囲	67
参考資料 4	LIT にイオンを溜める方法	68
参考資料 5	DBS (Dynamic Background Subtraction)	69
参考資料 6	Q0 Trapping 機能	70
参考資料 7	MRM-EPI Method 作成方法 (Discrete CE for MS/MS)	71
参考資料 8	MRM-EPI Method 作成方法 (ポジネガ切り替え)	72
参考資料 9	IDA Explorer によるデータ解析	75

1 IDA 法による MRM-EPI 測定

この章で学べること

SCIEX OS software の IDA 機能について解説します。

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

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

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

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

- ※ 偽陽性 - 本当は陰性であるのに検査結果は誤って陽性と出ること
- ※ 偽陰性 - 本当は陽性であるのに検査結果は誤って陰性と出ること。

- 1-1 EPI (Enhanced Product Ion) モード
- 1-2 IDA (Information Dependent Acquisition)
- 1-3 MRM-EPI Method 作成方法
- 1-4 MRM-EPI データの解析

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

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

QTRAP® システムシリーズは、Q3 に四重極と LIT を搭載しています。四重極と LIT は任意の時間で切り替えて使用することができます(MS Method で設定します)。

定量をメインに使用する場合、LIT モードで使用するスキャンは EPI になります。

EPI 以外の LIT スキャンモードの説明や具体的な操作方法に関しては、本トレーニングには含まれておりません。

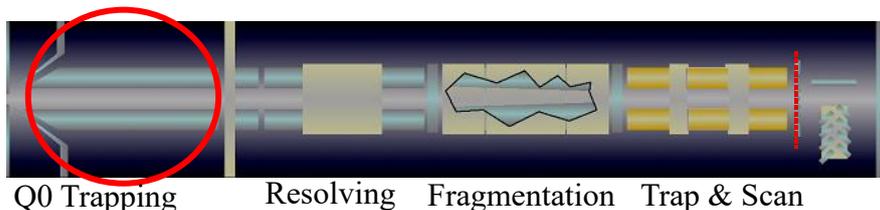
下記の資料をご覧ください、ご不明な点、ご質問などございましたら、アプリケーションサポート宛までご連絡ください。

もしくは定性トレーニングも開催しておりますので、そちらのご参加をご検討ください。詳細はホームページをご覧ください。

※ LIT 各スキャンモードの説明は、QTRAP®システムシリーズ定性用説明資料をご参照ください。

※ 具体的な使用方法は、QTRAP® System シリーズ定性分析用マニュアルをご参照ください。

1.1 EPI (Enhanced Product Ion) モード



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

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

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

① Fixed LIT fill time でイオンを溜める時間を指定する

- * 通常 Q0 Trapping を使用します。

② Dynamic fill time(DFT)をチェックする

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

PI(四重極)スキャンモードと EPI(LIT)スキャンモードの違い

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

PI スキャンモードの場合

※ RF1 < RF2 < RF3

Q3 は四重極モードとして機能します。

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

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

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

EPI スキャンモードの場合

※ RF1x < RF 2x < RF3x

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

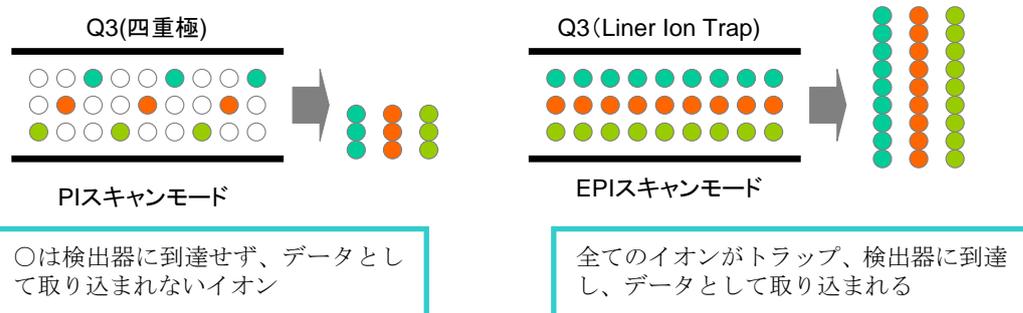
イオン	Q3 の設定電圧
A+ m/z 100 ●	RF1x
B+ m/z 200 ●	RF2x
C+ m/z 300 ●	RF3x

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

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

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

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



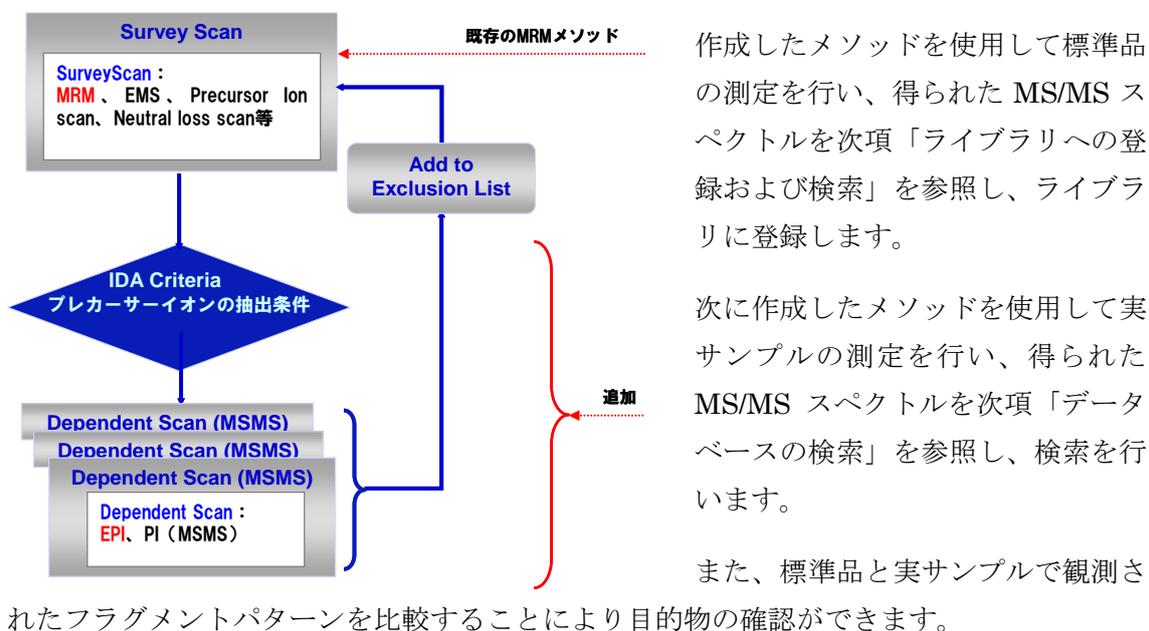
1.2 IDA (Information Dependent Acquisition)

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

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

MRM-EPI のメソッドは、既存の MRM メソッドにプレカーサーイオンの選択条件 (IDA criteria) と EPI を追加することで作成することが出来ます。

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



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

1.3 MRM-EPI Method 作成方法

① 既存の MRM のメソッドを開きます。

Method duration: 15 min Total scan time: 0.630 s Estimated cycles: 1429

Device: SCIEX QTrap 4500 Ion Source: TurbolonSpray

Source and Gas Parameters

Ion source gas 1: 50 psi Curtain gas: 35 psi Source temperature: 350 °C
Ion source gas 2: 60 psi CAD gas: 9

Experiment: MRM

Polarity: Positive Spray voltage: 5500 V

Advanced Experiment Settings

Setting time: 0 ms Pause time: 5 ms Q1 resolution: Unit

Mass Table: Import MRM Mode: MRM

Group ID	Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	SDZ SDZ 1	251.200	156.100	100.000	43.0	10.0	29.0	10.0
2	SDZ SDZ 2	251.200	92.000	100.000	43.0	10.0	39.0	10.0
3	SMZ SMZ 1	265.100	108.100	100.000	46.0	10.0	37.0	10.0
4	SMZ SMZ 2	265.100	92.100	100.000	46.0	10.0	45.0	10.0
5	SDMX SDMX 1	311.200	156.200	100.000	51.0	10.0	31.0	10.0
6	SDMX SDMX 2	311.200	92.100	100.000	51.0	10.0	35.0	10.0

② Experiment の MRM からプルダウンメニューの中から Add IDA Criteria を選択します。

Experiment: MRM

- EPI
- MS³
- IDA
- Add IDA Criteria

③ IDA Criteria と EPI が追加されます。

* MRM が Survey、EPI が Dependent と表示されます。

④ IDA Criteria の設定を行います。(次ページへ続きます)

(1) Maximum candidate ions を 1 とします。

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

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

* 500cps を超えた場合にのみ、EPI を取得できます。

(3) Dynamic Background Subtraction : ベースラインイオンを排除することで、バックグラウンドに埋もれているイオンの MS/MS スペクトルが取得できるようになります。チェックを入れます。詳細は参考資料 5 をご参照ください。

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

- **チェック無し** : 同じ m/z でも何度も EPI 測定を行う。
- **チェック有り** : **For 10(s)**、**After 1 occurrences** : 同じ m/z のプレカーサーイオンについて 1 回 EPI 測定したら、その後 10 秒間は同じ m/z のイオンを選択しない。

* IDA 法による MRM-EPI 測定の推奨

- **チェック無し** : MRM 測定の結果、検出された各化合物のピークの Retention Time(保持時間) が重なっていない場合
- **チェック有り** : **For 10(s)**、**After 1 occurrences** : MRM 測定の結果、検出された各化合物のピークの Retention Time(保持時間)が近接している (または重なる) 場合。時間や回数 の設定は目的物質の溶出時間や IDA Method の Cycle time で判断します。

参考) For は目的物質のピーク幅の半分の値を入力します。例えば、ピーク幅が 20 秒間の場合、推奨値は For 10 (s)、After 1 repeat occurrences です。

(5) Discrete CE for MS/MS: 設定すると最大 3 種類の CE 値で EPI を取得し、3 つのスペクトルが得られます。設定方法は参考資料 7 をご参照ください。ここではチェックを外します。

⑤ 次に Dependent EPI を編集します。Mass Table の Start mass(Da) と Stop mass(Da) に測定したい範囲を入力します。ここでは Start 70、Stop 315 と入力します。

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

8

7

5

8

Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
70.000	315.000	0.0245	60.0	10.0	35.0

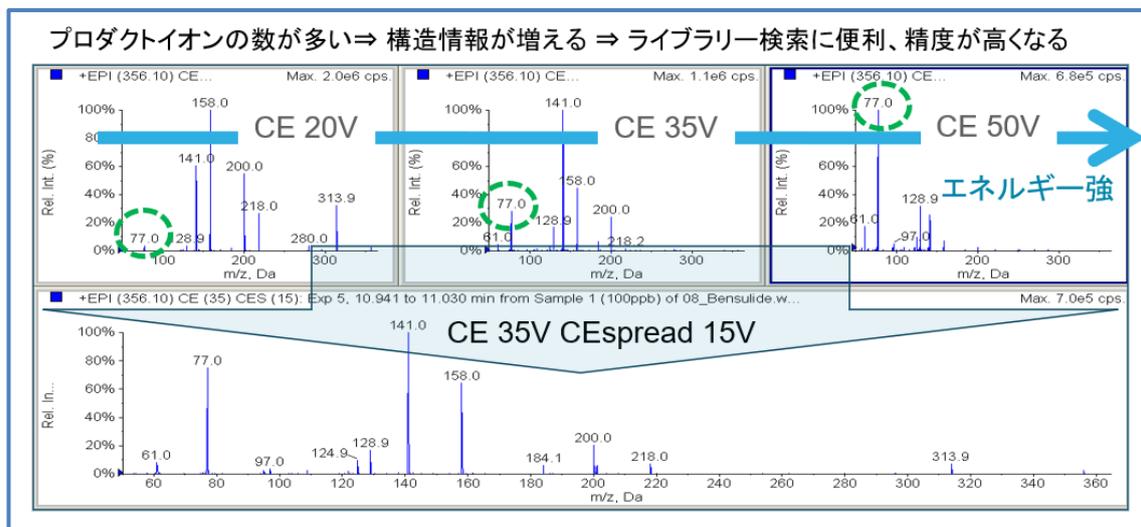
⑥ Scan rate を 10000 Da/s と入力します。

⑦ Advanced Experiment Settings で、Dynamic fill time にチェックを入れます。

⑧ Mass Table の DP を入力します。DP は 60、もしくは適切な値を入力します。CE に 35、CE spread (CES) に 15 を入力します。

* CE spread : CE spread を入力すると Scan time を 3 分割し、3 種類の CE で測定したデータを足し合わせた形でスペクトルが表示されます。例えば、CE に 35 を入力し CE spread に 15 を入力すると、CE を 35±15 (20、35、50) でスペクトルを取得して足し合わせたスペクトルが得られます。

* Discrete CE を設定している場合には CE と CE spread は入力できません。



⑨ Source and Gas Parameters で、CAD gas を 12 と入力します。

▼ Source and Gas Parameters

Ion source gas 1	50	psi	Curtain gas	35	psi	Source temperature	350	°C
Ion source gas 2	60	psi	CAD gas	12				

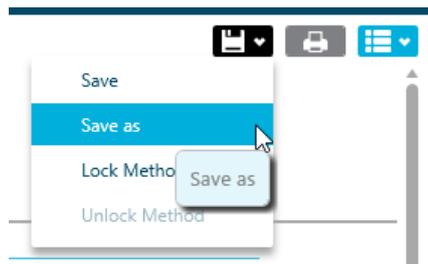
* CAD 以外のパラメータには、FIA で最適化した値、もしくは Default の値を入力してください。

* 農薬などの一斉分析の場合、TEM の Default 値は 350°C を推奨します。

⑩ 画面右上の Save から Save As を選択し、MRM-EPI と名前を付けて Method を保存します。

⑪ LC のラインを MS に接続し、バッチを作成して測定を開始します。

* データの閲覧方法は、この後に記載があります



MRM-EPI 測定結果にて、MS/MS スペクトルが取得できなかった場合

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

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

Dependent EPI の Advanced Experiment Settings で、Fixed fill time に 100(ms)を入力し、Q0 trapping にチェックをいれます。

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

▼ Dependent EPI

Polarity: Positive | Spray voltage: 5500 V | Scan rate: 10000 Da/s
 CE spread: 15 V | Precursor ion: 30 Da

Advanced Experiment Settings

Settling time: 0 ms | Pause time: 1.5 ms
 Dynamic fill time: | **Fixed fill time: 100 ms**
Q0 trapping: | Q3 entry barrier: 2 V | Step size: 0.12 Da | Q1 resolution: Unit

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

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
1	50.000	315.000	0.0265	43.0	10.0	35.0

装置	Fixed fill time
SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS System	250
SCIEX QTRAP® 5500+ LC/MS/MS System SCIEX QTRAP® 6500+ LC/MS/MS System	100

MRM-EPI 多成分一斉分析の推奨設定

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

※いずれの設定も、Cycle time を減らすために行っています。

- 各MRM トランジションの Dwell time(ms)を合計して、約 500msec になるように Dwell time(ms)を設定します。
- QTRAP®4500, QTRAP®5500, QTRAP®6500 では、1成分あたり 2msec 以上でお使いください。
 - * 10成分の場合は、 $500\text{msec}/10 = 50\text{ msec}$
 - * 100成分の場合は、 $500\text{msec}/100 = 5\text{msec}$
 - * 下記の例) 80成分の場合、 $500\text{msec}/80 = 6.5\text{msec} \approx 5\text{msec}$
 - * 40成分を超えるような場合は、Pause time を 5ms から 2ms に変更します。

▼ Survey MRM

Polarity Positive Spray voltage 5500 V

Advanced Experiment Settings

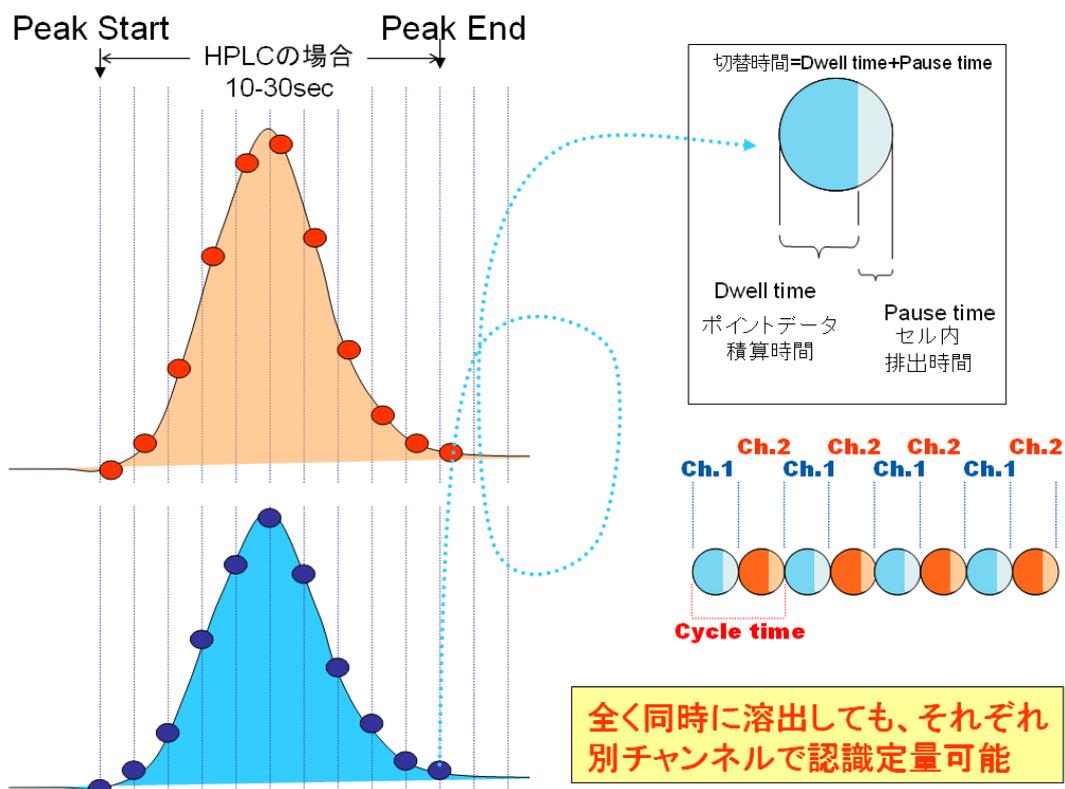
Settling time 0 ms **Pause time 2 ms** Q1 resolution Unit

Q3 resolution Unit

Mass Table Import MRM Mode MRM

	Group ID	Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	SDZ	SDZ 1	251.200	156.100	5.000	43.0	10.0	29.0	10.0
2	SDZ	SDZ 2	251.200	92.000	5.000	43.0	10.0	39.0	10.0
3	SMZ	SMZ 1	265.100	108.100	5.000	46.0	10.0	37.0	10.0
4	SMZ	SMZ 2	265.100	92.100	5.000	46.0	10.0	45.0	10.0
5	SD...	SDMX 1	311.200	156.200	5.000	51.0	10.0	31.0	10.0
6	SD...	SDMX 2	311.200	92.100	5.000	51.0	10.0	35.0	10.0
*									

Cycle time、Pause time、Dwell Time とは



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

1.4 MRM-EPI データの解析

- ① Home 上の Explorer をクリックします。



- ② (Open Sample...)あるいはメニューバーの File > Open Sample...

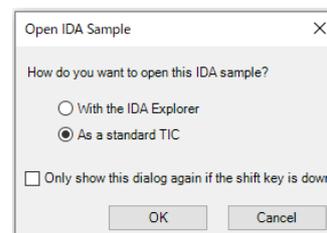
から目的のデータを選択します。該当するデータが表示されない場合は Browse...から該当する Project 中の Data を選択します。



- * トレーニングでは下記のフォルダの IDA のデータ (MRM_EPI_CE3_SCIEXOS.wiff #1-3MIX_10ppb) を使用します。
- * D:\¥SCIEX OS Data¥SCIEX OS_Quad Data_Example¥Data

- ③ IDA Explorer から開く (with the IDA Explorer) もしくは TIC から開く (As a standard TIC) のどちらかを選び、OK をクリックします

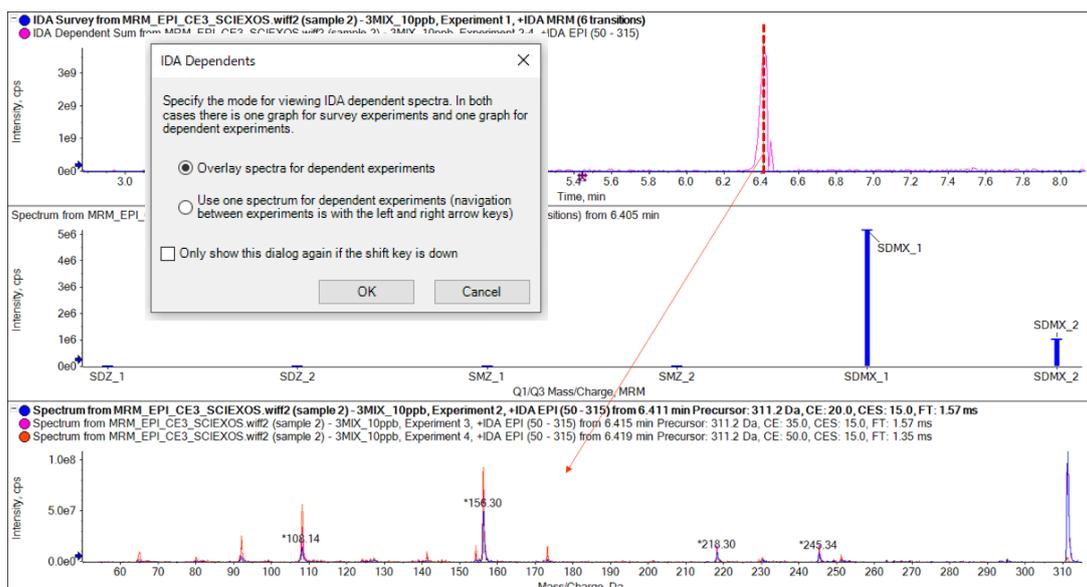
- * トレーニングでは As a standard TIC を選択します。
- * with the IDA Explorer については、巻末の参考資料 8 をご参照ください。



- ④ クロマトグラム上の目的のピークをダブルクリックします。

- * トレーニングでは 6.41 分

- ⑤ Overlay... を選択します。重ね書きされた MS/MS スペクトルが表示されます。



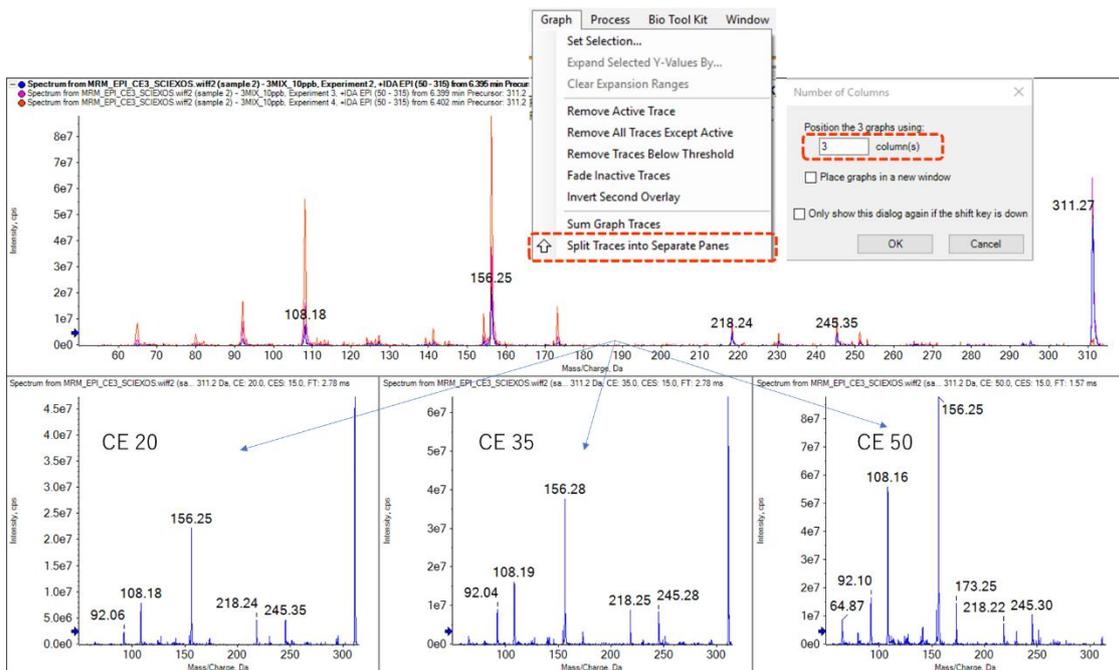
*

- * トレーニングでは MS/MS の Pane を選択後、 (Hide all other panes) をクリックします。

他の Pane が削除され、MS/MS の pane のみが表示されます。

- ⑥ 重ね書きされた MS/MS を分割するには、メニューバーの Graph から Split Trace into Separate Panes を選択、適切なカラム数を入力して OK を押します。

- * トレーニングでは 3 columns



2 ライブラリへの登録および検索

この章で学べること

SCIEX OS の Analytics モードでの、ライブラリ機能について解説します。

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

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

- 2-1 ライブラリーの準備
- 2-2 Analytics による解析
- 2-3 ライブラリへのスペクトルの登録

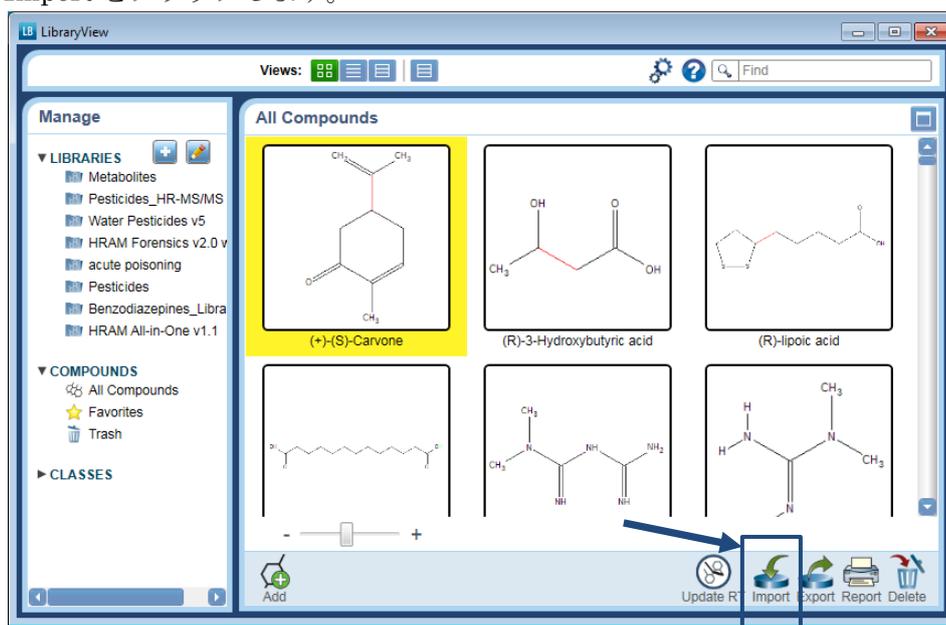
2.1 ライブラリの準備

ライブラリを **Import** する作業です。装置導入時、あるいはライブラリファイルを購入した際に設定します。一度 **Import** すれば、次回からはこの作業が不要になります。

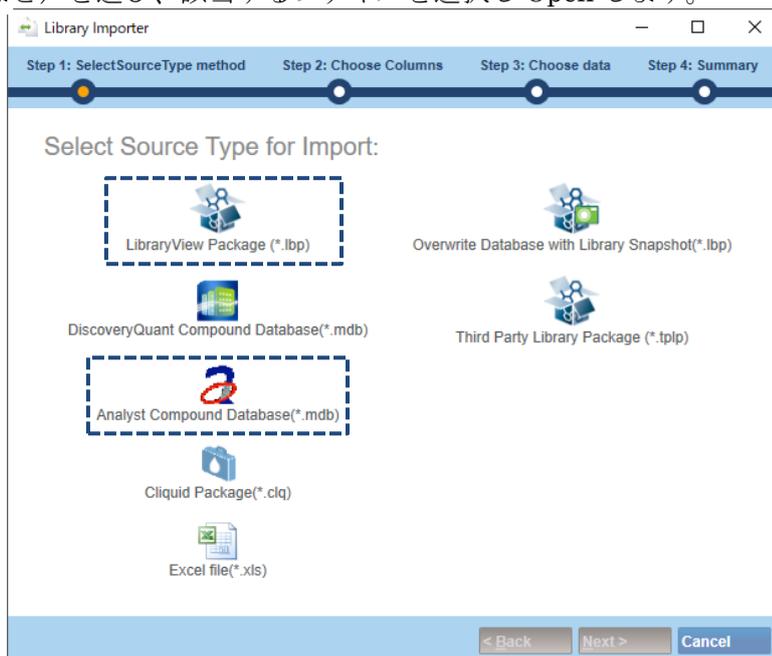
- ① Home 上の **Library**  をクリックします。

LibraryView™ をお持ちの場合は、下記のように **LibraryView** が起動します。

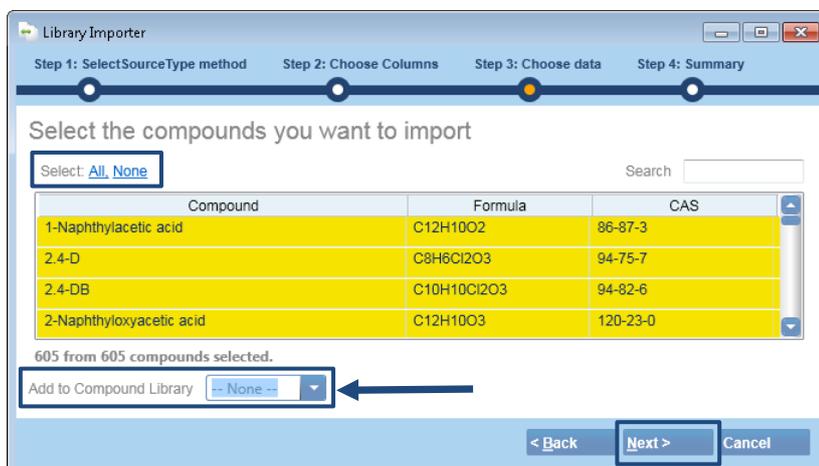
- ② **Import** をクリックします。



- ③ **Library Importer** の画面が開きますので、インポートする形式 (*.lbp、*.mdb など) を選び、該当するファイルを選択し **Open** します。



- ④ All をクリックして全化合物を選択し、Add To Compound Library に適当な名称を入力し、Next をクリックしてインポート操作を行います。

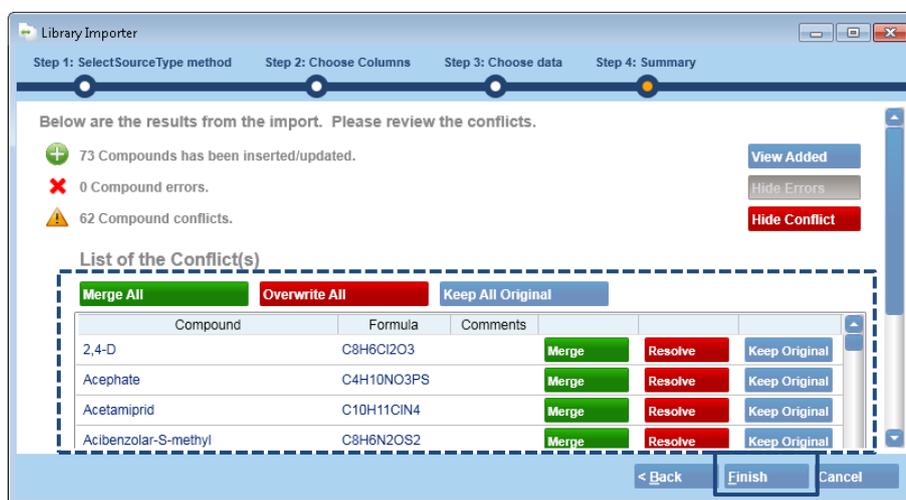


※ 同じ名前の化合物が既に SCIEX OS に登録されていた場合、下図のような画面が出てきます。Merge、Overwrite、Keep のいずれかを選択します。

Merge : 同じ名前の化合物のデータベースに、今回のスペクトルを追加する。
(既に登録されているスペクトルは消去されません。)

Overwrite : 同じ名前の化合物のデータベースに、今回のスペクトルを上書きする。
(既に登録されているスペクトルは上書きされます。)

Keep : 今回のスペクトルは登録しない。



- ⑤ Finish をクリックして終了します。

2.2 Analytics による解析

計算用アルゴリズム等の初期設定を行います。設定を変更しない限り、お使いの Project は次回からもここで設定した内容が有効になります。

- ① Home 上の Analytics をクリックします。
- ② 画面上方の Projects をクリックし、使用する Project を選びます。
※ Training では SCIEX OS_Quad Data_Example を選びます。



Project: SCIEX OSQuad Data_Example

Projects Results Reporting Views Process Method

Project: SCIEX OSQuad Data_Example

Projects Results

- Default
- ✓ SCIEX OSQuad Data_Example
- Project default settings...
- Project secure export settings...
- Enable project modified peak warning

- ③ Projects をクリックし、Project Default Settings を選びます。

- ④ Quantitative Processing では、右図を参考に、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。

※ 各種設定は状況に応じて変更します。各パラメータの詳細は、初級定量トレーニングテキストの「SCIEX OS Software を用いた定量解析」の項を参照してください。

Set Project wide defaults for quantitative processing

Method Defaults

Signal to Noise Algorithm Standard Deviation

Integration Defaults

Integration Algorithm MQ4

Retention Time (RT)

XIC width 0.70 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 0

Gaussian Smooth Width 1.0 points

Noise Percentage 40.0 %

Baseline Subtract Window 2.00 min

Peak Splitting 2 points

Units & Calibration Defaults

- ⑤ Qualitative Processing では、下図を参考に定性解析に使用するライブラリサーチや各種パラメータ等を設定します。

※ 各種設定は状況に応じて変更します。各項目の詳細は、次ページからの「解析メソッドの作成」を参照してください。

Set Project wide defaults for qualitative processing method parameters

Library Search

Library Search Algorithm Smart Confirmation Search

Results Sorted By Purity

Algorithm Parameters

Precursor Mass Tolerance +/- 0.4 Da

Collision Energy +/- 5 eV

Retention Time +/- 0.5 min

Fragment Mass Tolerance +/- 0.4 Da

Ignore Isotopes In Unknown Maximal Number Of Hits 5

Use Polarity Intensity Threshold 0.05

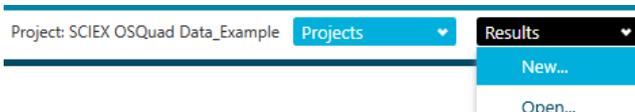
Use Collision Energy Spread Minimal Purity 10.0 %

Use Compound Specific Purity Threshold Intensity Factor 5

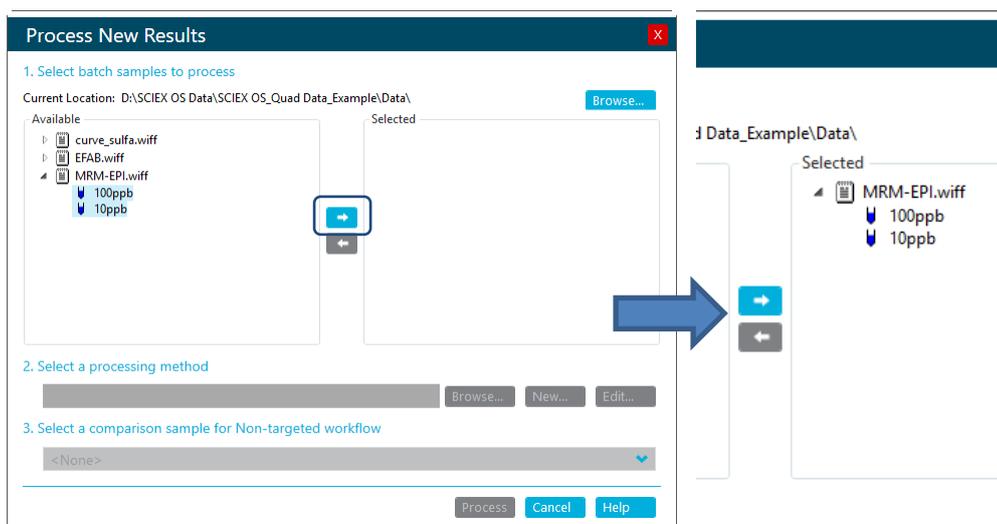
MRM-IDA-EPI データの解析

2.2.1. 解析メソッドの作成

- ① Results をクリックし New を選択します。Process New Results 画面が開きます。



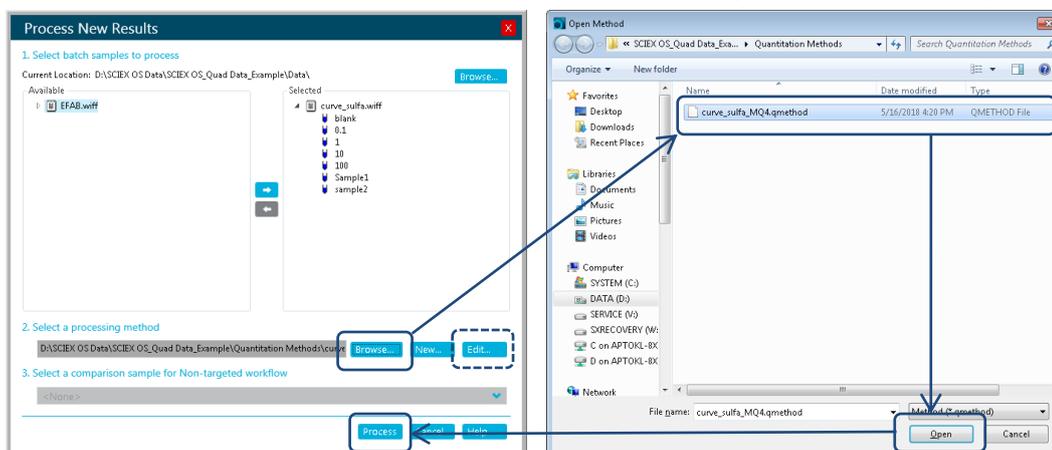
- ② Process New Results 画面で、Available 欄から解析するデータをすべて選択し、 アイコンで画面右側にサンプルを移動します。
※ Training では下図を参考に MRM-EPI.wiff を選びます。



- ③ Process New Results 画面の 2. Select a processing method で、以前に作成した Processing Method (解析 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 2.3.2 結果の確認に進みます。

※ Processing Method が無い場合、次の「新規に解析メソッドを作成する」に進みます。(Training では新規に作成します。)

※ 以前に作成した Processing Method を編集して使用する場合は、Edit... をクリックして、次の「新規に解析メソッドを作成する」と同様に進みます。

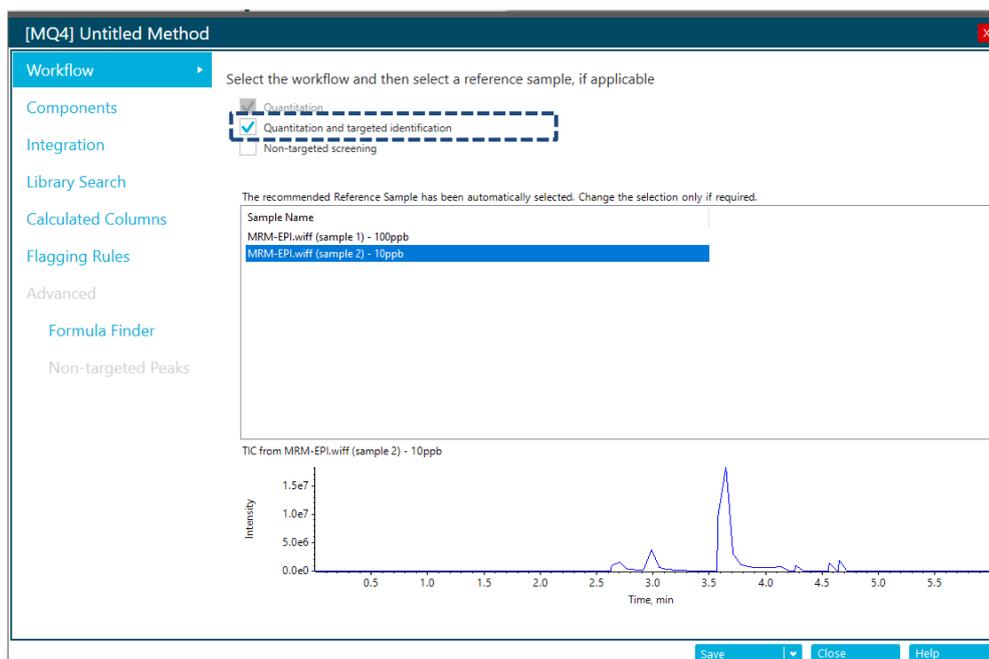


<新規に解析メソッドを作成する>

- ④ 新規で解析メソッドを作成する場合は、2. Select a Processing Method で New をクリックします。



- ⑤ 下図のように、解析メソッド編集画面が表示されます。
- ⑥ **Workflow** の項では、解析するワークフローを選択します。MRM-IDA-EPI のデータをライブラリサーチする場合は、**Quantitation and targeted identification** にチェックを入れます。
 ※ 定量のみの解析の場合は、**Quantitation** にチェックを入れます。
- ⑦ 下図を参考に、ピーク認識を行うための代表サンプルを選択します。



- ⑧ **Components** の項では、MRM-IDA-EPI のデータの場合は、MRM のトランジションが自動で表示されます。Name や Group などの編集が可能です。

Row	IS	Group	Name	Precursor (Q1) Mass (Da)	Fragment (Q3) Mass (Da)	XIC Width (Da)	Retention Time Mode
▶ 1	<input type="checkbox"/>		251.2 / 156.1	251.21231	156.10001	0.7	RT value
2	<input type="checkbox"/>		265.3 / 92.0	265.26443	92	0.7	RT value
3	<input type="checkbox"/>		311.2 / 156.1	311.21938	156.10001	0.7	RT value

※ Excel からコピー&ペーストも可能です。

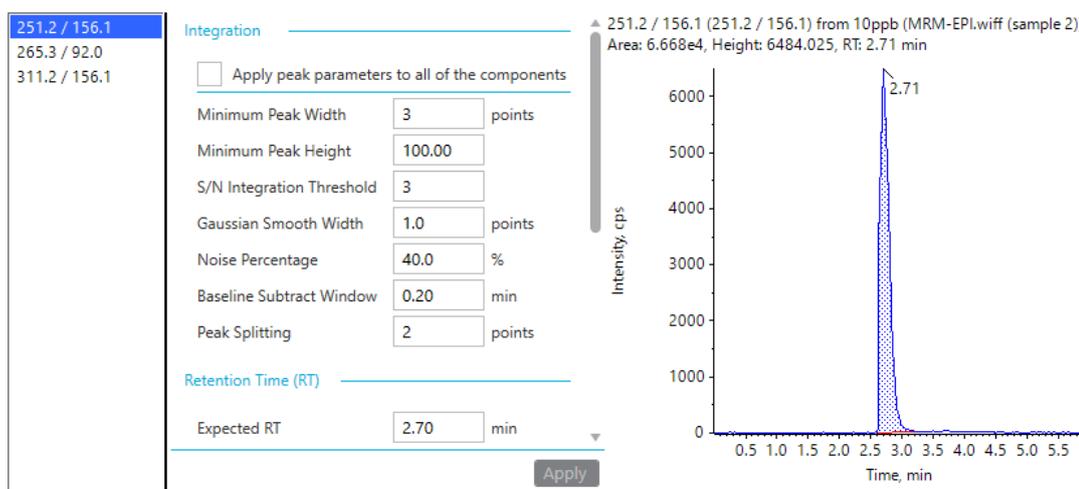
- ⑨ MRM-IDA-EPI のデータを用いて定量する場合は、**Integration** の項で、各成分の積分の確認および変更を行います。パラメータを変更した場合は **Apply** をクリックするとピークが変更されます。

※ **Training** では設定しません。

目的のピークが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。目的のピークが選択されたことを確認してください。

複数化合物がある場合はすべてのピークが積分されているか確認します。

各パラメータの詳細は、初級定量トレーニングテキストの「**SCIEX OS Software** を用いた定量解析」の項を参照してください。



- ⑩ **Library Search** の項では、**Perform Library Search** にチェックを入れ、次ページの図を参考に使用するライブラリや各種パラメータを設定します。

※ **Training** では、次ページの図のように設定します。

※ ライブラリが複数ある場合や、**Precursor Mass Tolerance** や **Collision Energy** など検索条件に制限つける場合など状況に応じて設定します。

Configure the library search parameters

Perform Library Search

検索アルゴリズム
並び替え条件

Library Search Algorithm: Smart Confirmation Search

Results Sorted By: Purity

Library Spectra Type: All Spectra

Libraries To Search

Search All Libraries

SCIEX_OS_Q_Library

Meta Library v1

Metabolite_HR-MS/MS_1.0

Search All Libraries
あるいは、使用する
ライブラリにチェック

検索条件

Algorithm Parameters

Precursor Mass Tolerance +/- 0.4 Da

Collision Energy +/- 5 eV

Retention Time +/- 0.5 min

Fragment Mass Tolerance +/- 0.4 Da

トレランス
* 使用するデータ、
ライブラリに応じて設
定してください。

Ignore Isotopes In Unknown

Use Polarity

Use Collision Energy Spread

Use Compound Specific Purity Threshold

Maximal Number Of Hits: 5

Intensity Threshold: 0.05

Minimal Purity: 10.0

Intensity Factor: 5

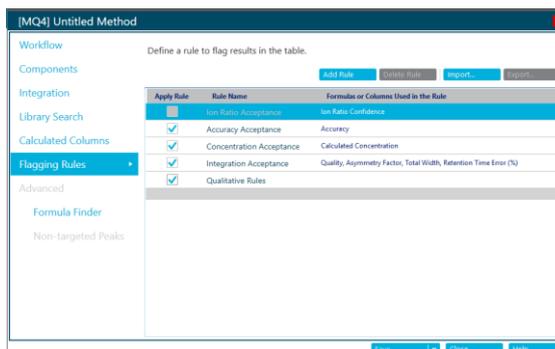
詳細設定
* 変更される
場合は、Help を
参照ください。

詳細は下表を参照
ください。

【検索アルゴリズムと並び替え条件について】

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

- ⑪ MRM-IDA-EPI のデータを用いて定量する場合は、Flagging Rules の項で Accuracy Acceptance、Concentration Acceptance 及び Integration Acc Acceptance から、真度からの外れ値や実サンプル想定濃度の上限・下限値を外れた結果についてハイライトすることができます。必要に応じて設定します。



※ Training では設定しません。

- ⑫ Qualitative Rules の項では、保持時間、ライブラリ同定における信頼度の設定を行います。

※ Training では、下図のように設定します。

※ Mass Error、Fragment Mass Error、% Difference Isotope Ratio、Formula Finder Score は設定しません (TripleQuad™ /Q TRAP®データは未対応なため)。

※ 各項目の値は適宜変更します。Combined Score Weight は合計 100 になるように各項目に値を入力します。

← Accept changes and return to Flagging Rules

Configure the confidence levels for the qualitative rules, as applicable

Rule name: Qualitative Rules

Apply	Qualitative Rule	Acceptable Difference	Marginal Difference	Unacceptable Difference	Combined Score Weight (%)	
<input type="checkbox"/>	Mass Error (ppm)	< 5	< 10	>= 10	20	
<input type="checkbox"/>	Fragment Mass Error (ppm)	< 5	< 10	>= 10	0	
<input checked="" type="checkbox"/>	Error in Retention Time	< 5	< 15	>= 15	50	<input checked="" type="radio"/> Error %
<input type="checkbox"/>	% Difference Isotope Ratio	< 5	< 20	>= 20	20	<input type="radio"/> Absolute
<input checked="" type="checkbox"/>	Library Hit Score	> 60	> 30	<= 30	50	
<input type="checkbox"/>	Formula Finder Score	> 50	> 20	<= 20	20	

- ⑬ MRM-IDA-EPI のデータを用いて定量する場合は、Ion Ratio の項で、Components で2つ以上の Analyte を 1 グループとして設定した場合の強度比の信頼度を設定できます。必要に応じて設定します。

Configure the confidence levels for the ion ratios, as applicable

Ion Ratios

Constant Tolerance
 Variable Tolerance

Qualitative Rule	Acceptable % Difference	Marginal % Difference	Unacceptable % Difference
Constant Tolerance	< 20	< 40	>= 40

※ Constant… : 日本、US 向き、Variable… : EU 向き

※ Training では設定しません。

⑭ **Formula Finder** の項は、設定しません (TripleQuad™ /Q TRAP®データは未対応のため)。

⑮ 最後に解析メソッド編集画面の右下の **Save** をクリックし、**Save As** で名称を付けて保存します。

※ Training では、MRM_EPI と名前を付けて保存します。



⑯ **Process New Results** 画面に戻りますので、右下の **Process** をクリックし解析を実行します。

2.2.2. 結果の確認

- ① 解析が終わると、作成された Results Table が表示されます。

Sample ごとに表示

ライブラリサーチの結果

解析結果
Results Table

- ② 表示するコラムや桁数を変更したい場合は、More をクリックし Table display settings... を選び設定を行います。

- ③ Results Table Display Setting 画面が開きます。Visible のチェックボックスではコラムの表示／非表示が選択でき、Number Format では入力した通りに有効数字や対数表示が切り替わります。

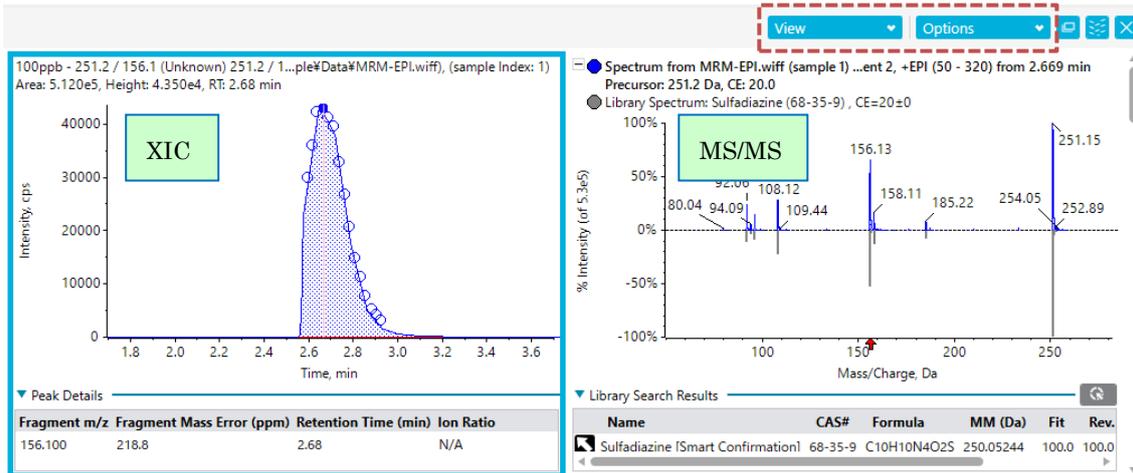
※ Save as project... にチェックを入れるとデフォルトとして保存されます。次回、新規で Results Table を作成すると、保存された項目が表示されます。

※ Export... では設定をファイルとして保存、Import... では保存したファイルを読み込むことができます。

※ Training では、Import... から D:\¥SCIEX OS Data¥SCIEX OS_Quad Data_Example 中の MRM_IDA_EPI_ColumnSettings.cset を選びます。

- ④ Results Table 右上の  (Display the Peak Review) アイコンをクリックし、クロマトグラムとスペクトルを表示させます。

※ Results Table とクロマトグラムはリンクしており、別の Component を選択すると表示が変わります。



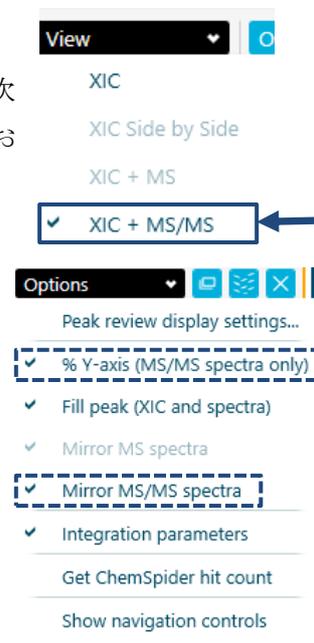
- ⑤ Peak Review 画面右上の View をクリックして XIC+MS/MS を選びます。選択した Component の XIC および、MS/MS (青色：実測、灰色：ライブラリ) が表示されます。

※ Unknown サンプルにおいて、Library Confidence (次ページで説明) が陽性となった結果については XIC および、MS/MS をしっかりと確認します。

- ⑥ Peak Review 画面右上の Options では、表示するクロマトのカラム数や縦軸の%表示、MS/MS のミラー/重ね書き、成分パラメーターの表示非表示などが設定できます。

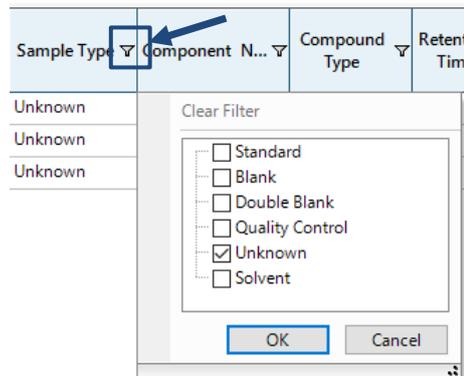
※ Training では、% Y-axis (MS/MS spectra only) と Mirror MS/MS spectra にチェックを入れます。MS/MS スペクトルが確認しやすくなります。

※ 各 Pane 右上の  は、順に、別ウィンド表示、移動、消す、です。

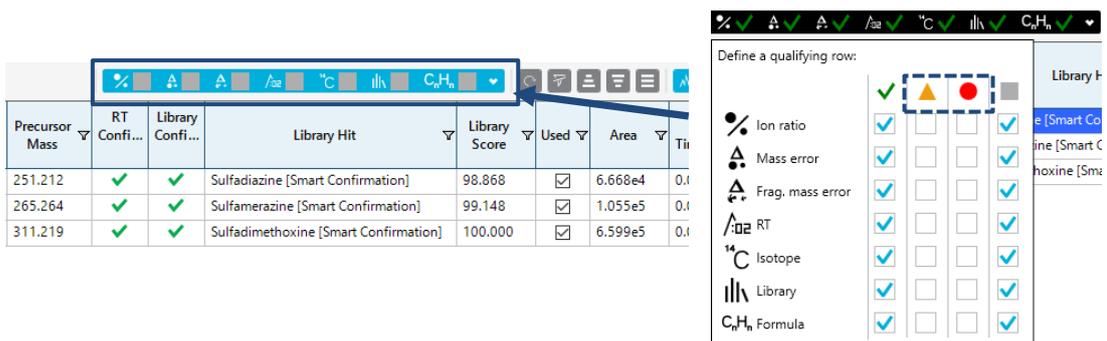


陽性の確認

- ⑦ Results Table の Sample Type のアイコンをクリックすると右図のような画面が表示されます。Unknown にチェックを入れます。



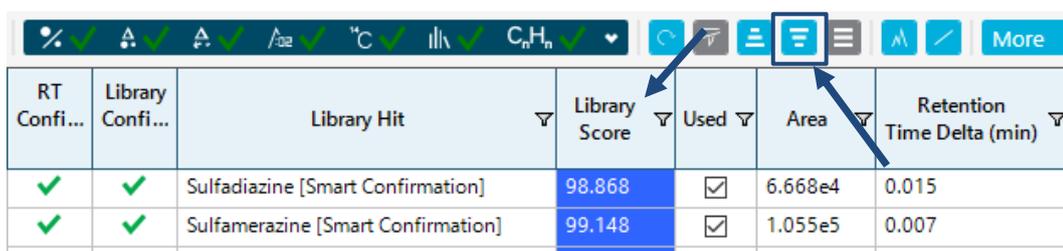
- ⑧ Results Table の RT Confidence および Library Confidence カラムについて、陽性の結果のみ表示し、陰性あるいは不確かな項目を非表示にするには、Results Table 上方の (Define a qualifying row)                  をクリックし、各項目のチェックを外すか、まとめては外す場合は 上部の   をそれぞれクリックします。



※ 新規に Results Table を表示した際、結果が正しく表示されていない場合は、Define a qualifying row に以前の設定が残っている可能性があります（設定時：アイコン紺色。未設定：水色）。その場合は全てにチェックが入っているか確認してください。



- ⑨ Results Table の Library Score カラムを選択して (Sort selected column from largest to smallest) アイコン  をクリックしてスコアの高い順に並び替え、各成分の結果を順に確認します。

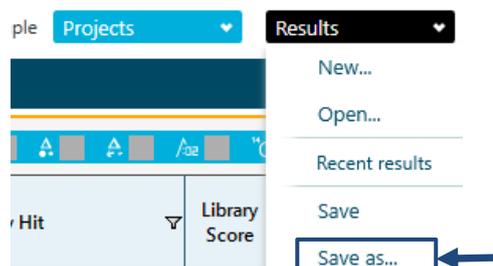


- ⑩ ライブラリサーチの結果を確認するには MS/MS スペクトルの下の Library Search Results をクリックします。

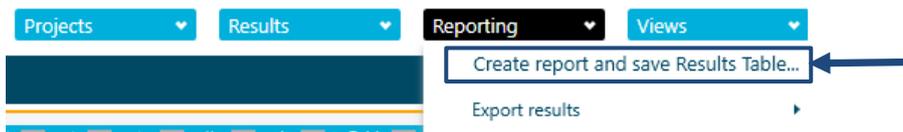
Name	CAS#	Formula	MM (Da)	Fit	Rev. Fit	Purity	CE (eV)
Sulfadiazine [Smart Confirmation]	68-35-9	C10H10N4O2S	250.05244	98.9	100.0	98.9	20
Sulfadiazine [Smart Confirmation]	68-35-9	C10H10N4O2S	250.05244	98.1	100.0	98.1	20
Sulfadiazine [Smart Confirmation]	68-35-9	C10H10N4O2S	250.05244	97.9	100.0	97.9	20

- ⑪ 結果を保存するには、画面上の Results > Save as を選び名前を付けて保存します。

※ Training では、MRM-EPI と名前を付けて保存します。



- ⑫ 必要に応じて Report を作成します。画面上の Reporting > Create report and save Results Table... を選択します。Create Report 画面が表示されますので、目的のテンプレート、出力形式を選択し、Browse... で名前を付けて Create をクリックします。



Generate a report using a predefined template and specified logo

Template name: All Peaks Qual

Template description: Report showing Results Table for analytes for each sample in WYSIWYG style.

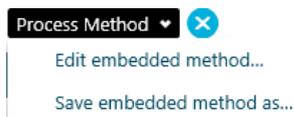
Report format: Word PDF CSV HTML

Report title: All Peaks Qual_Report_2018_08_16_163459

Create an individual report for each sample
(Recommended for large reports; Report titles will be appended with sample reference)

Buttons: Replace Logo..., View Pages..., Browse..., Create, Close

- ⑬ 解析メソッドを変更するには、画面右上の **Process Method** > **Edit embedded method...** を選択します。**Modify Method** 画面が表示されますので適宜修正・変更します。最後に **Process & Close** をクリックすると、再解析が始まります。



- ⑭ **Edit embedded method...** で変更した解析メソッドは保存されていません。変更後の解析メソッドに保存するには、画面右上の **Process Method** > **Save embedded method as...** を選択します。既存のものに上書きする場合は既存のファイルを選択、あるいは別名保存する場合は名前を入力し、**Save** をクリックします。

2.3 ライブラリへのスペクトルの登録

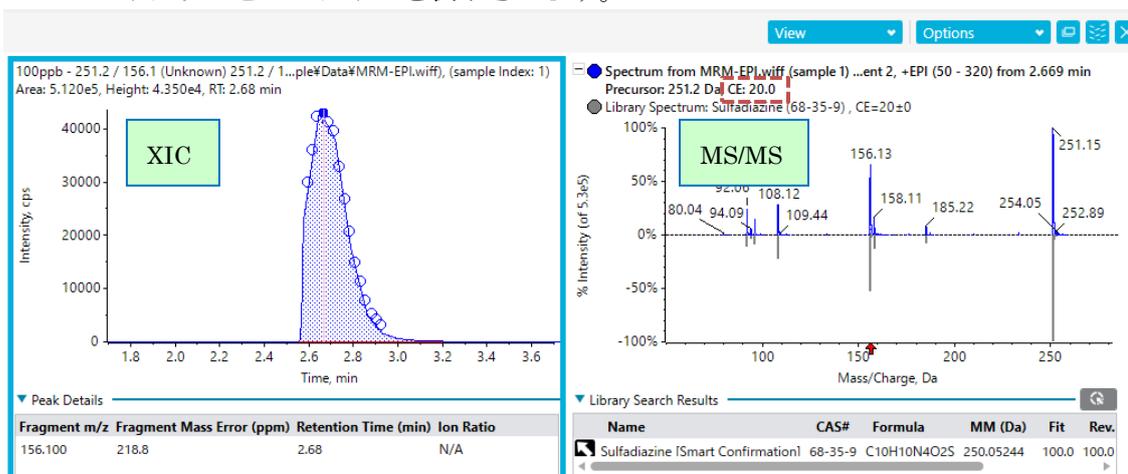
取得した MS/MS スペクトルをライブラリへ登録することができます。

- ① 2.3 に従って **Results Table** を作成、または画面上の **Results** > **Open** から既存の **Results Table** を開きます。

※ Training では、MRM_IDA_EPI.qsession の **Results Table** を開きます。



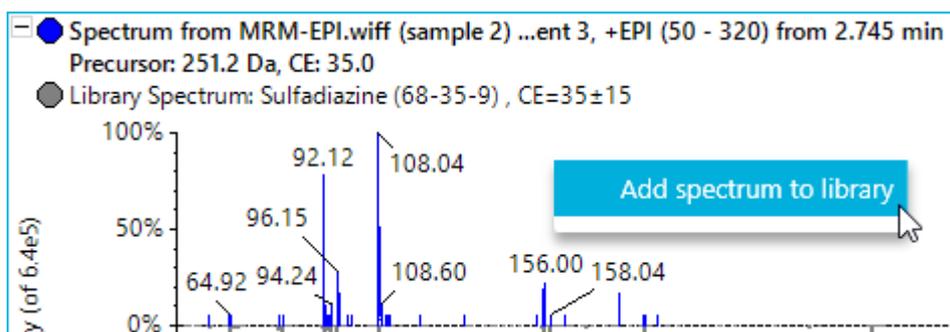
- ② **Results Table** 右上の  (**Display the Peak Review**) アイコンをクリックし、クロマトグラムとスペクトルを表示させます。



- ③ クロマトグラム上の○は、MS/MS スペクトルが取得できたデータポイントです。○をクリックすると●になり、右に MS/MS スペクトルが表示されます。

※ MS/MS スペクトルを何種類かの CE で同時に取得している場合は、データポイントごとに CE が異なっているので、MS/MS スペクトルの上方に表示されている CE を確認します。

- ④ MS/MS スペクトル上で右クリックし、Add spectrum to library をクリックします。



- ⑤ Add spectrum to library 画面が開きますので、Compound Name に化合物名を入力し、保存先のライブラリをプルダウンから選択して、OK をクリックします。

以上で、MRM-EPI 測定～ライブラリトレーニングは終了です。

3 MRM3 を用いた定量

この章で学べること

SCIEX OS ソフトウェアの MRM3 機能について解説します。

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

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

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

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

3-1 MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について

3-2 Guided Optimization MS3 Infusion を用いた自動最適化

3-3 マニュアルでの最適化

3-4 イオンソースの最適化

3-5 MS Method の作成

3-6 Explore モードでのデータ確認方法

3-7 MS/MS/MS の定量解析

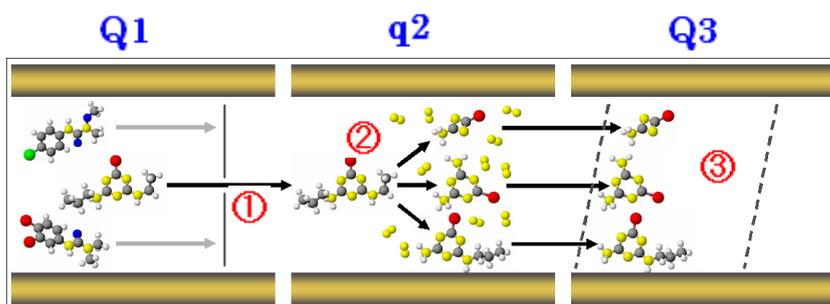
3.1 MS/MS/MS (MS3) を用いた定量について

MS/MS/MS とは

LIT(Linear Ion Trap)スキャンモードの一つです。

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

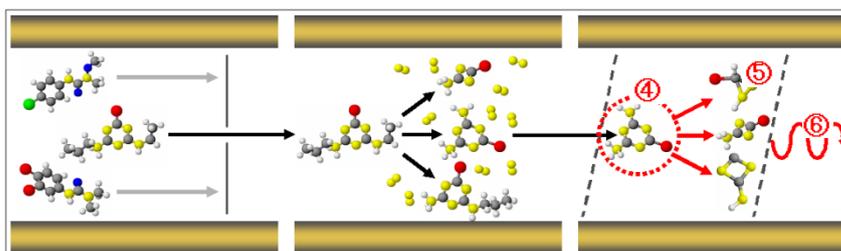
MS/MS/MS (MS3)は、q2 で生成したフラグメントイオンのうち、特定のフラグメントイオンをイオントラップ内で単離し、さらにフラグメンテーションするスキャンモードです。



➤Q1 で 1st Precursor Ion が選択されます。

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

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



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

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

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

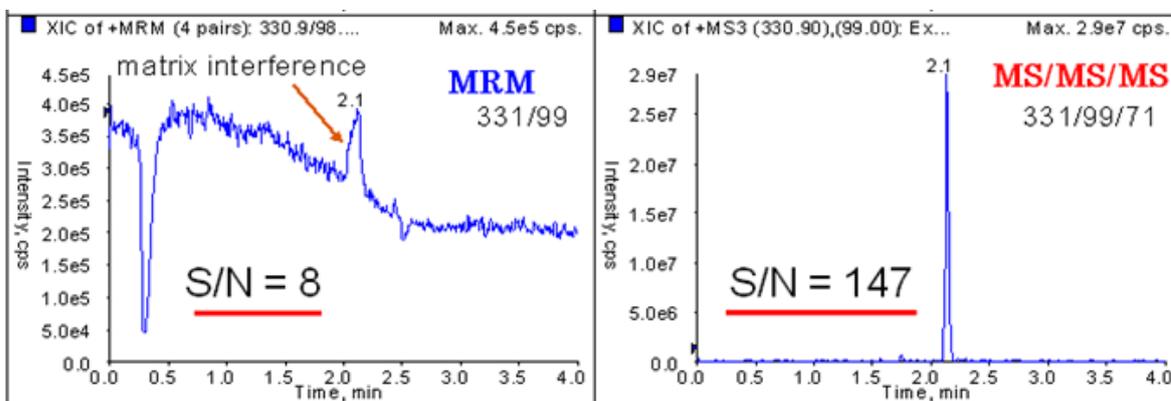
MRM3 による定量とは

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

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

バックグラウンドが低い場合には、MRM モードでの測定が有効です。

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



MRM3 の選択性の高さがわかります。

MRM3 測定の流れ

1. 最適化

1) インフュージョンによる、MRM³ (MS³) 最適化を実施

1.1 Infusion 最適化の準備 – ピークの確認 –

1.2 Guided Optimization - MS³ Infusion (自動最適化プログラム) の Running

Guided Optimization - MS³ Infusion の条件設定

自動最適化により、MRM3 メソッドが自動作成されます

2) MRM³ のパラメータ AF2 値をマニュアルで最適化

作成した MRM³ メソッドでは、マトリックスの影響を軽減できない場合 又は、更なる感度を追求されたい場合は、AF2 パラメータをマニュアルで最適化します。

MRM³ の自動最適化の結果 Log を参考に、Intensity の高い複数 2nd Precursor Ion から複数の 2nd Product Ion と各最適な AF2 値を探します。

2. MRM³ メソッド (MS Method) の作成

複数 Experiment で、複数の 2nd Precursor Ion を組んで、マトリックス入りサンプルを測定します。

3. Explore でのスペクトルとマスクロマトグラムの確認

MS³ メソッドで測定したデータのスペクトルより、マスクロマトグラムを作成し、定量するピークの幅を確認します。

4. MRM3 の定量解析

3.2 Guided Optimization - MS³ Infusion を用いた自動最適化

3.2.1. Guided Optimization - MS³ Infusion のメソッド作成工程

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

① 1st Precursor Ion の測定

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

② DP および EP 電圧の最適化

- * Q1 Multiple Ion (SIM)スキャンを使用します。

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

- * Enhanced Product Ion (EPI)スキャン CE = 40V±15V を使用します。

④ CE 電圧の最適化

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

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

- * MS/MS/MS (MS3) スキャンを使用します。
- * AF2 の値は、電圧を上げていき、2nd Precursor Ion が 5% 残存する電圧を採用します。
- * AF2 は LIT 内で 2nd Precursor Ion を壊すエネルギーです。(QT5500 の場合、0v から 0.3v を 0.015v 刻みで Ramp していきます)

⑥ 決定した AF2 電圧を用いて MS3 スキャンを測定し、生成した 2nd Product Ion のうち、強度の強い 2 個を選択します。

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

⑦ 定量用 MRM3 メソッドの自動作成

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

3.2.2. Guided Optimization - MS³ Infusion (自動最適化プログラム) を Run する前の準備

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

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

① 標準溶液を調製します。

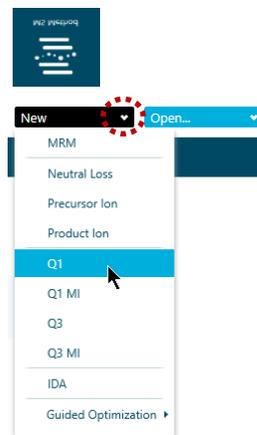
QTRAP® 5500、6500 LC/MS/MS System では 100ng/mL 程度、QTRAP® 4500 LC/MS/MS System では 500ng/mL 程度を用意します。ただし、測定対象の感度に応じて、濃度を調製する必要があります。

② 標準溶液をシリンジに詰め、シリンジポンプにセットします。

③ シリンジとイオンソースを接続します。

④ Home 画面の MS Method アイコンをクリックします。

⑤ 上部にある New の下矢印(右図参照)をクリックし、[Q1]を選択します。



⑥ 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。

⑦ Scan rate を 1000 Da/s に設定します。

The image shows a software interface with several sections:

- Method duration:** A dropdown menu set to '5' min, circled in red with the label '測定時間' (Measurement time).
- Source and Gas Parameters:** Fields for Ion source gas 1 (20 psi), Ion source gas 2 (0 psi), Curtain gas (32 psi), CAD gas (0 psi), and Temperature (0 °C).
- Experiment:** A dropdown menu set to 'Q1'. The 'Scan rate' field is set to '1000' Da/s, circled in red with the label 'Scan rate'.
- Mass Table:** A table with columns 'Start mass (Da)', 'Stop mass (Da)', 'Scan time (s)', and 'EP (V)'. The first row is circled in red with the label 'スキャンする質量範' (Scan mass range).

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

⑧ 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。

* ※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。

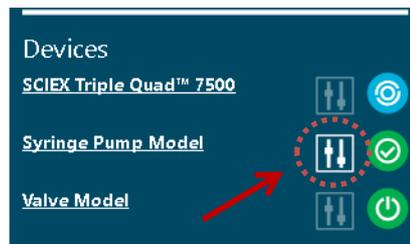
⑨ 画面下部にある Data Acquisition バーの Start をクリックします。

⑩ 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。

* 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が、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出来ます。

シリンジポンプのスタート方法

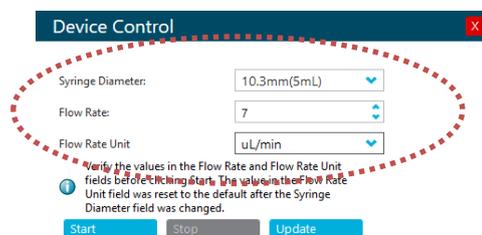
① Status Panel の Devices の Syringe Pump Model のアイコン  をクリックし、Syringe Pump 情報を表示させます。



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 です。

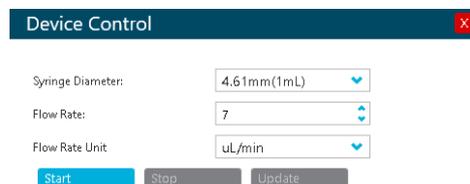
* 1 mL ガスタイトシリンジ(ハミルトン社製など)でも可能です。



③ Start ボタンをクリックします。

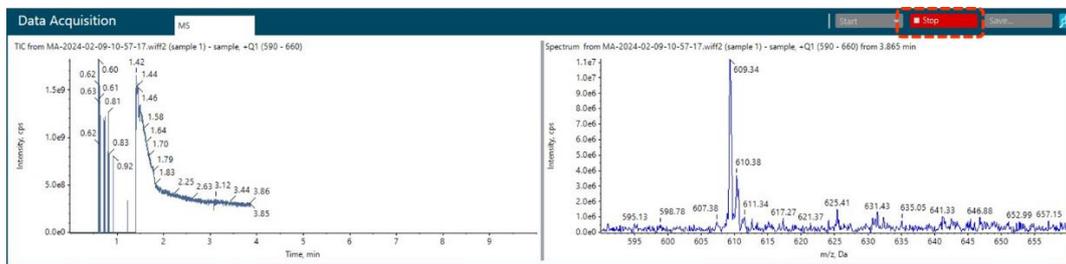
* 測定途中で流速をかえたいときは、Flow rate に流速を入力後 Update ボタンをクリックします。

④ 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。



⑪ 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。

* 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。



1. 左下のクロマトグラム画面の **TIC** が安定していること

2. **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**)。

3. 目的化合物由来のイオンが観測されていること

4. 目的化合物由来のイオンのイオン強度が **10⁷~10⁸ cps (e⁷~e⁸ cps)** 程度であること

* 少し濃い標準溶液を使うと夾雑と間違える可能性が低くなります。

⑫ **Q1** の **MS method** を閉じます。画面を閉じる前に保存するかどうかの警告が出ますので、**No** で閉じます。このとき シリンジポンプは動いたままにしておいてください。

3.2.3. Guided Optimization - MS³ Infusion による自動最適化

① MS method 画面右上の New > Guided Optimization > MS³ Infusion を選択します。

② 次ページのような画面が表示されます。Basic の項目では、Compound Name に化合物の名前、Q1 Resolution に Q1 の分解能、Expected m/z (Da)、Polarity を入力します。

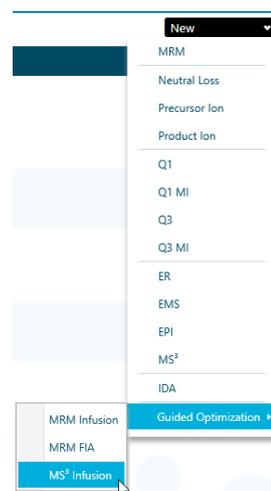
※ トレーニングでは Reserpine、Unit、609、Positive にします。

③ Enhanced Resolution の項目では、Scan rate : ER スキャンのスキャンスピードを選択します。

※ トレーニングでは 10000Da/sec にします。

④ Optimized Declustering Potential の項目では、最適化を行なう DP のレンジを設定します。

※ トレーニングでは Start At に 20V、Stop At に 200V、Step Size に 5V を入力します。



Preparation

Basic ②

Polarity: Positive (dropdown) Compound name: Reserpine (text input) Expected m/z: 609 (dropdown) Da

Q1 resolution: Open (dropdown)

Enhanced Resolution ③

Scan rate: 10000 (dropdown) Da/s Fixed fill time: 0.5 (dropdown) ms

Optimized Declustering Potential ④

Start At: 20 (dropdown) V Stop At: 200 (dropdown) V Step Size: 5 (dropdown) V

Enhanced Product Ion ⑤

Scan rate: 10000 (dropdown) Da/s Product ions: 5 (dropdown) Mass range: 225 (dropdown) Da to 1000 (dropdown) Da

Fixed fill time: 1 (dropdown) ms CE: 40 (dropdown) V CES: 15 (dropdown) V

Dynamic fill time:

Multiple Reaction Monitoring

Dwell time: 50 ms

MS³ ⑥

Scan rate: 10000 (dropdown) Da/s Fixed fill time: 20 (dropdown) ms Mass range: 100 (dropdown) Da to 1000 (dropdown) Da

⑤ Enhanced Product Ion の項目では、Scan rate : EPI スキャンのスキャンスピード、Product Ions : 生成したフラグメント(2nd Precursors)のうち強度の高い方から何番目までを候補とするか、Mass range : 2nd Precursor イオンのスキャン範囲、最適化を行なう CE と CES を設定します。

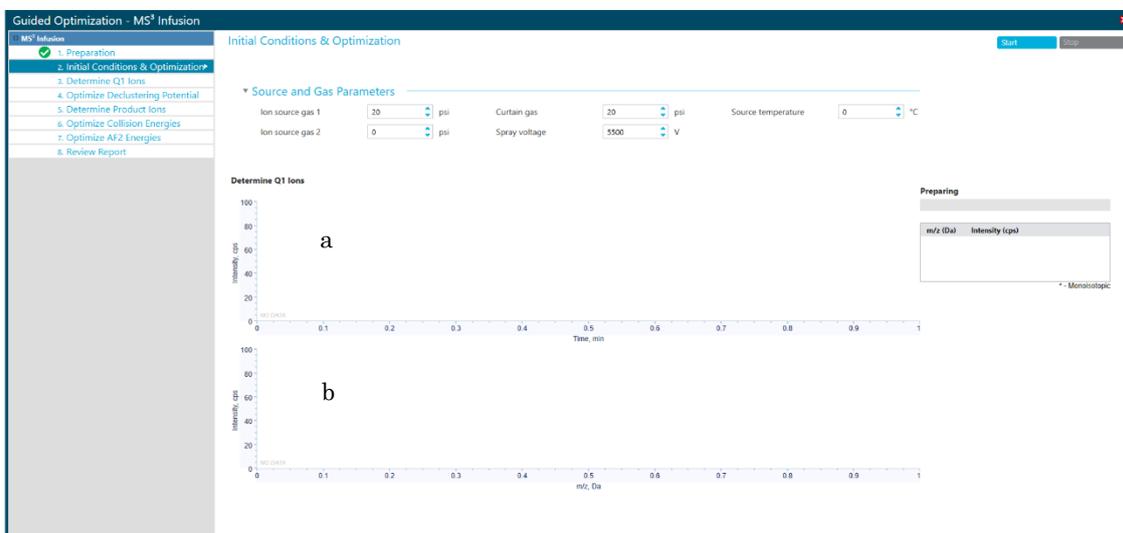
※ トレーニングでは Scan rate 10000Da/sec、Product Ions 5、Mass Range 225Da to 1000Da、CE 40V、CES 15V にします。

⑥ MS³の項目では、Scan rate : MS³ スキャンのスキャンスピード、Mass rage : 3rd precursor (2nd Product) イオンのスキャン範囲を設定します。

※ トレーニングでは 10000Da/sec、Mass Range 100Da to 1000Da にします。

⑦ 画面右上の Next ボタンをクリックします。

⑧ Initial Condition & Optimization の画面が表示されます。画面右上の Start ボタンをクリックし、a. 持続注入が安定していること、b. 目的化合物由来のイオンが観測されていることを確認します。1 分経過すると自動で次の画面へ移動し、最適化が始まります。

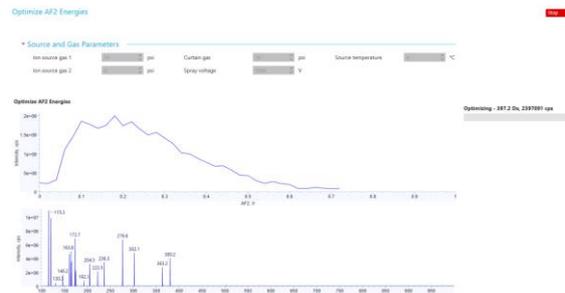
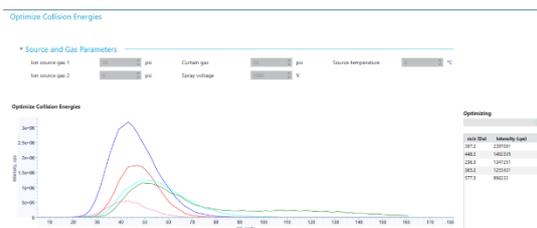


⑨ DP、プロダクトイオン(2nd Precursors)、CE、2nd プロダクトイオン、AF2 の最適値が自動で選択されます。(DP は 7500 シリーズ以外)

右 : プロダクトイオンの選択画面

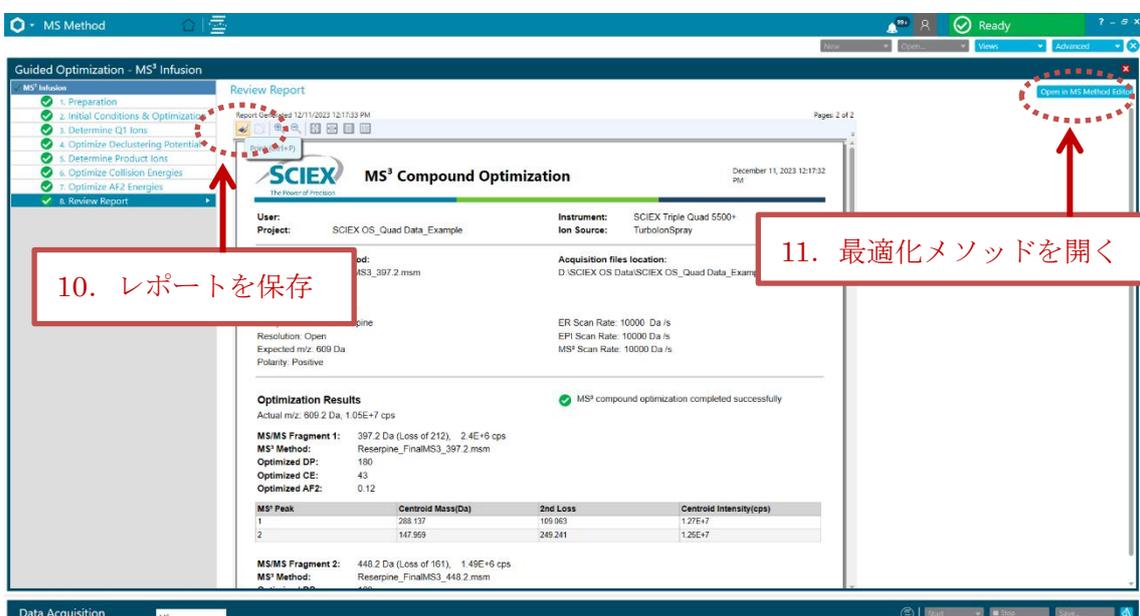
左下 : CE の最適化画面

右下 : AF2 の最適画面



⑩ 自動で結果が出てくるので必要に応じてレポートを保存します。

- * 結果のレポート D:\¥SCIEX OS Data¥Optimization¥MS3Optimization-【年・月・日・時・分・秒】のフォルダに保存されます。
- * 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)



⑪ 画面右上の Open MS method editor 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開きます。

⑫ メソッドは、下記のフォルダに「【Compound name】_FinalOptimalMS3_【プロダクトイオン】.msm」の名前で保存されます。

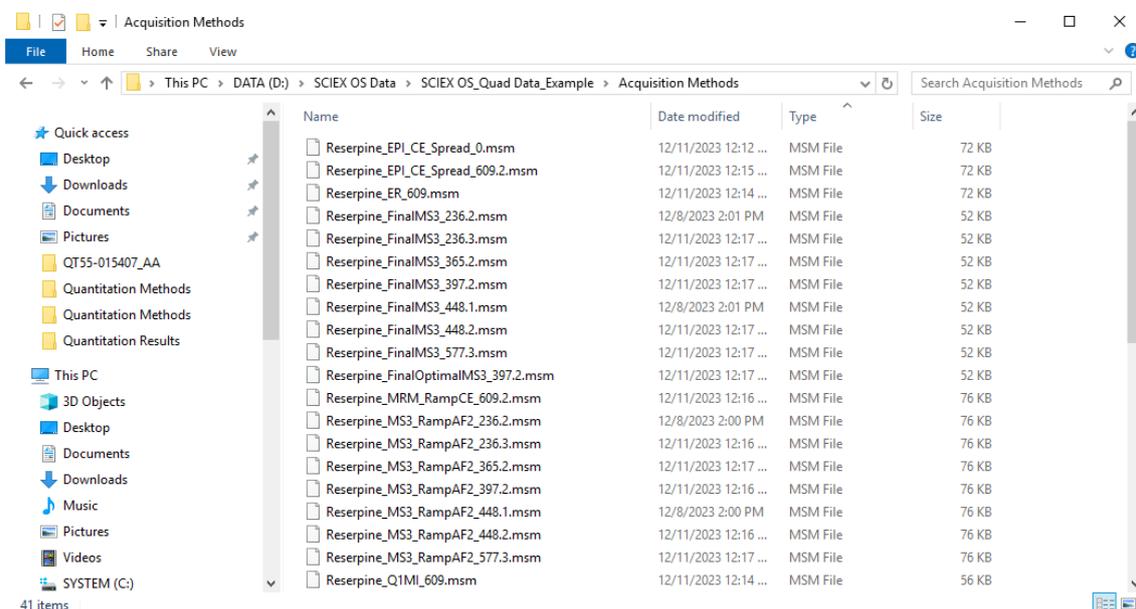
D:\¥SCIEX OS Data¥【Project 名】 ¥Acquisition Methods

- * Training では Reserpine_FinalOptimalMS3_397.2.msm の名前で保存されます。

⑬ 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。

< Guided Optimization - MS³ Infusion (自動最適化プログラム) の結果 >

1. 最適化された測定メソッド



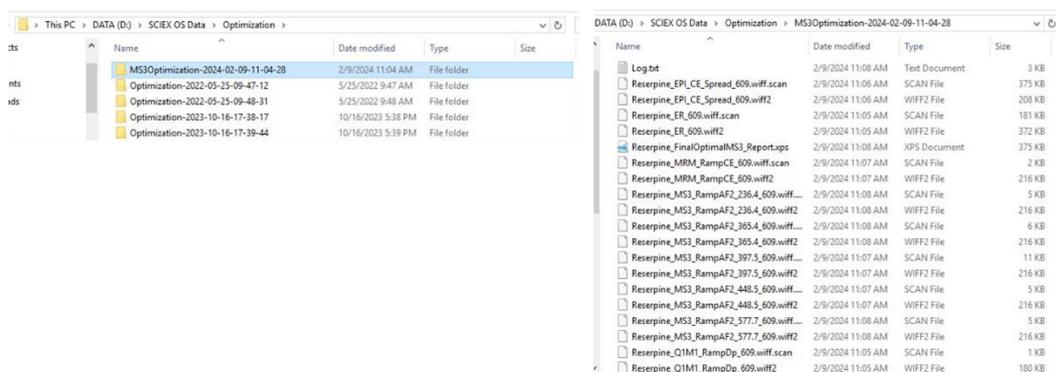
最適化中、あるいは、最適化後に作成されたメソッドは、選択しているプロジェクトのフォルダ内の Acquisition methods フォルダに保存されます。

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

- * トレーニングにて、最適化した結果、得られた定量用の MRM3 メソッド名は、“Reserpine_FinalOptimalMS3_397.2.msm”です。

2. 結果の Log ファイルおよび Report ファイル

D:\¥SCIEX OS Data¥Optimization¥MS3Optimization-【年-月-日-時-分-秒】のフォルダに保存されます。



Log.txt :

```
Log.txt - Notepad
File Edit Format View Help
[12/11/2023 12:13:14 PM] --> ER scan of expected parent 609 Da...
[12/11/2023 12:14:20 PM] Actual parent m/z:
[12/11/2023 12:14:20 PM] 609.2 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:14:22 PM] --> Q1 MS scan of 2nd precursors...
[12/11/2023 12:14:28 PM] Optimized DPs for 2nd precursors:
[12/11/2023 12:14:30 PM] --> EPI CE spread scan of parent 609.2 Da, 1E+007 cps...
[12/11/2023 12:15:37 PM] 2nd precursors:
[12/11/2023 12:15:37 PM] 397.2 Da, 2E+006 cps
[12/11/2023 12:15:37 PM] 448.2 Da, 1E+006 cps
[12/11/2023 12:15:37 PM] 236.3 Da, 1E+006 cps
[12/11/2023 12:15:37 PM] 365.2 Da, 1E+006 cps
[12/11/2023 12:15:37 PM] 577.3 Da, 1E+006 cps
[12/11/2023 12:15:39 PM] --> MRM scan of 2nd precursors...
[12/11/2023 12:16:06 PM] Optimized CEs for 2nd precursors:
[12/11/2023 12:16:06 PM] 43 (397.2 Da, 2E+006 cps)
[12/11/2023 12:16:06 PM] 47 (448.2 Da, 1E+006 cps)
[12/11/2023 12:16:06 PM] 49 (236.3 Da, 1E+006 cps)
[12/11/2023 12:16:06 PM] 49 (365.2 Da, 1E+006 cps)
[12/11/2023 12:16:06 PM] 43 (577.3 Da, 1E+006 cps)
[12/11/2023 12:16:08 PM] --> MS/MS/MS scan of 2nd precursor 397.2 Da, 2E+006 cps...
[12/11/2023 12:16:23 PM] Optimized AF2 = 0.12
[12/11/2023 12:16:23 PM] Peak 1: 288.137 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:16:23 PM] Peak 2: 147.959 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:16:25 PM] --> MS/MS/MS scan of 2nd precursor 448.2 Da, 1E+006 cps...
[12/11/2023 12:16:39 PM] Optimized AF2 = 0.12
[12/11/2023 12:16:39 PM] Peak 1: 144.28 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:16:39 PM] Peak 2: 301.835 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:16:41 PM] --> MS/MS/MS scan of 2nd precursor 236.3 Da, 1E+006 cps...
[12/11/2023 12:16:56 PM] Optimized AF2 = 0.16
[12/11/2023 12:16:56 PM] Peak 1: 123.122 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:16:56 PM] Peak 2: 115.175 Da, 9E+006 cps
[12/11/2023 12:16:58 PM] --> MS/MS/MS scan of 2nd precursor 365.2 Da, 1E+006 cps...
[12/11/2023 12:17:13 PM] Optimized AF2 = 0.12
[12/11/2023 12:17:13 PM] Peak 1: 174.2 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:17:13 PM] Peak 2: 277.316 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:17:15 PM] --> MS/MS/MS scan of 2nd precursor 577.3 Da, 1E+006 cps...
[12/11/2023 12:17:29 PM] Optimized AF2 = 0.12
[12/11/2023 12:17:29 PM] Peak 1: 228.617 Da, 1E+007 cps
[12/11/2023 12:17:29 PM] Peak 2: 211.196 Da, 9E+006 cps
[12/11/2023 12:17:31 PM] --> Generating final MS/MS/MS methods...
[12/11/2023 12:17:31 PM] Reserpine_FinalMS3_397.2
[12/11/2023 12:17:31 PM] Reserpine_FinalMS3_448.2
[12/11/2023 12:17:31 PM] Reserpine_FinalMS3_236.3
[12/11/2023 12:17:32 PM] Reserpine_FinalMS3_365.2
[12/11/2023 12:17:32 PM] Reserpine_FinalMS3_577.3
[12/11/2023 12:17:33 PM] Optimization completed successfully!
[12/11/2023 12:17:33 PM] Refer to Log.txt for optimization details.
Windows (CRLF) Ln 1, Col 1 100%
```

1st Precursor

2nd Precursor
と最適化されたCE値

最適化されたMS3
フラグメント

3.3 マニュアルでの最適化

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

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

AF2 値をマニュアルで最適化します。

- ① ホーム画面から MS Method をダブルクリックします。



- ② Open から自動最適化で作成されたメソッドファイル “[化合物名] + [スキャンタイプ] + [m/z]”.を開きます。

* Training では Reserpine_Final Optimal MS3_397.2.msm を開きます。

- ③ Scan type に、MS/MS/MS(MS3)が選ばれていることを確認します。

- ④ Scan rate、Polarity を確認します。

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

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

* Training では、Scan rate=10000Da/s 、Positive を選択します。

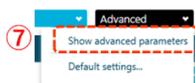
- ⑤ 1st Precursor Ion, 2nd Precursor Ion に数値が入力されている事を確認します。

- ⑥ Start mass, Stop mass に測定する範囲を入力、2nd Precursor Ion が見える範囲ま

でとします。

- * その他のパラメータ(DP、EP、CE)は、自動最適化した値が Compound タブに入力されています。

- ⑦ Advanced をクリックし、Show advanced parameters に✓が入っていない場合は選択して advanced parameter を表示します。



- ⑧ Dynamic fill time のチェックを外し、Fixed fill time に溜める時間を入力、10msec 程度にします。

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

Method duration: 10 min Total scan time: 0.139 s Estimated cycles: 4304

Source and Gas Parameters

Ion source gas 1: 20 psi Curtain gas: 20 psi Source temperature: 0 °C
Ion source gas 2: 0 psi CAD gas: 12 psi

Experiment: MS³

Polarity: Positive CE spread: 0 V Excitation time: 25 ms

5 Spray voltage: 5500 V Scan rate: 10000 Da/s
Precursor ion: 609 Da Second precursor ion: 397.2 Da

Advanced Experiment Settings

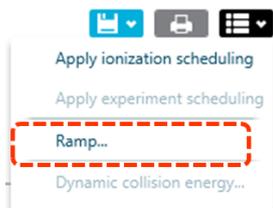
Setting time: 0 ms Pause time: 1.5 ms

8 Dynamic fill time: Fixed fill time: 10 ms Step size: 0.12 Da
Q0 trapping: Q3 entry barrier: 2 V Q1 resolution: Unit

Mass Table Import from file...

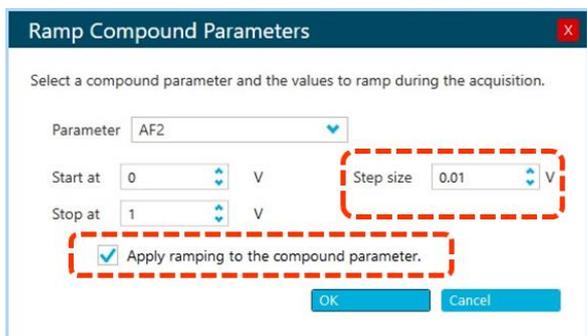
	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	Auxiliary frequency 2 (V)
1	50,000	400,000	0.0350	155.0	10.0	41.0	0.100
*							

- ⑨ Options > Ramp を押し、Ramp Compound Parameters の画面を開きます。

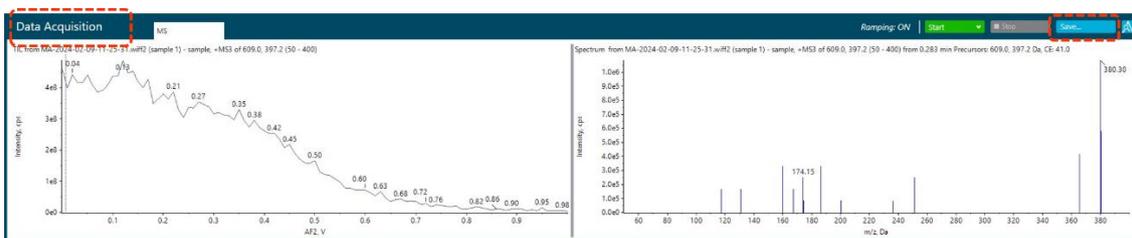
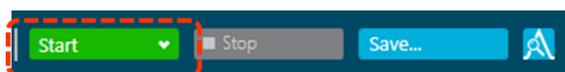


- ⑩ Parameter に、AF2 をプルダウンメニューから選びます。

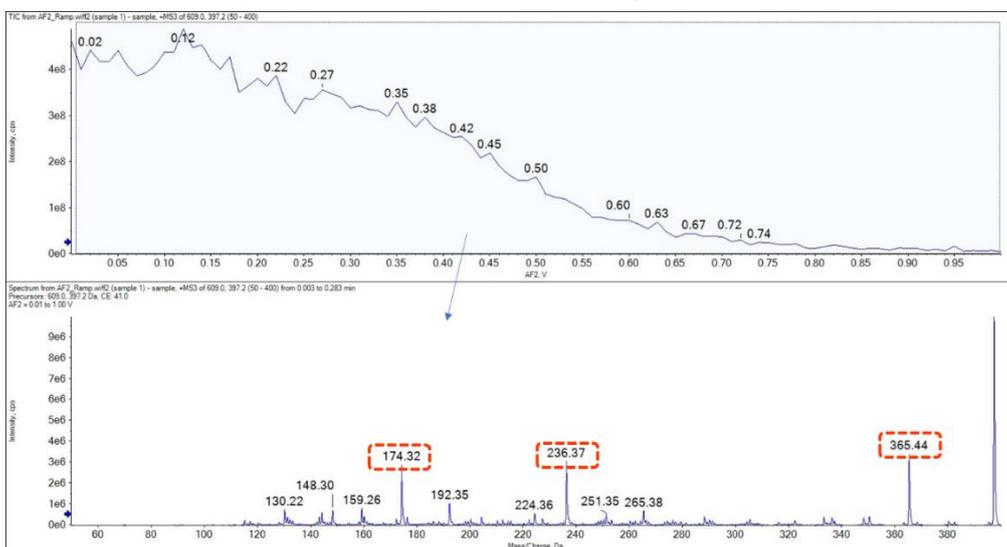
Step を 0.01 に設定し、Apply ramping to the compound parameter にチェックを入れ、OK を押します。



⑪ Start ボタンを押して測定を開始します。画面下側の Data Acquisition をクリックするとリアルタイムで測定結果を確認可能です。終了後、Save をクリックし File Name を入れて保存します。

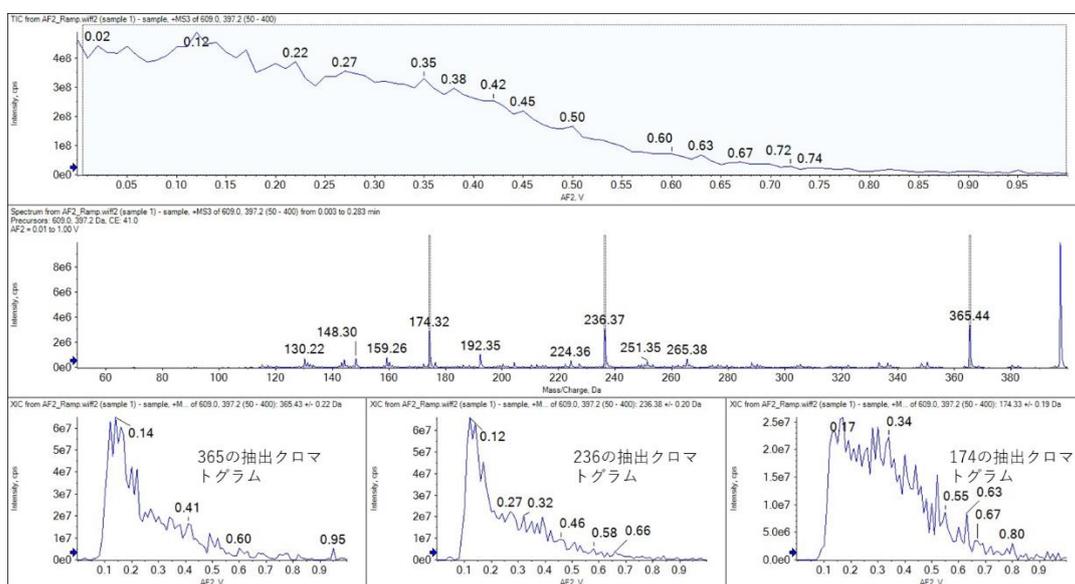


⑫ Explorer モードにて、保存したデータを開きます。TIC の画面全体をマウスで選択しダブルクリックします。平均されたスペクトルが下段に表示されます。その中で強度の高いマス値を 2nd Product Ion とします。



⑬ ⑫で選択した 2nd Product Ion のスペクトルにて、モノアイソトピックイオンをドラッグして選択、ダブルクリックすることで抽出クロマトグラムを作成します。

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



⑭ 内部標準物質も MRM3 で測定する場合は、2~13 と同様に操作し、2nd Product Ion とそれに最適な AF2 値を最適化します。

⑮ 複数の 2nd Precursor Ion について、2~15 の操作を行い、AF2 の値をメモします。

3.4 イオンソースの最適化

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

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

* Training では、イオンソースの最適化は行いません。

以下のパラメータ値を入れて下さい。

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

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

備考) カッコ () 内は Negative モード時の設定値を表します

< ! 注意! >-----

QTRAP® 5500 LC/MS/MS System

TISの設定温度は最大700度までにしてください

750°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。

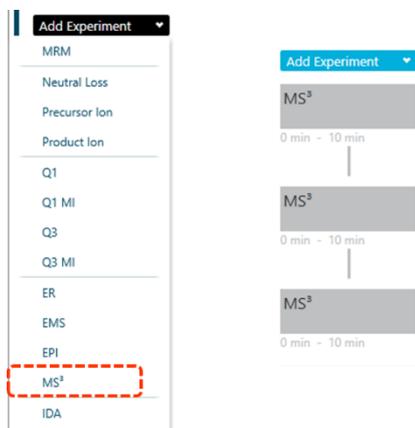
3.5 MS Method の作成

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

測定結果より、S/N が一番良好な MRM3 を決定します。

複数 Experiment による MS3 メソッドの作成

- ① Hardware Configuration の Profile を MS+HPLC のものに変更します。
- ② MS Method 画面にて、Open を開き、P51 で最適化した MRM3 メソッドを開きます。
 - * Training では Reserpine_Final OptimalMS3_397.2.msm を開きます。
 - * イオンソースの最適化を行った場合は、そのメソッドを開きます。
- ③ Add Experiment をクリック、MS3 をクリックすると Experiment が追加されます。ここでは 2つ追加し、合計 3つの Experiment を並べます。



- ④ 追加した Experiment2、3 に、MRM3 Optimization で Intensity が高かった MS3 の 2nd Precursor Ion と AF2 を含む Compound タブのパラメータを入力します。
(マニュアルでの AF2 最適化を実施した場合はその値を入力します)

▼ Experiment MS³

Polarity: Positive Spray voltage: 5500 V Scan rate: 10000 Da/s
 CE spread: 0 V Precursor ion: 609 Da Second precursor ion: 397.5 Da
 Excitation time: 25 ms

Advanced Experiment Settings
 Setting time: 0 ms Pause time: 1.5 ms
 Dynamic fill time: Fixed fill time: 1.0 ms Step size: 0.12 Da
 Q0 trapping: Q3 entry barrier: 2 V Q1 resolution: Low

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

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	Auxiliary frequency 2 (V)
1	50.000	400.000	0.0350	155.0	10.0	41.0	0.100

例) 609/397/236の場合
 2nd Precursor: 397.5
 CE: 41
 AF2: 0.1

▼ Experiment MS³

Polarity: Positive Spray voltage: 5500 V Scan rate: 10000 Da/s
 CE spread: 0 V Precursor ion: 609 Da Second precursor ion: 448.5 Da
 Excitation time: 25 ms

Advanced Experiment Settings
 Setting time: 0 ms Pause time: 1.5 ms
 Dynamic fill time: Fixed fill time: 1.0 ms Step size: 0.12 Da
 Q0 trapping: Q3 entry barrier: 2 V Q1 resolution: Low

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

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	Auxiliary frequency 2 (V)
1	50.000	400.000	0.0350	155.0	10.0	43.0	0.120

例) 609/448/195の場合
 2nd Precursor: 448
 CE: 43
 AF2: 0.12

▼ Experiment MS³

Polarity: Positive Spray voltage: 5500 V Scan rate: 10000 Da/s
 CE spread: 0 V Precursor ion: 609 Da Second precursor ion: 365.4 Da
 Excitation time: 25 ms

Advanced Experiment Settings
 Setting time: 0 ms Pause time: 1.5 ms
 Dynamic fill time: Fixed fill time: 1.0 ms Step size: 0.12 Da
 Q0 trapping: Q3 entry barrier: 2 V Q1 resolution: Low

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

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	Auxiliary frequency 2 (V)
1	50.000	400.000	0.0350	155.0	10.0	47.0	0.120

例) 609/365/251の場合
 2nd Precursor: 365
 CE: 47
 AF2: 0.12

- ⑤ 各 Experiment の Scan rate を設定します。

- * Scan rate は、1000、10000、20000Da/s を選択できます。
- * Training では、10000Da/s を選択します。

- ⑥ FIA でイオン源の最適化を行っていない場合は、イオンソースの各パラメータを入力します。

- ⑦ 各 Experiment の Dynamic fill time にチェックを入れます。

- ⑧ Q1 Resolution を選択します。

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

* Training では、Low を選択します。

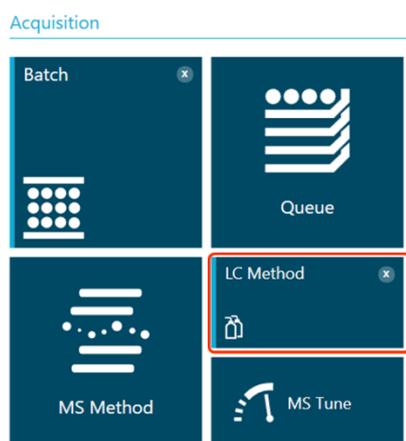


⑨ 測定結果より最も S/N 良好な MRM3 に絞り込み、Save as でファイルを保存します。

* Training では、Reserpine_MRM3 と保存します。

HPLC の条件設定

① ホーム画面の LC Method をダブルクリックし、LC メソッド編集画面を開きます。



② New をクリックすると、新規メソッド画面が開きます。



③ Pump のグラジエントや流速の条件を設定します。

Binary Gradient Autosampler Column Oven System Controller

AC Pump Binary Gradient

Stop time: 8.00 min

B.Conc A.Conc

Flow: 0.2000 mL/min
 A.Conc: 95.0 %
 B.Conc: 5.0 % B.Curve: 0

Pressure limits:
 Minimum: 0.0 MPa Maximum: 60.0 MPa

Gradient

Advanced Simple

Time	Flow	A.Conc	B.Conc	B.Curve
1	0.2000	95.0	5.0	0
2	5.00	0.2000	5.0	95.0
3	5.50	0.2000	5.0	95.0
4	5.60	0.2000	95.0	5.0
5	8.00	0.2000	95.0	5.0
6				

Compressibility settings

Compressibility settings
 Use pump settings

Autopurge settings

Purge order	Mobile phase name	Purge time
1st:	None	5 min
2nd:	None	5 min

Init conc-replacement: 5 min

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

Binary Gradient Autosampler Column Oven System Controller

AC Autosampler

Autosampler

Injection settings

Sampling speed: 5.0 μ L/s
 Cooler temperature: 15 $^{\circ}$ C

Rinse settings

Rinse mode: Before and after aspiration, Dip time:0s
 Rinse pump method: Rinse port, then Pump, Time:2s

Sample rack settings

Specify rack

Type	Needle Stroke [mm]
Rack	
Rack 1.5mL 105 vials	52
Rack 1.5mL 70 vials	52
Rack 1mL Cool	51
Rack 4mL Cool	51
Rack MTP 96 Cool	45
Rack MTP 384 Cool	45
Rack Deep Well 96 Cool	40
Rack Deep Well 384 Cool	40

Injection settings

Control vial needle stroke: 52 mm

Acquisition cycle time optimization

Pretreatment start timing: Off
 Pretreatment overlap time: 0.00 min

Rinse settings

Rinsing speed: 35 μ L/s
 Rinse volume: 500 μ L

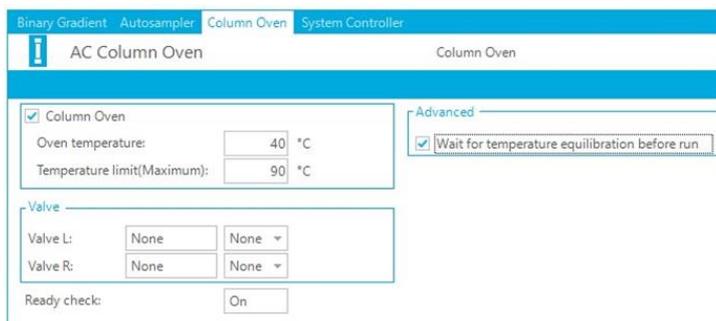
Purge settings

Purge time: 25.0 min

Autopurge settings

Execute sampler purge

- ⑤ Oven の条件を設定します。



- ⑥ 注入量の設定を行います。



- ⑦ Save as を選択し保存します。

* Training では、Reserpine_MRM3_LC で保存します。

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

MRM3 メソッド作成

- ① MS メソッド画面にて Open から、

最適化した MS Method 「Reserpine_Final OptimalMS3_397.2.msm」又は、
保存した「Reserpine_MRM3.msm」を開きます。

* Training では Reserpine_MRM3.msm を開きます。

- ② Experiment が MS3 であることを確認します。

- ③ Scan rate を設定します。

* Training では、1000 Da/sec を選択します

- ④ Polarity が Positive であることを確認します。

- ⑤ 測定化合物の Precursor ion、Second Precursor ion を確認します。

⑥ Start mass, Stop mass を入力します。

* 幅をあまり狭くすると感度が悪くなる事があります。幅が 25Da 程度になるように設定します。

⑦ DP, EP, CE, AF2 などのパラメータを確認します。

* Scan rate、見たい m/z の範囲、イオンを溜める時間を総合的に考慮します。

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

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

3.6 Explore モードでのデータ確認方法

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

- ① ホーム画面にて **Explorer** をダブルクリックし解析画面を開きます。Open sample から MS3 データを開きます。

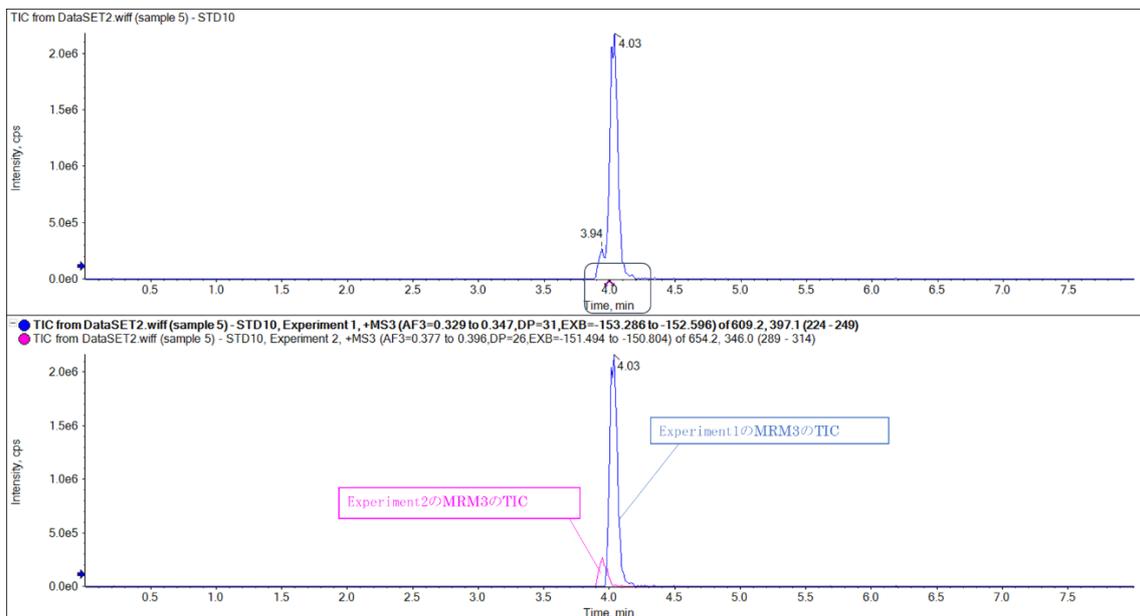
* Training では、STD10 のデータを開きます。

Processing



- ② TIC の X 軸にある矢印をダブルクリックします。

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

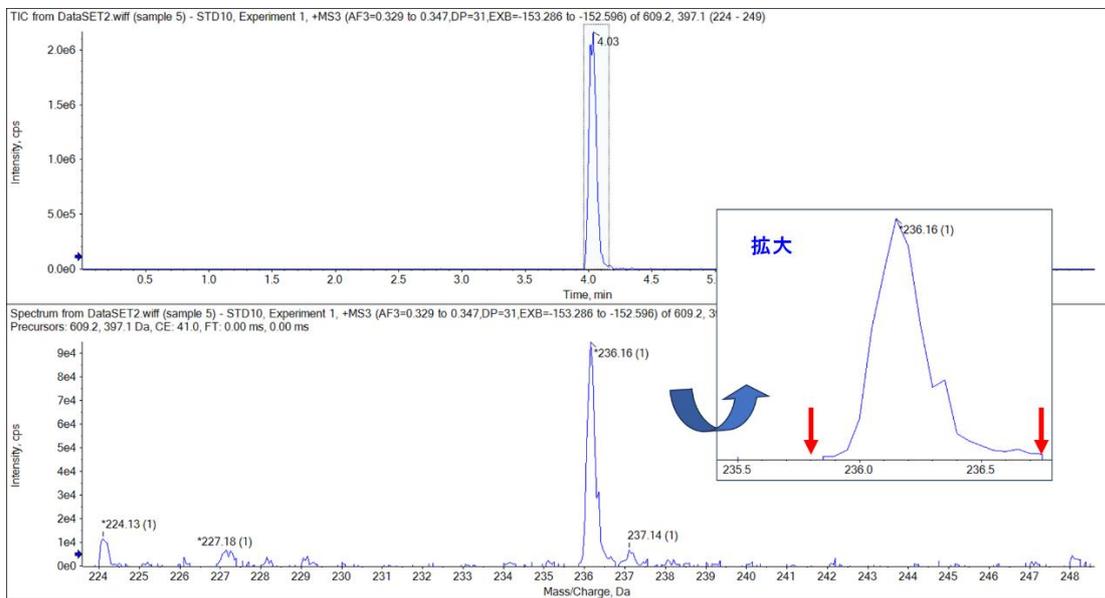


③ Experiment1 の MRM3 データに絞って説明します。

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

④ ドラッグした帯をダブルクリックし、スペクトルを抽出します。

⑤ スペクトルの幅は、235.8 – 236.8 Da とわかります。この値をクロマトグラを作成する時の幅を決める参考にします。



3.7 MS/MS/MS の定量解析

- ① ホーム画面の **Analytics** をダブルクリックし定量解析画面を開きます。



- ② **Project** を選択します。画面上のプルダウンで目的の **Data** が格納されている **Project** を選択します。



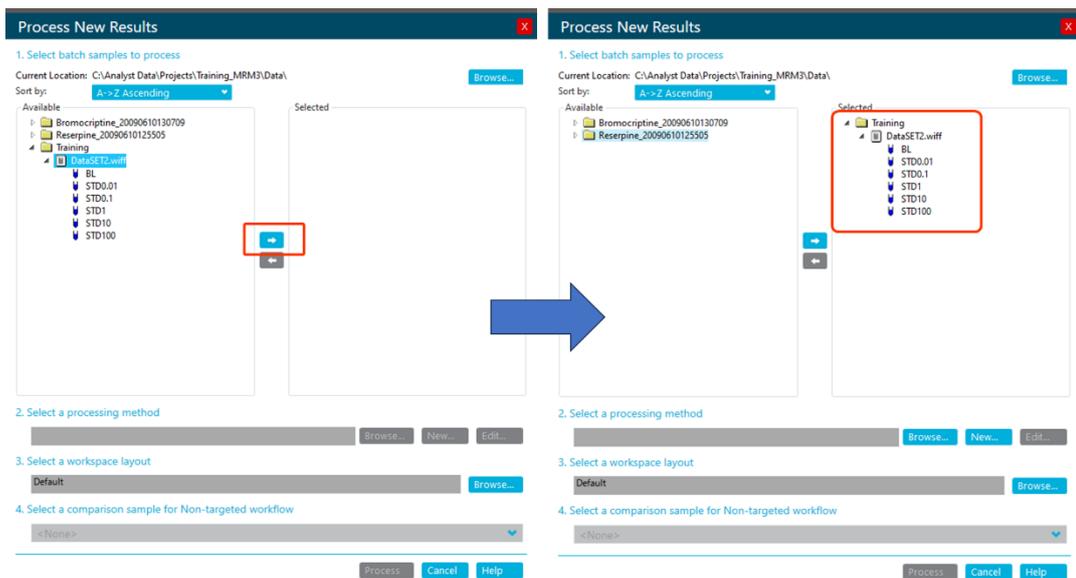
* Training では、Training_MRM3 を選択します。

- ③ **Results Table** を作成します。

メニューバーの **Results** > **New** をクリックします。



- ④ **Process New Results** の画面で、**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** に移動させます。

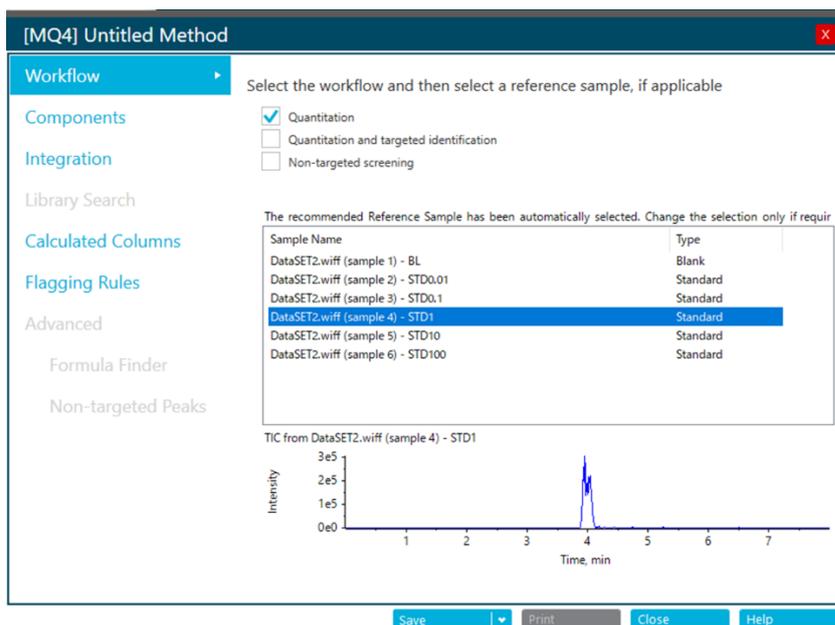


⑤ 解析メソッドを作成します。

Select a processing method の New をクリックします。

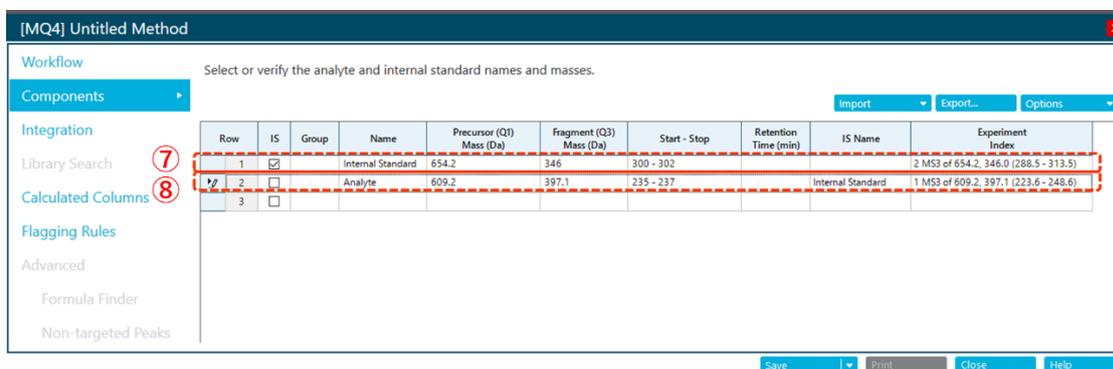
- * 既存の解析 Method を使用する場合は、Browse を選択し、Open ボタンより既存の解析 Method を選択します。

⑥ Workflow では Quantitation を選択します。解析 Method を作成するための基準となる代表サンプルを選択します。

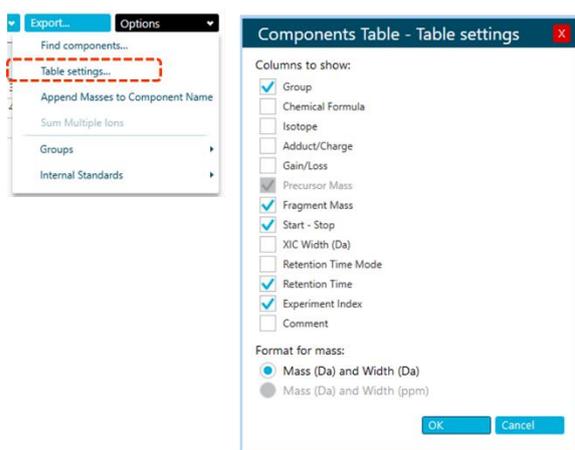


- ⑦ **Components** をクリックします。内部標準物質を使用している場合は、**Experiment Index** にて内部標準物質化合物の MS3 の **Experiment** をプルダウンで選択し、**IS** のチェックボックスをチェック、**Name** に化合物名、**Start - Stop** に MS3 の 2nd product ion(m/z)を入力します。
- ⑧ 次に、定量計算したい化合物 (Analyte) の MS3 の **Experiment** を **Experiment Index** にてプルダウンで選択します。**Name** に化合物名、**Start - Stop** に MS3 の 2nd product ion(m/z)を入力し、**IS Name** でプルダウンから内部標準物質を選択します。

* **Training** では下図を参照して入力します。



- * **Table** に必要な項目が表示されていない場合は、**Option** から **Table settings** をクリックし **Components Table** から選択します。

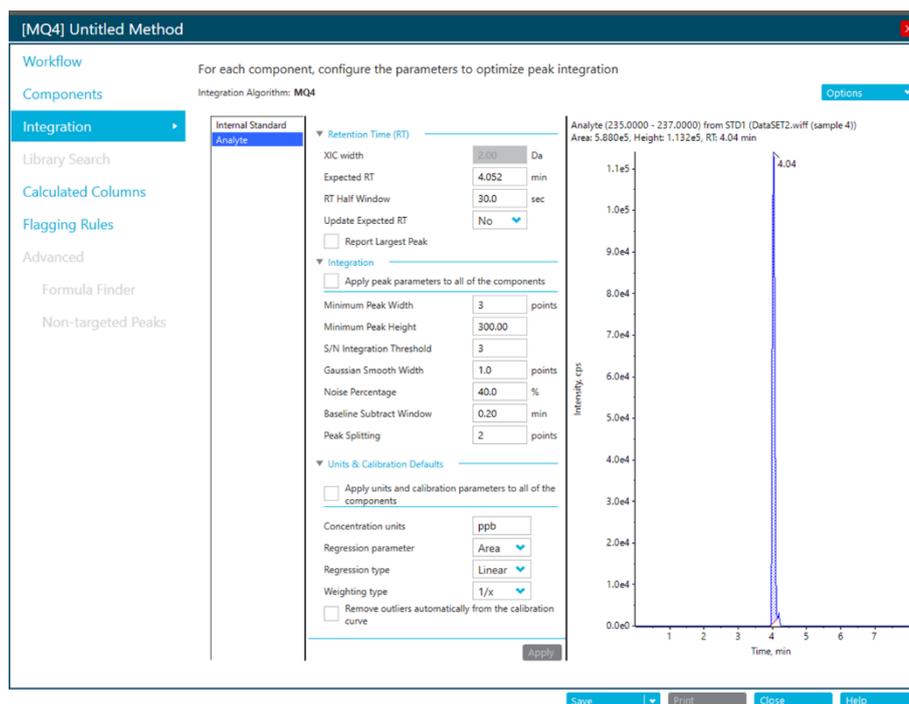


- ⑨ **Integration** をクリックします。代表サンプルの自動積分された結果が表示されます。ピークがうまく積分されていない場合は、積分パラメータを変更後、**Apply** をクリックし、クロマトグラムに反映します。

* パラメータは **Results Table** 作成後に変更できます

【スムージングおよび積分パラメータ】

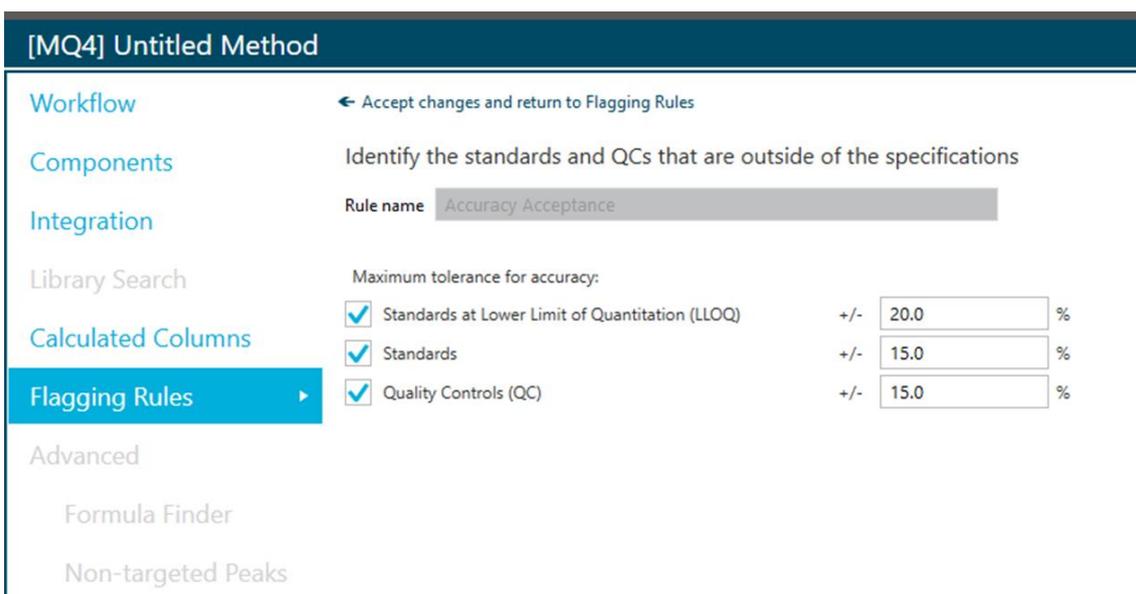
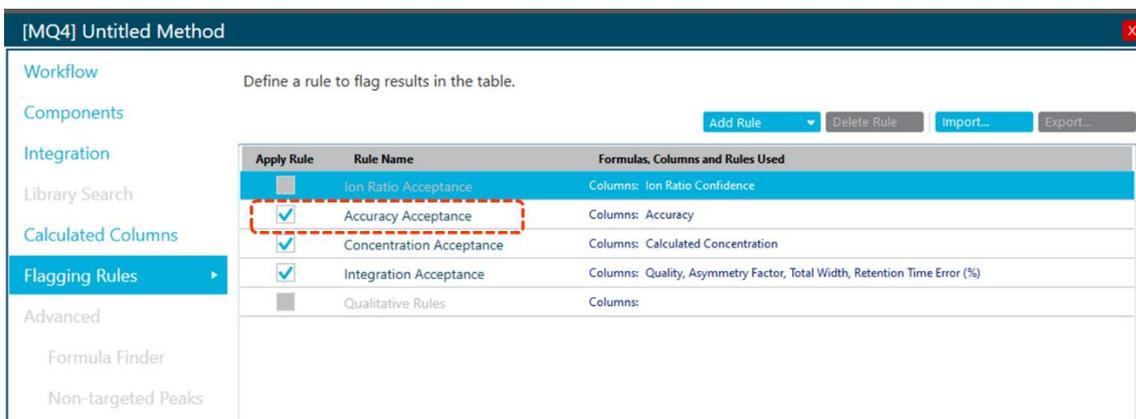
- **Gaussian Smooth Width** : スムージングをかける場合、値を入力します。
- **Min. Peak Height** : ここで設定した高さ (Intensity, cps) を超えるピークを積分します。ベースラインよりも高めに設定することで、ノイズや強度の低いピークは積分されなくなります。
- **Noise Percentage** : 値を大きくする程、ベースラインが上がり、ピーク面積値が小さくなります。
- **Baseline Sub. Window** : ベースラインとして設定する最小強度を検索する幅になります。Peak 幅の 2-3 倍程度が Default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



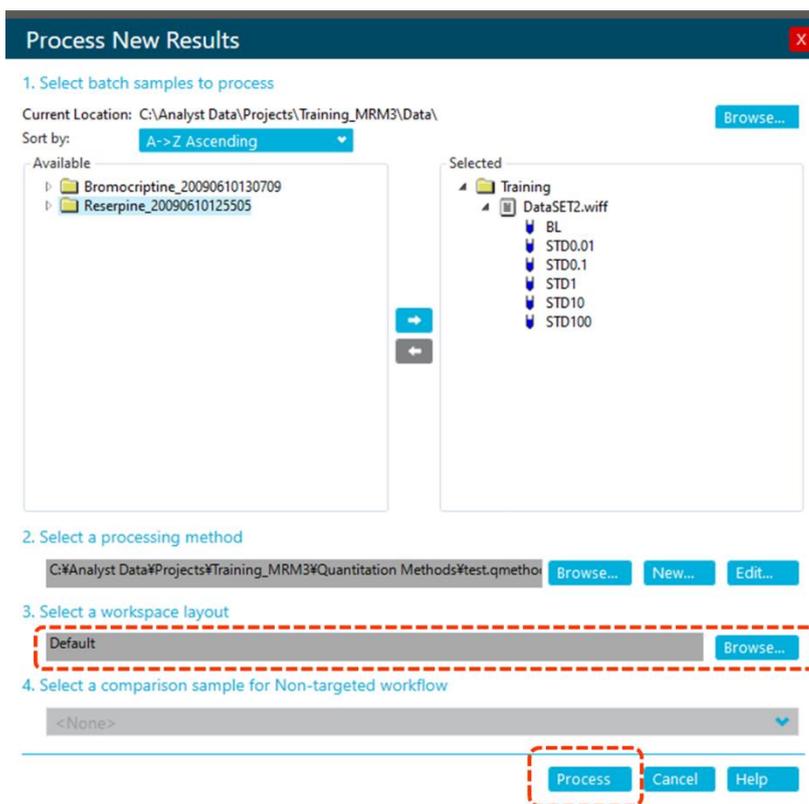
- ⑩ 左のチャンネル (成分) をクリックし、全成分についても同様に積分パラメータを設定、確認します。
- ⑪ **Flagging Rules** を選択します。Accuracy Acceptance から真度、定量値の許容誤差について設定します。

* Version 3.0 以降の設定画面になります。Version2.1 以前ではこの画面は表示されません。

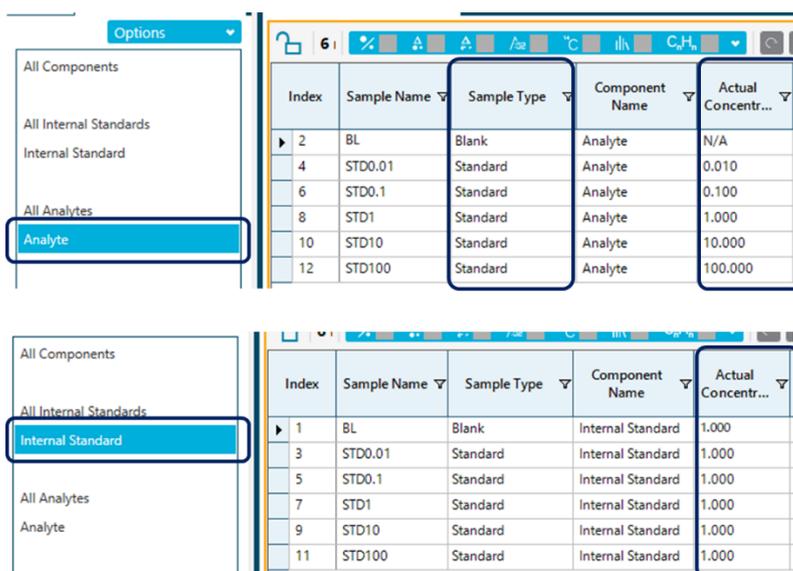
- * 基準値から外れた場合、定量結果の文字がピンクにハイライトされます。
- * 設定しない場合はチェックをはずします。
- * イオン比の表示については、中級定量トレーニングマニュアルを参照ください。



- ⑫ Save as から解析メソッドを名前をつけて保存します。必要に応じて Select a workspace layout の Browse からレイアウトを選択します。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。

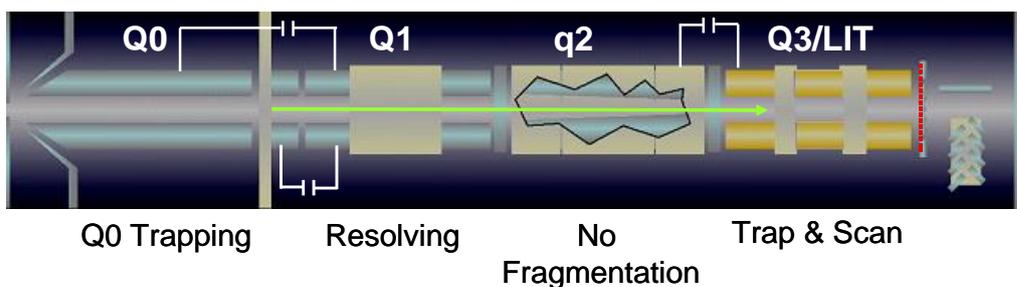


- ⑬ 左側のツリーで Analyte を選択し、「Sample Type」をプルダウンから、Blank、Standard、Unknown 等適切なタイプを選択して下さい。「Actual Concentration」に、検量線の各濃度を入力して下さい。また、左側のツリーで Internal Standard を選択し、IS の「Actual Concentration」に、内部標準物質の濃度を入力して下さい。



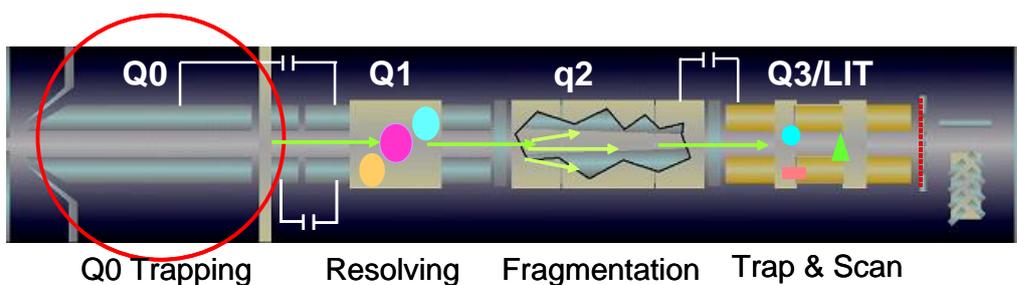
※ その他 Table Settings の設定方法は、「中級定量トレーニングテキスト」の「Results Table の編集と解析」を参照下さい。

Enhanced Resolution (ER)



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

Enhanced Product Ion (EPI)



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

参考資料2 スキャンスピード

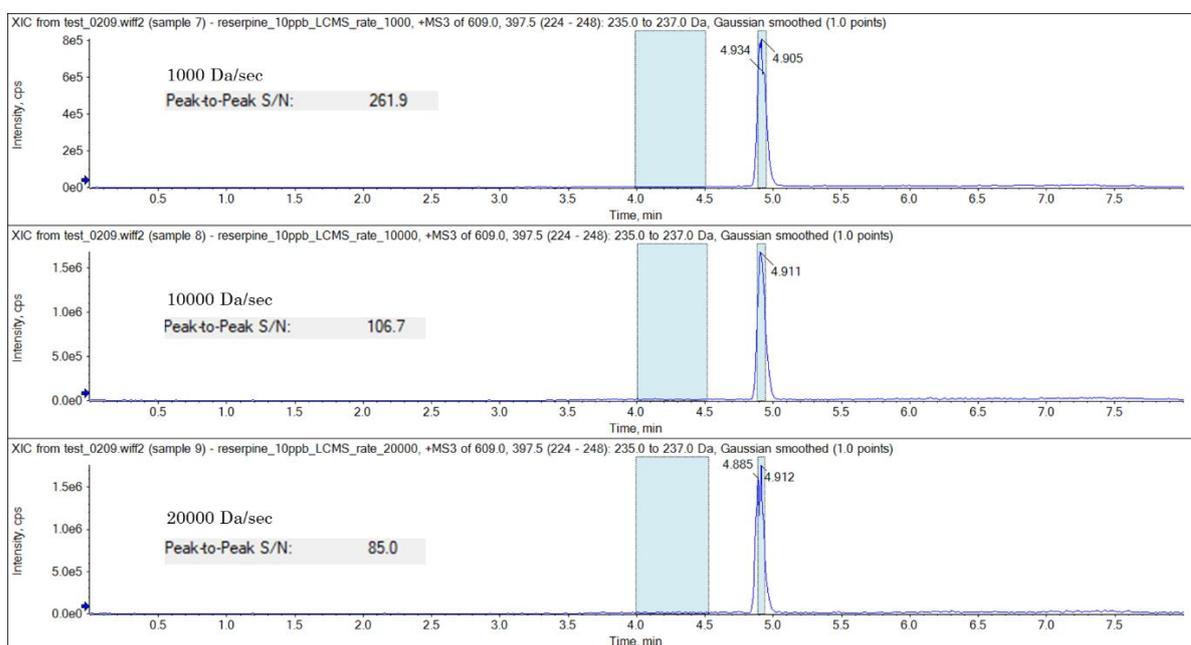
➤ QTRAP® 4500、QTRAP® 5500 システムでは、MS/MS のスキャンスピードは、1000, 10000, 20000 Da/sec の3種類が選択できます。
スキャンスピードに応じて、装置がイオンを溜める時間を自動で以下のように決めています。

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

● Ion statistics

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

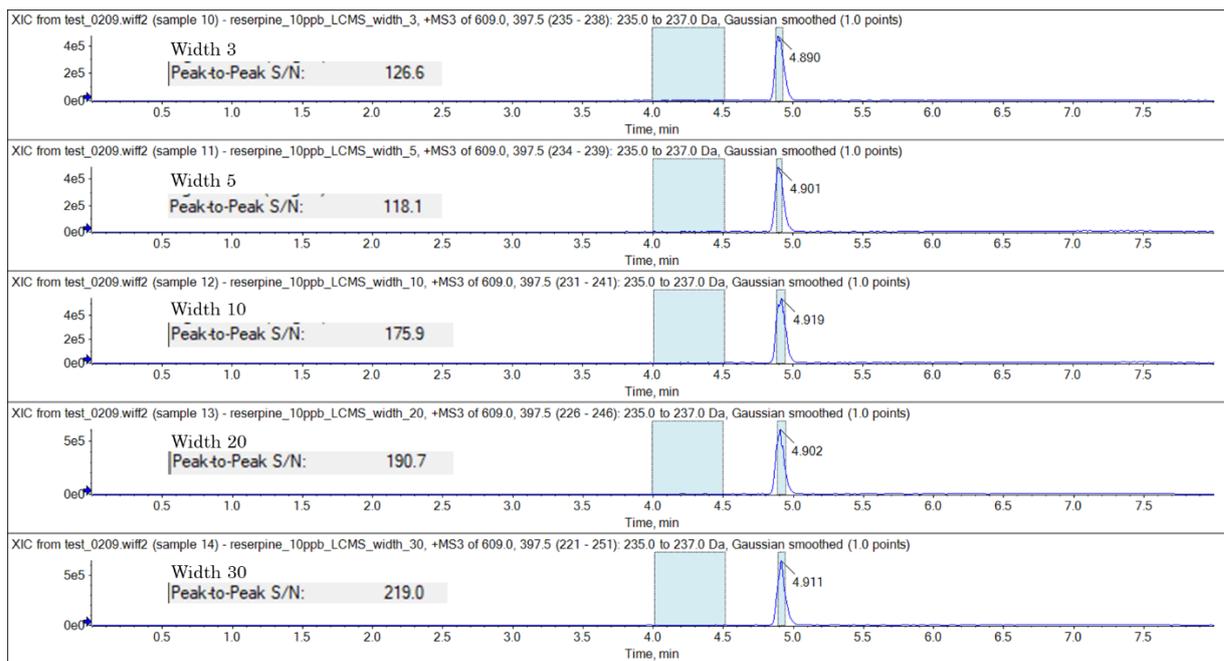
<スキャンスピードを変更した場合の S/N について>



参考資料 3 スキャン範囲

➤ MS/MS/MS 測定で Start mass と Stop mass に入力する値を変更することで、スキャン範囲を任意に設定可能です。

その場合のスキャン範囲は、Width ≥ 10 をおすすめします。



参考資料 4 LIT にイオンを溜める方法

The image displays two screenshots of the 'Advanced Experiment Settings' interface for a Q3(Liner Ion trap). The top screenshot shows the following settings: Settling time: 0 ms; Dynamic fill time: unchecked; Q0 trapping: checked; Pause time: 15 ms; Fixed fill time: 10 ms; Q3 entry barrier: 8 V; Step size: 0.05 Da; Q1 resolution: Unit. The bottom screenshot shows: Settling time: 0 ms; Dynamic fill time: checked; Q0 trapping: unchecked; Pause time: 15 ms; Fixed fill time: 20 ms; Q3 entry barrier: 8 V; Step size: 0.05 Da; Q1 resolution: Unit. Red dashed boxes highlight the 'Q0 trapping' and 'Fixed fill time' settings in both screenshots.

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

① Fixed LIT fill time

イオンを溜める時間を任意に指定する溜め方です。

* 通常 Q0 Trapping を使用する場合があります。

② Dynamic fill time(DFT)

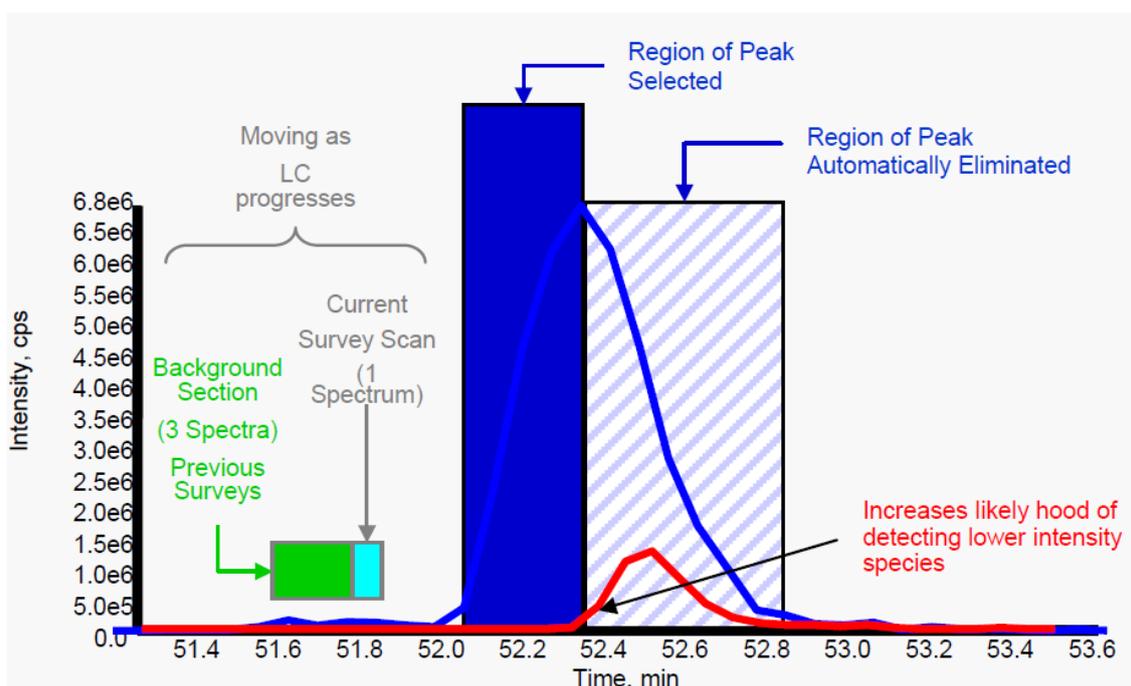
プレスキャンのイオン量に応じて溜める時間を自動計算させる方法です。

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

* Q0 Trapping は使用できません。

参考資料 5 DBS (Dynamic Background Subtraction)

- DBS とは、IDA メソッドで EPI や PI を測定するときに有効な機能です。ベースラインの減算 (バックグラウンドを除去) することで、バックグラウンドに埋もれているピークの MS/MS が取得できるようになります。
- バックグラウンドとして直前の 4 スペクトルの平均を差し引きます。
- バックグラウンド差し引き後のピークを IDA Criteria に沿って選択し、MS/MS を取得します。

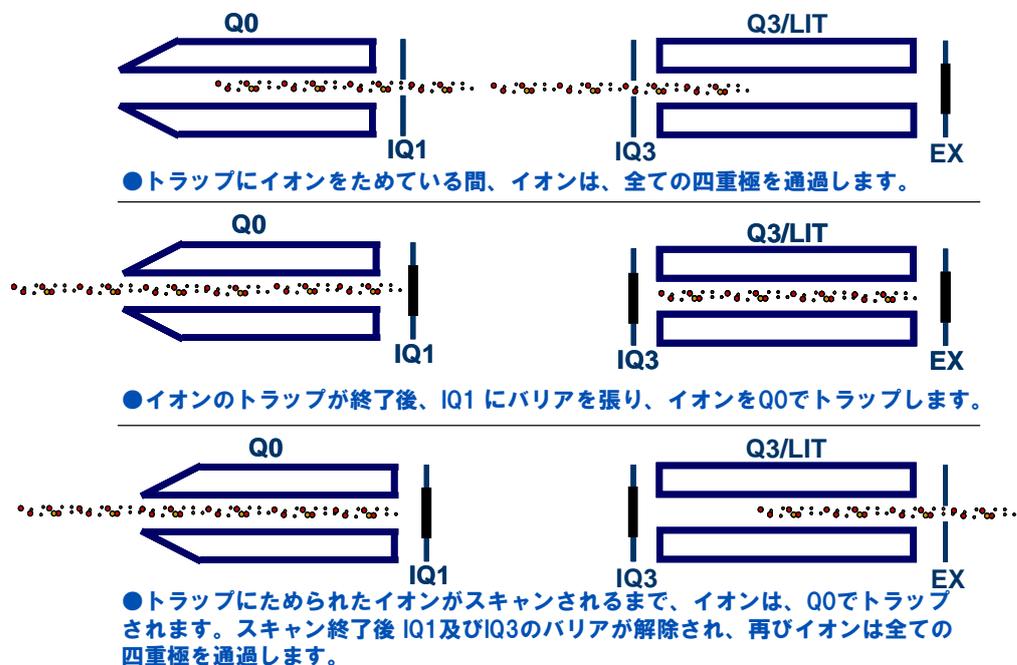


この例では、シグナル強度が大きく異なる 2 つのイオン (青と赤) が近接して溶出しています。DBS では、絶対的な強度 (Intensity) とは対照的に、強度が上昇する速度に基づいてイオンが選択されます。

- 青色のピークで表されるイオンが、LC ピークの開始から最大強度(ピークトップ)まで選択されます。
- このポイントを超えると、以前のサーベイスキャンの平均強度が現在のサーベイスキャンの強度よりも高くなる (IDA Criteria の Intensity threshold を超えない) ため、このイオンは IDA の候補イオンとして除外されます。
- 以降は、強度が低くても、強度が上昇するイオンが選択されます (赤いピーク)。

参考資料 6 Q0 Trapping 機能

Q0 Trapping機能（2）



Q0 Trapping 機能とは？

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

主に EPI や MS/MS/MS にて使用します。

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

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

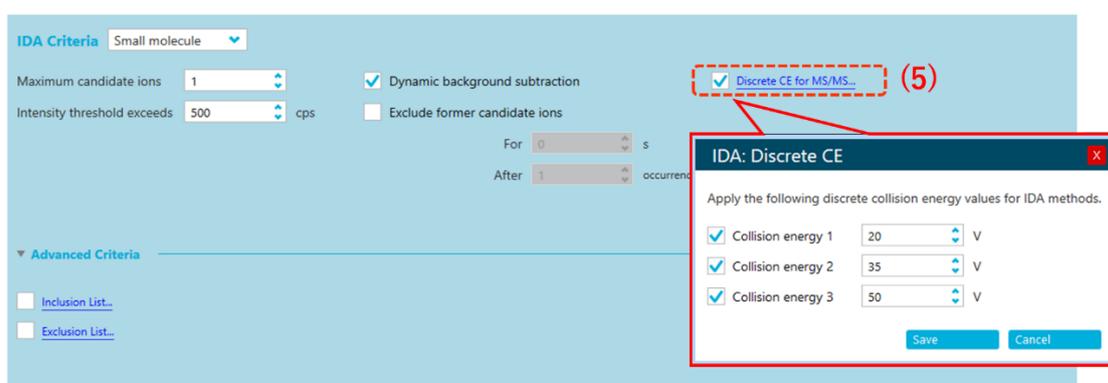
Q0 で溜めておいたイオンが一気に Q3 へと流れてくるため、更なる感度上昇が可能です。

参考資料 7 MRM-EPI Method 作成方法 (Discrete CE for MS/MS)

IDA 測定において、サーベイスキャンで検出したプリカーサイオンについて CE 値を 3 種類設定し MSMS スペクトルを得る方法です。

1.3 MRM-EPI Method 作成方法の手順 4 (5) で以下の設定を行います。

Discrete CE for MS/MS にチェックを入れてからクリック、開いたウィンドウで設定したい Collision energy 値を入力します。トレーニングでは以下のように入力してから Discrete CE のウィンドウを閉じてください。



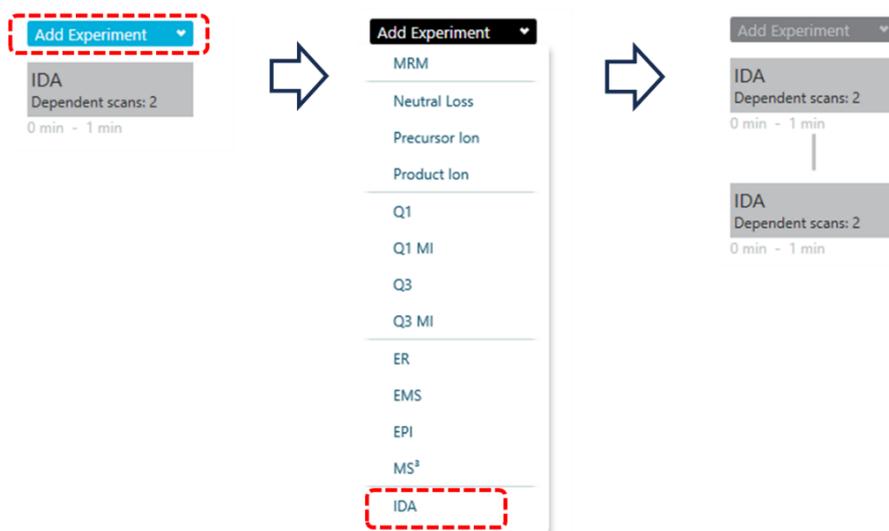
* Discrete CE を設定している場合には CE と CE spread は入力できません。

1.3 MRM-EPI Method 作成方法の手順 5 に進みます。

参考資料 8 MRM-EPI Method 作成方法 (ポジネガ切り替え)

IDA 測定において、MRM (ポジティブ)、MRM (ネガティブ) で検出したプリカーサイオンについてそれぞれ MSMS を取得する方法です。

1. 既存の MRM-EPI メソッドを開きます。画面左側のツリーの Add Experiment をクリックし IDA を選択すると、Experiment が追加されます。



2. 上段の Experiment を選択し Positive モードのサーベイスキャンの設定を行います。設定例を以下に示します。

Method Overview

Device: SCIEX QTRAP 6500+
Ion Source: Turbo Spray
Ion Drive

Method duration: 15 min Total scan time: 0.759 s Estimated cycles: 1186

Source and Gas Parameters

Ion source gas 1: 50 psi Curtain gas: 35 psi Source temperature: 350 °C
Ion source gas 2: 60 psi CAD gas: 12

Experiment: IDA

Survey: MRM

Polarity: Positive Spray voltage: 5500 V

Advanced Experiment Settings

Setting time: 15 ms Pause time: 5 ms
Q1 resolution: Unit Q3 resolution: Unit

Mass Table: Import MRM Mode: MRM

Group ID	Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	SDZ SDZ_1	251.200	156.100	5.000	43.0	10.0	29.0	10.0
2	SDZ SDZ_2	251.200	92.000	5.000	43.0	10.0	39.0	10.0
3	SMZ SMZ_1	265.100	108.100	5.000	46.0	10.0	37.0	10.0
4	SMZ SMZ_2	265.100	92.100	5.000	46.0	10.0	45.0	10.0
5	SDMX SDMX_1	311.200	156.200	5.000	51.0	10.0	31.0	10.0
6	SDMX SDMX_2	311.200	92.100	5.000	51.0	10.0	35.0	10.0

3. 続いて、Positive モードのディペンデントスキャンの設定を行います。設定例を以下に示します。

The screenshot shows the 'Method Overview' interface for a SCIEX QTRAP 6500+ instrument. The 'IDA Criteria' section is set to 'Small molecule' with a maximum candidate ions of 1 and an intensity threshold of 500 cps. The 'Dependent' section is set to 'EPI' with a polarity of 'Positive'. The 'Advanced Experiment Settings' include a settling time of 15 ms and a dynamic fill time checked. The 'Mass Table' shows a single entry for a scan at 50,000 Da to 315,000 Da with a scan time of 0.0265 s.

Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
50,000	315,000	0.0265	43.0	10.0	35.0

4. 下段の Experiment を選択し、Negative モードのサーベイスキャンの設定を行います。設定例を以下に示します。

The screenshot shows the 'Method Overview' interface for a SCIEX QTRAP 6500+ instrument. The 'Experiment' is set to 'IDA' and the 'Survey' is set to 'MRM'. The 'Polarity' is set to 'Negative'. The 'Advanced Experiment Settings' include a settling time of 15 ms and a pause time of 5 ms. The 'Mass Table' shows a list of MRM transitions for various compounds.

Group ID	Compound ID	Q1 mass (Da)	Q3 mass (Da)	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
1	SDZ_neg	249.000	156.100	5,000	-43.0	-10.0	-29.0	-10.0
2	SDZ_neg	249.000	92.000	5,000	-43.0	-10.0	-39.0	-10.0
3	SMZ_neg	263.000	108.100	5,000	-46.0	-10.0	-37.0	-10.0
4	SMZ_neg	263.000	92.100	5,000	-46.0	-10.0	-45.0	-10.0
5	SDMX_neg	309.000	156.200	5,000	-51.0	-10.0	-31.0	-10.0
6	SDMX_neg	309.000	92.100	5,000	-51.0	-10.0	-35.0	-10.0

5. 続いて、Negative モードのディペンデントスキャンの設定を行います。設定例を以下に示します。

Method Overview

Device: SCIEX QTRAP 6500+
Ion Source: Turbo Spray IonDrive

Add Experiment

IDA
Dependent scans: 1
0 min - 15 min

IDA
Dependent scans: 1
0 min - 15 min

IDA Criteria Small molecule

Maximum candidate ions: 1
Intensity threshold exceeds: 500 cps
Dynamic background subtraction:
Discrete CE for MS/MS:
Exclude former candidate ions:
For: 0 s
After: 1 occurrences

Advanced Criteria

Inclusion List:
Exclusion List:
Mass tolerance +/-: 250 mDa

Dependent EPI

Polarity: Negative
CE spread: 15 V
Spray voltage: 4500 V
Scan rate: 10000 Da/s
Precursor ion: 30 Da

Advanced Experiment Settings

Settling time: 15 ms
Dynamic fill time:
Pause time: 1.5 ms
Fixed fill time: 10 ms
Step size: 0.12 Da
Q0 trapping:
Q3 entry barrier: 2 V
Q1 resolution: Unit

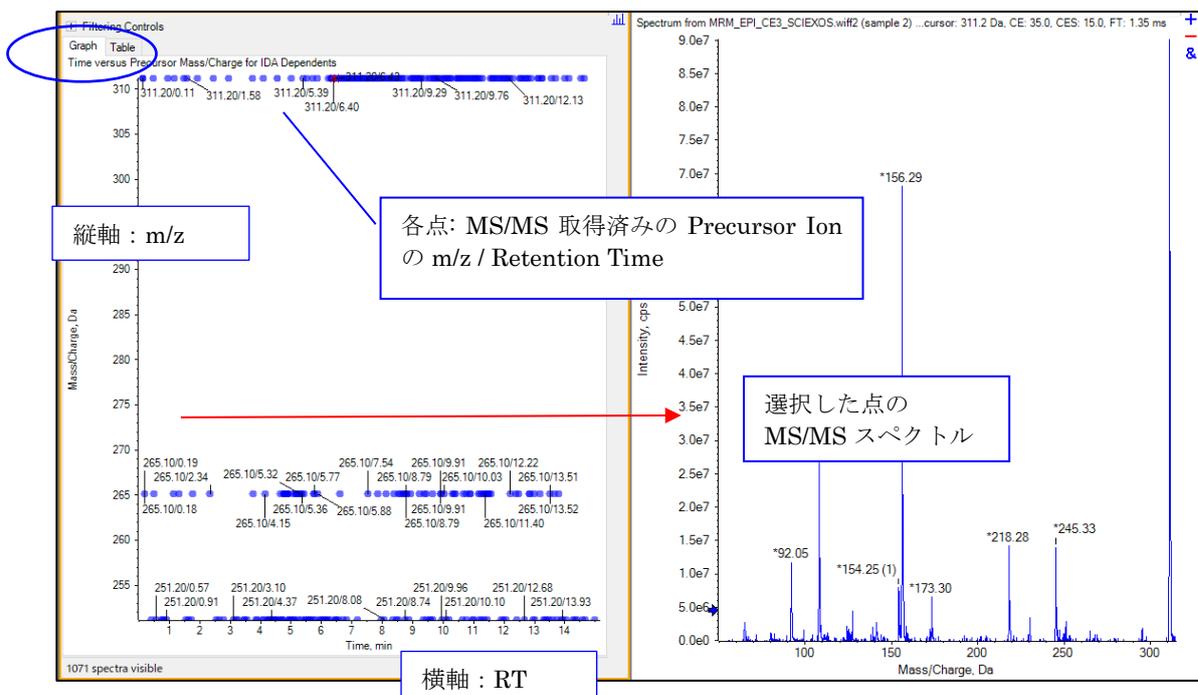
Mass Table Import from file

	Start mass (Da)	Stop mass (Da)	Scan time (s)	DP (V)	EP (V)	CE (V)
1	50,000	350,000	0.0300	-43.0	-10.0	-35.0

参考資料 9 IDA Explorer によるデータ解析

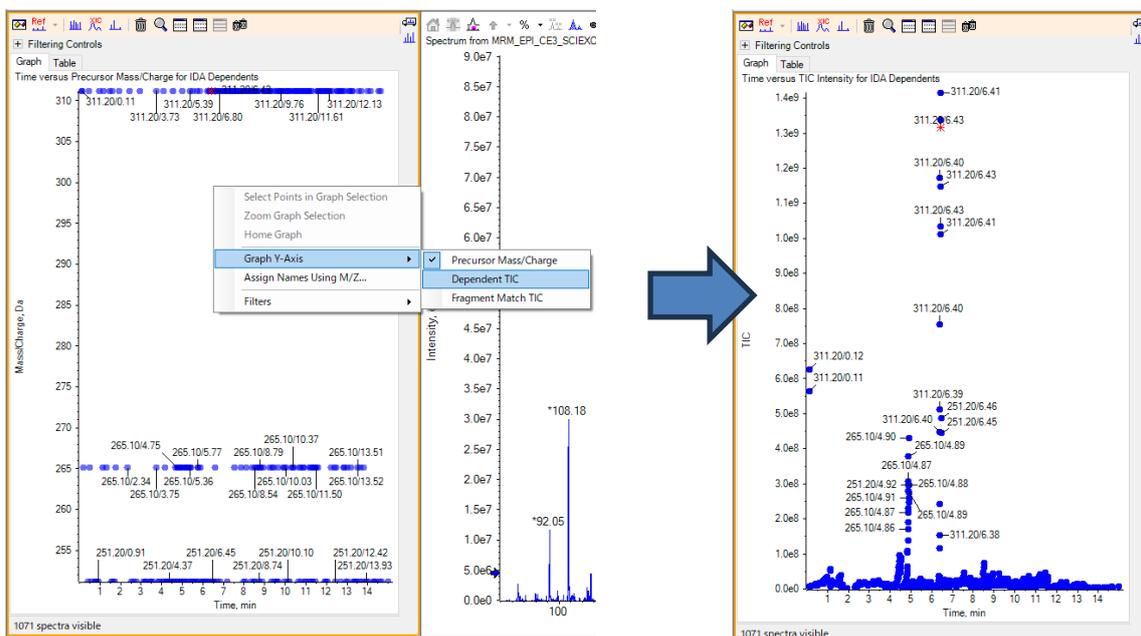
<IDA Explore で開いた画面>

- * D:\SCIEX OS Data\SCIEX OS_Quad Data_Example\Data
- * MRM_EPI_CE3_SCIEXOS.wiff #1-3MIX_10ppb



IDA Explorer の縦軸表示の変更

プロット上を右クリックし Graph Y-Axis -> Dependent TIC を選びます。



Filtering Controls と Table タブ

Filtering Controls

以下の設定から目的のイオンに制限をかけ、解析を容易にすることが可能です。

- Retention Time (RT)
- m/z
- TIC: Fragment Ion の強度の積算

Table の各項目をクリックすることでソートができます。

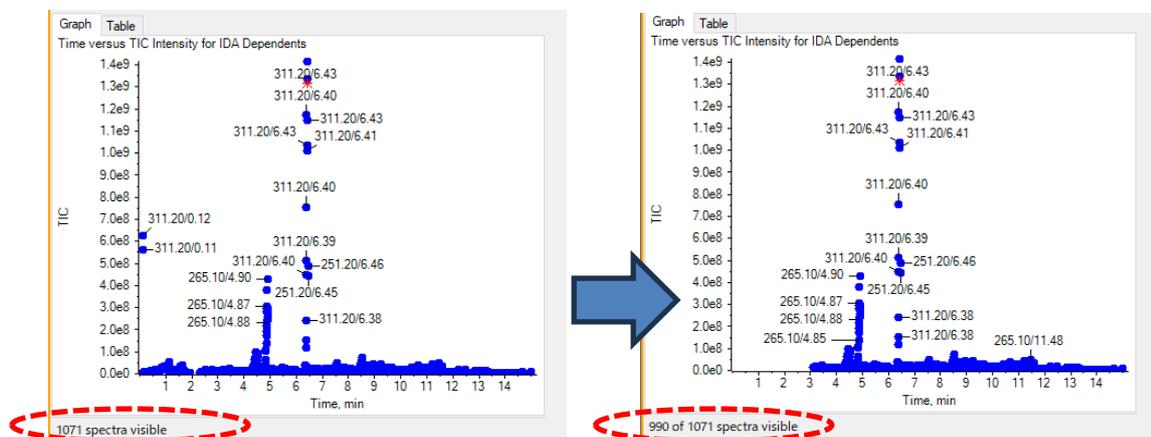
Index	RT	m/z	Mass D	TIC	Num	Quality
1	0.08	214.0894	0.0894	2.0e3	1	89
2	0.10	279.0925	0.0925	5.4e3	1	80
3	0.19	188.1758	0.1758	9.6e2	1	44
4	0.20	198.9401	0.9401	9.9e2	1	58
5	0.20	273.0135	0.0135	3.6e3	1	41
6	0.21	182.9632	0.9632	4.6e2	1	9
7	0.21	189.0617	0.0617	2.8e3	1	66
8	0.21	198.9406	0.9406	4.8e2	1	22
9	0.21	203.0769	0.0769	6.7e3	1	73

Filtering Controls の設定例

- Filtering Controls の Time の下限をドラッグで左右に調整する、あるいはダブルクリックして値（ここでは 3）を入力します。

- 保持時間 3.0 分以降のイオンのみ表示されます

* 左下の取得済の MS/MS 数も変更されます



研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

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

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

AB SCIEX™ is being used under license.

詳細な説明や知的所有権等に関しては付属のマニュアルを必ずご確認ください。

© 2024 K.K. AB SCIEX.