# 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 EF   | PI (Enhanced Product Ion) $\not =  $                               |
| 1.2 ID   | A (Information Dependent Acquisition)                              |
| 1.3 M  | RM-EPI Method 作成方法8  |
| 1.4 M  | RM-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  |
| 2.2 Ar   | alytics による解析 20   |
| 2.2.1.   | 解析メソッドの作成  |
| 2.2.2.   | 結果の確認  |
| 2.3 ラ  | イブラリへのスペクトルの登録   |
| 3 MRN  | 13を用いた定量   |
| 3.1 MS   | S/MS/MS(MS3)を用いた定量について   |
| 3.2 Gi   | ided Optimization - MS <sup>3</sup> Infusion を用いた自動最適化37           |
| 3.2.1.   | Guided Optimization - MS <sup>3</sup> Infusion のメソッド作成工程           |
| 322  | Guided Optimization - MS <sup>3</sup> Infusion(自動最適化プログラム)を Run する |
| 0.2.2.   |  |
| 前の準  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ   | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 MS  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 Mi<br>3.6 Ex  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 MS<br>3.6 Ex<br>3.7 MS  | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 MS<br>3.6 Ex<br>3.7 MS<br>参考資料1   | <ul> <li>備</li></ul>   |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 M<br>3.6 Ex<br>3.7 M<br>参考資料1<br>参考資料2  | <ul> <li>備</li></ul>   |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 Mi<br>3.6 Ex<br>3.7 Mi<br>参考資料1<br>参考資料2<br>参考資料3   | 備  |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 M<br>3.6 Ex<br>3.7 M<br>参考資料1<br>参考資料2<br>参考資料3<br>参考資料4  | <ul> <li>備</li></ul>   |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 M<br>3.6 Ex<br>3.7 M<br>参考資料1<br>参考資料2<br>参考資料3<br>参考資料4<br>参考資料5   | <ul> <li>備</li></ul>   |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 Mi<br>3.6 Ex<br>3.7 Mi<br>参考資料1<br>参考資料2<br>参考資料3<br>参考資料4<br>参考資料5<br>参考資料6  | <ul> <li>備</li></ul>   |
| 前の準<br>3.2.3.<br>3.3 マ<br>3.4 イ<br>3.5 Mi<br>3.6 Ex<br>3.7 Mi<br>参考資料1<br>参考資料2<br>参考資料3<br>参考資料4<br>参考資料5<br>参考資料5  | <ul> <li>備</li></ul>   |
| <ul> <li>前の準</li> <li>3.2.3.</li> <li>3.3 マ</li> <li>3.4 イ</li> <li>3.5 Mi</li> <li>3.6 Ex</li> <li>3.7 Mi</li> <li>参考資資料1</li> <li>参考考資資料2</li> <li>参考考資資料4</li> <li>参考考資資料5</li> <li>参考資資料8</li> </ul> | <ul> <li>備</li></ul>   |

# 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

| 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        |

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

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。

下記の資料をご覧いただき、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。

※ <u>具体的な使用方法</u>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<sup>®</sup> 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

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

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。 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

 $\divideontimes RF1x \ < \ RF \ 2x \ < \ RF3x$ 

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。

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 
 イオン
 Q3の設定電圧

 A+ m/z 100
 RF1x

 B+ m/z 200
 RF2x

 C+ m/z 300
 RF3x

れ、A+のイオンは検出器へ導入されます。A+を検出している時間は、他の *m/z* のイオン B+ や C+ は Q3(LIT)に溜められたままです。

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

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



1.2 IDA (Information Dependent Acquisition)

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

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

MRM-EPI のメソッドは、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。

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

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

また、標準品と実サンプルで観測さ

れたフラグメントパターンを比較することにより目的物の確認ができます。

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

# 1.3 MRM-EPI Method 作成方法

① 既存の MRM のメソッドを開きます。

| Method Overview<br>Device: SCIEX QTrap 4500<br>Ion Source: TurbolonSpray | Method duration  | 15 🗘 min   | Total scan time:  | 0.630 s  |  | Estimated cycles:              | 1429                   |  |
|--|--|--|---|--|--|--------------------------------|------------------------|--|
| Add Experiment  MRM O min - 13 min                                       | Source and Gas Para<br>Ion source gas 1<br>Ion source gas 2  | 50 psi<br>60 psi   | Curtain gas<br>CAD gas  | 35<br>9  | <ul> <li>psi</li> </ul>  | Source temperature             | 350 <sup>©</sup> *C    |  |
| 2 (  | Experiment MRM Polarity Advanced Experiment Se Settling time   | Positive V<br>ttings<br>0 tms  | Spray voltage<br>Pause time   | 5500   | V<br>ms  | Q1 resolution                  | Unit 👻                 |  |
|  | Greeolution           Group         Compct           1         502         502           3         SNZ         SNZ           4         SMZ         SMZ           5         SDMX         SDMX           6         SDMX         SDMX | Unit         C         Q3           wmRM Mode         MRM Mode         MRM           sass(Da)         mass(Da)         mass(Da)           251:200         156:100         22000           265:100         108:100         265:100         92:100           1         31:200         156:200         22:100 | Dwell         DP         E           time (ms)         (V)         00.000         43.0         1           100.000         43.0         1         1         100.000         46.0         1           100.000         46.0         1         1         100.000         51.0         1           100.000         51.0         1         1         1         1         1         1 | P CE (V)<br>0.0 29.0<br>0.0 39.0<br>0.0 37.0<br>0.0 45.0<br>0.0 31.0<br>0.0 35.0 | <b>CXP</b><br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0 |                                |                        |  |
| ② Experin<br>ューの中<br>ます。   | nentのMR.<br>コから Add 1  | Mからプル<br>IDA Criter  | ダウンメ<br>ia を選択  | ニ  | ▼ Ex   | perimer<br><sup>Polarity</sup> | EPI<br>MS <sup>3</sup> | ······································ |
|  | torio le FT  | エネン白巾マ   | トナナ   |  |  | _                              | Add IDA Crite          | eria                                   |

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) | IDA Criteria Small mole     | cule 🔹 |       | <b>[</b> ] | Dynamic background    | subtracti | on     | <sup>-</sup> } (3) | Discrete CE for MS/MS |     |         |
|-----|-----------------------------|--------|-------|------------|-----------------------|-----------|--------|--------------------|-----------------------|-----|---------|
| (2) | Intensity threshold exceeds | 500    | 🗘 cps | )          | Exclude former candio | late ions |        | (4)                |                       |     |         |
|     |                             |        |       |            | Fo                    | or 0      | *<br>* | s                  |                       |     |         |
|     |                             |        |       |            | Afte                  | er 1      | *<br>* | occurrences        |                       |     |         |
|     |                             |        |       |            |                       |           |        |                    |                       |     |         |
|     |                             |        |       |            |                       |           |        |                    |                       |     |         |
|     | Advanced Criteria           |        |       |            |                       |           |        |                    |                       |     |         |
|     | Inclusion List              |        |       |            |                       |           |        |                    | Mass tolerance +/-    | 250 | 📩 💿 mDa |
|     | Exclusion List              |        |       |            |                       |           |        |                    |                       |     | ppm     |

- (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 <u>10(s)、After 1 occurrences</u>: 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 <u>10</u>(s)、After <u>1</u> 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 <u>10</u> (s)、After <u>1</u> 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 | トランシ | ジションの | うち最 | も大きい | Q1 mass | + 5 | の値を入 | 力します。 |
|---|---------|-----|------|-------|-----|------|---------|-----|------|-------|
|---|---------|-----|------|-------|-----|------|---------|-----|------|-------|

| , | Dependent          | EPI 👻           |                |                  |           |             |               |           |        |
|---|--------------------|-----------------|----------------|------------------|-----------|-------------|---------------|-----------|--------|
|   | Polarity           | Positive        | ~              | Spray voltage    | 5500      | <b>\$</b> V | 6 Scan rate   | 10000     | ♥ Da/s |
| 8 | CE spread          | 15              | <b>\$</b> v    | Precursor ion    | 30        | Da          |               |           |        |
|   | Advanced Experim   | ient Settings   |                |                  |           |             |               |           |        |
|   | Settling time      | 0               | 🗘 ms           | Pause time:      | 1.5       | ms          |               |           |        |
| 7 | 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 Impo    | ort from file 5 |                |                  |           |             | 8             |           |        |
|   | Start<br>mass (Da) | ) ma            | op<br>ass (Da) | Scan<br>time (s) | DP<br>(V) |             | EP<br>(V)     | CE<br>(V) |        |
|   | 1 70.000           | 315             | 5.000          | 0.0245           | 60.0      |             | 10.0          | 35.0      | j –    |

- 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。

| ▼ Courc | Source and Cas Parameters |                |                |                       |                 |       |                    |           |
|---------|---------------------------|----------------|----------------|-----------------------|-----------------|-------|--------------------|-----------|
| * Sourc | e and Gas Falan           | leters         |                |                       |                 |       |                    |           |
| lon so  | ource gas 1               | 50             | 🗘 psi          | Curtain gas           | 35              | psi   | Source temperature | 350 🗘 °C  |
| lon so  | ource gas 2               | 60             | 🗘 psi          | CAD gas               | 12              | •     |                    |           |
| *       | CAD 以外の                   | つパラメ-          | ータには           | 、FIA で最適              | 配した値、           | もしくに  | 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 𝕂 Def             | fault 値は 3/     | 50℃を推 | É奨します。             |           |
| 10      | 画面右上の<br>EPI と名言          | の Save<br>前を付け | から Sa<br>けて Me | ive As を選<br>thod を保存 | 択し、MRN<br>Fします。 | vī-   | C                  | • 🖶 💷     |

- 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

|           | <b>Ľ</b> • | 8 | <b>:</b> |
|-----------|------------|---|----------|
| Save      |            |   | î.       |
| Save as   |            |   | - 1      |
| Lock Meth | Save as    |   | - 1      |
| Unlock Me | thod       |   |          |
|           |            |   | - 1      |

MRM-EPI 測定結果にて、MS/MS スペクトルが取得できなかった場合

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

濃度が低いと、質の悪いスペクトルになる、または全くフラグメントイオンが観測されない場合もあります。その場合は、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。

| 装置   | Fixed<br>fill time |
|--|--------------------|
| SCIEX QTRAP® 4500 LC/MS/MS System  | 250                |
| SCIEX QTRAP® <b>5500+</b> LC/MS/MS System<br>SCIEX QTRAP® <b>6500+</b> 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、500msec/10 = 50 msec
  - \* 100 成分の場合は、500msec/100 = 5msec
  - \* 下記の例) 80 成分の場合、500msec/80 = 6.5msec ≒ 5msec
  - \* 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。

| ▼ S | urvey    |             | MRM            | •                       |                 |                    |           |           |           |             |                  |        |
|-----|----------|-------------|----------------|-------------------------|-----------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-------------|------------------|--------|
|     | Polarity |             | P              | Positive 💙              | ]               | Spray voltag       | le        |           | 5500      | <b>\$</b> V |                  |        |
|     | Advanc   | ed Exper    | iment Setting  | IS                      |                 | <i>,</i>           |           |           |           |             |                  |        |
|     | Settling | time        | 0              | ) 🗘                     | ms              | Pause time         |           |           | 2         | 🏮 m         | os Q1 resolution | Unit 💙 |
|     | Q3 resol | lution      | L              | Jnit 👻                  | ]               |                    |           |           |           |             |                  |        |
|     |          |             |                |                         |                 |                    |           |           |           |             |                  |        |
|     | Mass Ta  | able in     | nport          | <ul> <li>MRM</li> </ul> | Mode MRM        |                    | ~         |           |           |             |                  |        |
|     |          |             |                |                         |                 | ,                  |           |           |           |             |                  |        |
|     |          | Group<br>ID | Compound<br>ID | Q1<br>mass (Da)         | Q3<br>mass (Da) | Dwell<br>time (ms) | DP<br>(V) | EP<br>(V) | CE<br>(V) | CXP<br>(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        |                  |        |
|     | *        |             |                |                         |                 | ·                  | <b>,</b>  |           |           |             |                  |        |
|     |          |             |                |                         |                 |                    |           |           |           |             | Ν                |        |



Cycle time, Pause time, Dwell Time  $\succeq l \ddagger$ 

| Dwell Time とは                 | 1 成分を測定する時間(msec)   |
|-------------------------------|---|
|                               | pause between mass range $\mathcal{OCE}_{\circ}$                        |
| Pause time とは                 | 1 成分を測定した後、Q2(コリジョンセル)に残っ<br>たイオンを排出し、次の成分を測定する条件に電圧<br>を切り替える時間(msec)。 |
|                               | Default 値は 5msec。   |
| 1成分について1ポイント測                 |   |
| 上 9 る 0 に 安 9 る 時 间<br>(msec) | = Dwell Time + Pause time   |
|                               | MRM-EPI の場合   |
| Cycle time とは                 | 1 Cycle Time =  |
|                               | MRM $(msec) + EPI(msec) + EPI(msec)$                                    |

- 1.4 MRM-EPI データの解析
  - ① Home 上の Explorer をクリックします。
  - ② Gopen 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 Open IDA Sample ×
    - \* 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。
  - 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。





File



- \* 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



<sup>y</sup> をクリックします。

LibraryView<sup>™</sup> 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。

| 📄 Library Importer                                  |                         |                     |
|---|-------------------------|---------------------|
| Step 1: Select SourceType method Step 2: Choose Col | lumns Step 3: Choose da | ita Step 4: Summary |
| Select the compounds you want to                    | import                  |                     |
| Select All, None                                    |                         | Search              |
| Compound  | Formula                 | CAS 🔼               |
| 1-Naphthylacetic acid                               | C12H10O2                | 86-87-3             |
| 2.4-D   | C8H6CI2O3               | 94-75-7             |
| 2.4-DB  | C10H10Cl2O3             | 94-82-6             |
| 2-Naphthyloxyacetic acid                            | C12H10O3                | 120-23-0            |
| 605 from 605 compounds selected.                    |                         |                     |
| Add to Compound Library None                        |                         |                     |
|   | < <u>B</u> ack          | Next > Cancel       |

※ 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。Marge、Overwite、Keep のいずれかを選択します。

Marge: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。) Overwite: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。

| 👈 Library Importer              |                          |                     |                 | - • •           |
|---------------------------------|--------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| Step 1: SelectSourceType method | Step 2: Choose Columns   | Step 3: Choose data | Step 4: Summary |                 |
| 0                               | 0                        |                     |                 |                 |
| Below are the results from t    | he import. Please review | the conflicts.      |                 |                 |
| 🕀 73 Compounds has been i       | nserted/updated.         |                     |                 | View Added      |
| 0 Compound errors.              |                          |                     |                 | Hide Errors     |
| 62 Compound conflicts.          |                          |                     |                 | Hide Conflict   |
| List of the Conflict(s          | 5)                       |                     |                 |                 |
|                                 |                          | Kana All Original   |                 | i               |
| Merge All                       | Overwrite All            | Reep All Original   |                 |                 |
| 2 4-D                           | C8H6CI2O3                | Comments            | Perolya         | L Keen Original |
| Acephate                        | C4H10NO3PS               | Mero                | e Resolve       | Keep Original   |
| Acetamiprid                     | C10H11CIN4               | Merg                | e Resolve       | Keep Original   |
| Acibenzolar-S-methyl            | C8H6N2OS2                | Merg                | Perolve         | Keep Original   |
|                                 |                          | (1111)              |                 |                 |
|                                 |                          |                     | < <u>B</u> ack  | Einish Cancel   |

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。



| roje | t: SCIEX OSQuad Data_Example Projects     | ✓ Results ✓ Rep                          | orting       | ♥ Views             | •                          | Process Method   | • ×        |
|------|---|--|--------------|---------------------|----------------------------|------------------|------------|
|      |   | Project                                  | t: SCIEX OS  | Quad Data_Example   | Projects                   | <b>~</b>         | Results    |
|      | Projects をクリッ                             | 7] Project                               |              |                     |                            | N OSQuad Dat     | a Evample  |
|      | Default Settings を谨                       | びます.                                     |              |                     | Broi                       | act default cett | ings       |
|      |   |  |              |                     | Drei                       | et cours ours    |            |
|      |   |  |              |                     | Piop                       | ect secure expo  | nt setting |
|      | Quantitativa Process                      | ingでは 士図                                 |              |                     | Enat                       | pie project moo  | плео реа   |
|      | guannianve i focess<br>ナムション 一字旦研ビル       | ling しは、 石凶<br>は田子てマルゴルブル                | め症バ          | Set Project w       | ide defaults f             | or quantitative  | processing |
|      | を<br>多ちに、<br>足里<br>脾りに<br>タリート<br>目的のタリータ | 使用りるノルユリスム                               | く傾久          | Method Def          | aults ———                  |                  |            |
|      | 条件、検重線の条件等                                | を設定します。                                  |              | Signal to           | Noise Algorithm            | Standard Deviat  | ion 💙      |
|      | ※ 各種設定は状況に                                | 応じて変更します。各                               | パラノ          | Integration         | Defaults ——                |                  |            |
|      | ータの詳細は、初                                  | 級定量トレーニングテ                               | キスト          | Integratio          | n Algorithm                | MQ4              | *          |
|      |   |  | нт. <i>а</i> | ▼ Retentio          | n Time (RT) 🛛 —            | 0.70             | Da         |
|      | O SCIEX US So                             | ttware を用いた正重解                           | 灯」の          | Expected            | RT                         | 0.000            | min        |
|      | 項を参照してくだ                                  | さい。                                      |              | RT Half V           | lindow                     | 30.0             | sec        |
|      |   |  |              | Update E            | xpected RT                 | No               | •          |
| (    | Qualitative Processi                      | ng では、下図を参考に                             | 定性解          | ry Rep<br>t→ Rep    | ort Largest Peak           |                  |            |
|      | 析に使用するライブ                                 | ラリサーチや各種パラ                               | メータ          | Minimum             | Peak Width                 | 3                | points     |
|      | ー等を設定します。                                 |  |              | Minimum             | Peak Height                | 100.00           |            |
|      | ※ 久種設定け世況に                                | 広じて亦再します 友                               | īб日 <i>а</i> | S/N Integ           | ration Threshold           | 0                |            |
|      | ※ 石裡成足は八九に                                | 心して友文しより。石                               | ·只口 V        | Gaussian            | Smooth Width               | 1.0              | points     |
|      | 詳細は、次ページ                                  | からの「解析メソッドの                              | )作成          | Noise Per           | centage<br>Subtract Window | 40.0             | %          |
|      | を参照してください                                 | $()_{a}$                                 |              | Peak Spli           | ting                       | 2                | points     |
|      |   | <u> </u>                                 |              | Units & Cali        | bration Default            | s                |            |
|      | [   | Set Project wide defaults for qualitativ | e proces     | sing method para    | meters                     |                  |            |
|      |   | Library Search                           |              |                     |                            |                  |            |
|      |   | Library Search Algorithm                 | Sm           | nart Confirmation S | earch                      |                  | ~          |
|      |   | Results Sorted By                        | Pu           | rity                |                            |                  | ~          |
|      |   | Algorithm Parameters                     |              |                     |                            |                  |            |
|      |   | Precursor Mass Tolerance                 | +/- 0.4      | Da                  |                            |                  |            |
|      |   | Collision Energy                         | +/- 5        | eV                  |                            |                  |            |
|      |   | Retention Time                           | +/- 0.5      | mir                 |                            |                  |            |
|      |   | Fragment Mass Tolerance                  | +/- 0.4      | Da                  |                            |                  |            |
|      |   | Ignore Isotopes In Unknown               |              | Maximal Numb        | er Of Hits 5               |                  | ]          |
|      |   | ✓ Use Polarity                           |              | Intensity Thresh    | old 0.                     | 05               | _          |
|      |   | Use Collision Energy Spread              |              | Minimal Purity      | 1(                         | 0.0              | %          |
|      |   |  |              |                     |                            |                  |            |

#### MRM-IDA-EPI データの解析

### 2.2.1. 解析メソッドの作成

- 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。

| Process New Results  | X   |
|--|---|
| 1. Select batch samples to process   |   |
| Current Location: D:\SCIEX OS Data\SCIEX OS_Quad Data_Example\Data\ Prowse. Available Curre.suffa.wiff Curre | d Data_Example\Data\<br>Selected<br>▲ I MRM-EPI.wiff<br>↓ 100ppb<br>↓ 10ppb |
| 2. Select a processing method  | · _   |
| Browse New Edit  |   |
| 3. Select a comparison sample for Non-targeted workflow  |   |
| <none></none>  | ✓   |
| Process Cancel Help  |   |

- 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。

| Process New Results   | 🗑 Open Method  |
|---|--|
| 1. Select batch samples to process  | Caracteria Caracteria Contraction Methods · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·  |
| Current Location: DASCIEX OS Data SCIEX OS Quad Data, Example/Data<br>Notabilit<br>Selected<br>Orres_uids.weff<br>U blank<br>U b | Organize New folder  It avoities  Date modified  Type  Date modified  Type Date modified  Type Date modified  Type Date modified  Type Date modified  Type D |

#### <新規に解析メソッドを作成する>

 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。
 ※ 字号の7.の解析の提合は、Quantitation にチェックなみわます。

※ 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。

| [MQ4] Untitled Method |   |
|-----------------------|---|
| Workflow •            | Select the workflow and then select a reference sample, if applicable   |
| Components            | Qualitation   |
| Integration           | Quantitation and targeted identification     Non-targeted screening   |
| Library Search        | The second state of the former from the base of the second state of the second state of the second state of the                                       |
| Calculated Columns    | In tecommence on Reterice sample has been automatically selected. Unange the selection only in required. Sample Name MRM-EPL.wilf (sample 1) - 100ppb |
| Flagging Rules        | MRM-EPL.wiff (sample 2) - 10ppb   |
| Advanced              |   |
| Formula Finder        |   |
| Non-targeted Peaks    |   |
|                       |   |
|                       | TIC from MRM-EPI.wiff (sample 2) - 10ppb  |
|                       | 1.5e7<br>1.0e7<br>5.0e6<br>0.0e0<br>0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5<br>Time, min  |
|                       | Save 🖌 Close Help   |

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。

| R | ow | IS Group Name        |  | Precursor (Q1)<br>Mass (Da)  | Fragment (Q3)<br>Mass (Da)   | XIC<br>Width (Da)  | Retention<br>Time Mode   |  |
|---|----|----------------------|--|--|--|--|--|--|
| ١ | 1  |                      |  | 251.2 / 156.1  | 251.21231  | 156.10001  | 0.7  | RT value   |
|   | 2  |                      |  | 265.3 / 92.0   | 265.26443  | 92   | 0.7  | RT value   |
|   | 3  |                      |  | 311.2 / 156.1  | 311.21938  | 156.10001  | 0.7  | RT value   |
|   | R  | Row<br>▶ 1<br>2<br>3 | Row         IS           1         □           2         □           3         □ | Row         IS         Group           1            2            3 | Is         Group         Name           1         _         251.2 / 156.1           2         _         265.3 / 92.0           3         _         311.2 / 156.1 | Is         Group         Name         Precursor (Q1)<br>Mass (Da)           1         1         251.2 / 156.1         251.2 / 21231           2         1         265.3 / 92.0         265.26443           3         1         311.2 / 156.1         311.2 / 938 | Is         Group         Name         Precursor (Q1)<br>Mass (Da)         Fragment (Q3)<br>Mass (Da)           1         1         2         251.2/156.1         251.2/231         156.10001           2         1         265.3/92.0         265.26443         92           3         1         311.2/156.1         311.21938         156.10001 | Is         Group         Name         Precursor (Q1)<br>Mass (Da)         Fragment (Q3)<br>Mass (Da)         XIC<br>Width (Da)           1         1         1         21         251.2 / 156.1         251.2 / 213         156.10001         0.7           2         1         2         251.2 / 156.1         265.2 6443         92         0.7           3         1         311.2 / 156.1         311.2 1938         156.10001         0.7 |

※ 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。

| 251.2 / 156.1 | Integration               |               |            | Î   | 251.2<br>Area: 6 | / 156.1 (2<br>5.668e4, H | 251.2 / 156.1) from 10ppb (MRM-EPI.wiff (sample 2))<br>Height: 6484.025, RT: 2.71 min |
|---------------|---------------------------|---------------|------------|-----|------------------|--------------------------|---|
| 311.2 / 156.1 | Apply peak parameters     | to all of the | components |     | 6000             | 2.71                     |   |
|               | Minimum Peak Width        | 3             | points     |     |                  | 0000                     | 1   |
|               | Minimum Peak Height       | 100.00        | ]          |     |                  | 5000 -                   |   |
|               | S/N Integration Threshold | 3             | ]          |     |                  | 4000                     |   |
|               | Gaussian Smooth Width     | 1.0           | points     |     | % cbs            | 4000 -                   |   |
|               | Noise Percentage          | 40.0          | %          |     | ensity           | 3000 -                   |   |
|               | Baseline Subtract Window  | 0.20          | min        |     | Ē                |                          |   |
|               | Peak Splitting            | 2             | points     |     |                  | 2000 -                   |   |
|               | Retention Time (RT)       |               |            |     |                  | 1000 -                   |   |
|               | Expected RT               | 2.70          | min        | Ŧ   |                  | 0                        |   |
|               |                           |               | Appl       | y ] |                  |                          | 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5<br>Time, min                              |

- 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。

| 【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<br>Algorithm Parameter に基づいて検索。ライブラリでヒットした成分名を<br>[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<br>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<br>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  |  |  |  |  |  |  |

 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。
- 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 FinderScore は設定しません(TripleQuad™/QTRAP®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。



※ Constant…:日本、US 向き、Variable…: EU 向き

※ Training では設定しません。

- ④ Formula Finder の項は、設定しません(TripleQuad™/QTRAP®データは未対応なため)。
- 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。



 B 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。

| Samples   | Components and Groups | I | [MQ4] Re   | ults Table (MRN | 1_IDA_EPI.qsessior | 1)                  |                  |                     |                   |   |  |                                       |                  |          |         |                                 |
|---|-----------------------|---|------------|-----------------|--------------------|---------------------|------------------|---------------------|-------------------|---|--|---------------------------------------|------------------|----------|---------|---------------------------------|
|   | Options 👻             |   | <u>Դ</u> յ | rows Filters    | : 0 🔽 Qualif       | y for Rules Filters |                  | %                   | A 6               | . 📃 As  | ° 📕  | <mark>kC,H,</mark> ⊂ ₹ .              | 386              |          | More    | • 😸 🗙                           |
| 100p  | pb                    |   | Index      | Sample<br>Name  | Sample Type ⊽      | Component<br>Name   | Compound<br>Type | Retention<br>Time ⊽ | Precursor<br>Mass | RT<br>Confi   | Library<br>Confi   | Library Hit 5                         | Library<br>Score | 7 Used ⊽ | Area ⊽  | Retention<br>Time Delta (min) ∀ |
|   | •                     |   | ▶ 1        | 100ppb          | Unknown            | 251.2 / 156.1       | Quantifiers      | 2.68                | 251.212           | <ul> <li>V</li> </ul>   | <ul> <li>V</li> </ul>  | Sulfadiazine [Smart Confirmation]     | 100.000          |          | 5.120e5 | 0.024                           |
|   |                       |   | 2          | 100ppb          | Unknown            | 265.3 / 92.0        | Quantifiers      | 2.99                | 265.264           | ×   | <ul> <li>Image: A set of the set of the</li></ul>  | Sulfamerazine [Smart Confirmation]    | 100.000          |          | 5.011e5 | 0.001                           |
|   |                       |   | 3          | 100ppb          | Unknown            | 311.2 / 156.1       | Quantifiers      | 3.66                | 311.219           | <ul> <li>Image: A set of the set of the</li></ul> | <ul> <li>Image: A second s</li></ul> | Sulfadimethoxine [Smart Confirmation] | 100.000          |          | 7.212e5 | 0.009                           |
| Sample ごとに表示     解析結果       ライブラリサーチの結果     Results Table |                       |   |            |                 |                    |                     |                  |                     | ole               |   |  |                                       |                  |          |         |                                 |

 表示するカ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 はカラムの表示/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。

| Re   | Results Table Display Settings                      |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|------|---|-------------|----------|---------------|---|--|--|--|--|--|--|--|
| Proj | Project: SCIEX OSQuad Data Example                  |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
| Sho  | Show and hide specific columns in the results table |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Column Groups                                       |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Column Groups:                                      |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Air Columns   |             |          | Exporta       |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Column Name   | Visible     | Number F | LIS Supported | ^ |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Accuracy  |             | 0.00     | $\checkmark$  |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Accuracy Acceptance                                 |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Acq. Method Name                                    |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Acquisition Date & Time                             |             | i        | $\checkmark$  |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Actual Concentration                                |             | 0.000    |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Adduct / Charge                                     |             | i        |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Area  |             | 0.000e0  |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Area / Height                                       |             | 0.00     |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Area Ratio  |             | 0.000e0  | $\checkmark$  |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Area Ratio of comparison                            |             | 0.000    |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Asymmetry Factor                                    |             | 0.00     | $\checkmark$  |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Barcode   |             | į –      |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Baseline Delta / Height                             |             | 0.000e0  |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Calculated Concentration                            |             | 0.000    |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Combined Score                                      |             | 0.000    |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Comparison  |             |          |               |   |  |  |  |  |  |  |  |
|      | Component Comment                                   | Ln_         |          |               | ~ |  |  |  |  |  |  |  |
| [    | Save as project defau                               | lt settings | ОК       | Cancel        |   |  |  |  |  |  |  |  |

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。



# <u>陽性の確認</u>

 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。



|                   | %  | A  | A Az C.H.                             |                    | 7      |         | /  |
|-------------------|--|--|---------------------------------------|--------------------|--------|---------|----|
| Precursor<br>Mass | RT<br>Confi  | Library<br>Confi   | Library Hit 🛛 🖓                       | Library<br>Score ⊽ | Used ⊽ | Area ⊽  | Ті |
| 251.212           | <ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>  | <ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>  | Sulfadiazine [Smart Confirmation]     | 98.868             |        | 6.668e4 | 0. |
| 265.264           | <ul> <li>Image: A second s</li></ul> | <ul> <li>Image: A second s</li></ul> | Sulfamerazine [Smart Confirmation]    | 99.148             |        | 1.055e5 | 0. |
| 311.219           | <ul> <li>Image: A start of the start of</li></ul>  | ~  | Sulfadimethoxine [Smart Confirmation] | 100.000            |        | 6.599e5 | 0. |

| %√ ≜√ ≙√                                  | ∕oz ✓  | "с 🗸 | ıllı 🗸                | C_H_ 🗸 🖌     |
|---|--|------|-----------------------|--------------|
| Define a qualifying row:                  |  |      |                       |              |
|   | <b>v</b>   |      | • ; •                 | Library F    |
| 🍾 Ion ratio                               | <ul> <li>Image: A second s</li></ul> |      | · ·                   | e [Smart Co  |
| A Mass error                              | ~  |      |                       | ine [Smart C |
| Frag. mass error                          | ✓  |      | <ul> <li>✓</li> </ul> | hoxine (Sma  |
|   | $\checkmark$   |      | ✓                     |              |
| <sup>14</sup> C Isotope                   | ✓  |      |                       |              |
| Library                                   | $\checkmark$   |      |                       |              |
| <b>C<sub>n</sub>H<sub>n</sub></b> Formula | ✓  |      |                       |              |

※ 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。

🛠 🚽 🗛 🚽 "C 🚽 🛝 🚽 👻

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 こ 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。

| %           | A √  | ♠√////2∞√/°C√/∥∖√/C <sub>n</sub> H <sub>n</sub> | V V 🔽            |              |         | M / More                        |
|-------------|--|---|------------------|--------------|---------|---------------------------------|
| RT<br>Confi | Library<br>Confi   | Library Hit 🛛 🖓                                 | Library<br>Score | Used ⊽       | Area 🗸  | Retention<br>Time Delta (min) 꼬 |
| ~           | <ul> <li>Image: A set of the set of the</li></ul>  | Sulfadiazine [Smart Confirmation]               | 98.868           | $\checkmark$ | 6.668e4 | 0.015                           |
| ~           | <ul> <li>Image: A second s</li></ul> | Sulfamerazine [Smart Confirmation]              | 99.148           |              | 1.055e5 | 0.007                           |
|             |  |   |                  | _            |         |                                 |

 ① 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。

| ▲ Library Search Results |  |                                   |         |             |           |                    |          |        | <b>(</b> |
|--------------------------|--|-----------------------------------|---------|-------------|-----------|--------------------|----------|--------|----------|
|                          |  | Name                              | CAS#    | Formula     | MM (Da)   | Fit                | Rev. Fit | Purity | CE (eV)  |
|                          |  | Sulfadiazine [Smart Confirmation] | 68-35-9 | C10H10N4O2S | 250.05244 | <mark>98.</mark> 9 | 100.0    | 98.9   | 20       |
|                          |  | Sulfadiazine [Smart Confirmation] | 68-35-9 | C10H10N4O2S | 250.05244 | 98.1               | 100.0    | 98.1   | 20       |
| $\sim$                   |  | Sulfadiazine [Smart Confirmation] | 68-35-9 | C10H10N4O2S | 250.05244 | 97.9               | 100.0    | 97.9   | 20       |

① 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 | ple Projects 🔹 | Results •        |
|------------------------------|----------------|------------------|
| て保存します。                      |                | New              |
|                              |                | Open             |
|                              | A A Az         | C Recent results |

Hit

Library

Score

V

Save

Save as...

 ② 必要に応じて Report を作成します。画面上の Reporting > Creat 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。

| Projects              | ▼ Results ▼ Re  | <b>porting</b> •<br>Create report and | Views 👻<br>save Results Table         |
|-----------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                       |   | Export results                        | •                                     |
| Create Report         |   |                                       | X                                     |
| Generate a report usi | ng a predefined template and specified logo           |                                       | Template View                         |
| Template name         | All Peaks Qual  |                                       |                                       |
| Template description  | Report showing Results Table for analytes f<br>style. | or each sample in WYSIW               | C C C C C C C C C C C C C C C C C C C |
| Report format         | Word OPDF OSV O                                       | HTML                                  | Replace Logo View Pages               |

(Recommended for large reports; Report titles will be appended with sample reference)

Create an individual report for each sample

Report title

 (3) 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。



④ 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。
  - 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。



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~ライブラリートレーニングは終了です。

# 3 MRM3 を用いた定量

# この章で学べること

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。

※ 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  $\rightarrow$  q2 Collision Cell: Fragmentation  $\rightarrow$  Q3 (LIT のモード): 2nd Precursor Ion の選択  $\rightarrow$  Fragmentation $\rightarrow$  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<sup>®</sup> LINAC<sup>®</sup> 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<sup>TM</sup>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。
#### <u>MRM3 測定の流れ</u>

## 1. 最適化

## <u>1) インフュージョンによる、MRM<sup>3</sup>(MS<sup>3</sup>) 最適化を実施</u>

1.1 Infusion 最適化の準備 -ピークの確認-

1.2 Guided Optimization - MS<sup>3</sup> Infusion (自動最適化プログラム)の Running

Guided Optimization - MS<sup>3</sup> 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) MRM<sup>3</sup>のパラメータ AF2 値をマニュアルで最適化

作成した MRM<sup>3</sup> 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. MRM<sup>3</sup>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

MS<sup>3</sup>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 - MS<sup>3</sup> Infusion を用いた自動最適化

#### 3.2.1. Guided Optimization - MS<sup>3</sup> 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。
- 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 - MS<sup>3</sup> 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出来 ます。

シリンジポンプを用いて 5~10µL/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。
- 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。

| Metho  | d duration         | 5                 | 🗘 min            | Total scan time: | 0.075 s  | Estimated cycles: | 3995    |        |
|--|--------------------|-------------------|------------------|------------------|----------|-------------------|---------|--------|
|  |                    |                   | 測知               | 定時間              |          |                   |         |        |
| <ul> <li>Source</li> </ul>                     | e and Gas Pa       | rameters —        |                  |                  |          |                   |         |        |
| lon sou  | urce gas 1         | 20                | psi              | Curtain gas      | 32 🗘 psi | Temperature       | 0       | °C     |
| lon sou  | urce gas 2         | 0                 | psi              | CAD gas          | o 🗘      |                   |         |        |
| <ul> <li>Expering</li> <li>Polarity</li> </ul> | ment Q1            | Positive          | •                | Spray voltage    | 5500 🗘 V | Scan rate         | 1000 👻  | ] Da/s |
| Mass 1   | Table Import from  | n file            |                  |                  |          | Sc                | an rate |        |
|  | Start<br>mass (Da) | Stop<br>mass (Da) | Scan<br>time (s) | EP<br>(V)        |          |                   |         |        |
| 1<br>*   | 590.000            | 660.000           | 0.0701           | 10.0             | スキャンする   | 質量範               |         |        |

⑧ Start mass および Stop mass にスキャンする範囲を入力します。Reservine(分子量 608)の場合、Start-Stop には 590 から 660 までを入力します。

|   | MS Method             |  |
|---|-----------------------|--|
| c | New V Open V          |  |
|   | MRM                   |  |
|   | Neutral Loss          |  |
|   | Precursor Ion         |  |
|   | Product Ion           |  |
|   | Q1                    |  |
| = | Q1 MI                 |  |
| Ē | Q3                    |  |
|   | Q3 MI                 |  |
|   | IDA                   |  |
|   | Guided Optimization + |  |
|   |                       |  |

- \* ※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 µL/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ーが入っているので、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 μL/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。

| 2 ()<br>\<br> | Status Panel の Devices の Syringe Pump Modの<br>のアイコン 🔃 をクリックし、Syringe Pum<br>青報を表示させます。  | el Devices<br>SCIEX Triple<br>Syringe Pum  | Quad <sup>™</sup> 7500   |
|---------------|---|--|--|
| 2) S<br>r     | Syringe Diameter にシリンジの内径を、Flow<br>rate に流速を入力します。<br>* 納品時付属の 5 mL ガスタイトシリンジ<br>(TRAJAN 社製)の内径は 10.3 mm です。<br>* 1 mL ガスタイトシリンジ(ハミルトン社製など)でも | Device Control<br>Syringe Diameter:<br>Flow Rate:<br>Flow Rate Unit<br>Verify the values in the F<br>Office Set of Child Wang for<br>Unit field was reset to th<br>Diameter field was chan<br>Start Stop | 10.3mm(5mL)<br>7<br>UL/min<br>Iow Rate and Flow Rate Unit<br>rt. Tha subure in the Flow Rate<br>d default after the Syring<br>ged.<br>Update |
|               |   | Syringe Diameter:<br>Flow Rate:  | 4.61mm(1mL)  |
| R) (          | tant ボタンをクリックトキオ  | Flow Rate Unit Stop  | uL/min 🔹   |
|               | Start ボタンをクリックします。<br>* 測定途中で流速をかえたいときは、Flow rate に流速<br>す。   | Flow Rate Unit<br>Start Starp<br>恵を入力後 Upd   | uL/min ♥<br>Update<br>ate ボタンをクリックし  |

① 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。

| Data Acquisition MS  | Start Store Store Save   |
|--|--|
| TIC from MA-2024-02-09-10-57-17.wiff2 (sample 1) - sample, +Q1 (590 - 660)   | ectrum from MA-2024-02-09-10-57-17.wiff2 (sample 1) - sample; +Q1 (590 - 660) from 3.865 min   |
| 50         0.62         0.61         1.144           1.50         0.62         0.61         1.44           1.50         0.62         0.61         1.44           1.50         0.62         0.62         1.54           1.00         0.62         0.62         1.54           1.00         0.62         0.62         1.54           1.00         0.62         0.63         1.54           1.70         1.70         1.70         1.70           1.32         2.25 2.63 3.12 3.44 3.86         3.83         3.83           0.000         1         2         3         4         5         6         7         6         9 | 11-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7<br>10-7 |
| Time, min  | m/z, Da  |

- 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 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cps (e<sup>7</sup>~e<sup>8</sup> 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。
- ② 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 - MS<sup>3</sup> Infusion による自動最適化

- MS method 画面右上の New > Guided Optimization > MS<sup>3</sup> Infusion を選択します。
- 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 Reservent Unit、609、Positive にします。
- 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 💙     | Compound name   | Reserpine | Expected m/z | 609 🗘 Da              |
| Q1 resolution         | Open 💙         |                 |           |              |                       |
| Enhanced Resolution   | 3              |                 |           |              |                       |
| Scan rate             | 10000 💙 Da/s   | Fixed fill time | 0.5 🗘 ms  |              |                       |
| Optimized Declusterin | ng Potential ④ |                 |           |              |                       |
| Start At              | 20 🗘 V         | Stop At         | 200 🗘 V   | Step Size    | 5 🗘 V                 |
| Enhanced Product Ior  | 5              |                 |           |              |                       |
| Scan rate             | 10000 💙 Da/s   | Product ions    | 5 👻       | Mass range   | 225 🗘 Da to 1000 🗘 Da |
| Fixed fill time       | 1 🔅 ms         | CE              | 40 🗘 V    | CES          | 15 🗘 V                |
| Dynamic fill time     | $\checkmark$   |                 |           |              |                       |
| Multiple Reaction Mo  | nitoring       |                 |           |              |                       |
| Dwell time:           | 50 ms          |                 |           |              |                       |
| MS <sup>3</sup> (6)   |                |                 |           |              |                       |
| Scan rate             | 10000 💙 Da/s   | Fixed fill time | 20 🗘 ms   | Mass range   | 100 🗘 Da to 1000 🗘 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 rage: 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。

|                          | MRM                   |
|--------------------------|-----------------------|
|                          | Neutral Loss          |
|                          | Precursor Ion         |
|                          | Product Ion           |
|                          | Q1                    |
|                          | Q1 MI                 |
|                          | Q3                    |
|                          | Q3 MI                 |
|                          | ER                    |
|                          | EMS                   |
|                          | EPI                   |
|                          | MS <sup>a</sup>       |
|                          | IDA                   |
| MRM Infusion             | Guided Optimization > |
| MRM FIA                  |                       |
| MC <sup>3</sup> Infusion |                       |

⑥ MS<sup>3</sup>の項目では、Scan rate: MS<sup>3</sup>スキャンのスキャンスピード、Mass rage: 3rd precursor (2<sup>nd</sup> 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)



- 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)

| MS Method 🕜 🔤  |  |                                     |  |                  | 🏧 🤗 🔗 Ready  | ? -               |
|--|--|-------------------------------------|--|------------------|--------------|-------------------|
| Lie China Melu Chi   |  |                                     |  | New 👻            | Oper • Views | Advanced          |
| ded Optimization - MS* Infusion  |  |                                     |  |                  |              |                   |
| 1. Preparation     1. Preparation     2. Initial Conditions & Optimization     3. Determine Q1 Ions     4. Optimize Declustering Potential     5. Determine Indicate Inc.  | ы 12/11/2023 12:17:33 РМ                                     |                                     |  | Pages 2 of 2     |              | Open in MS Method |
| S. Optimize Productions     S. Optimize Collision Energies     7. Optimize AF2 Energies  | CIEX MS <sup>3</sup> Compound Op                             | timization                          | December 1<br>PM                         | 1, 2023 12:17:32 |              |                   |
| User:<br>Project   | : SCIEX OS_Quad Data_Example                                 | Instrument:<br>Ion Source:          | SCIEX Triple Quad 5500+<br>TurbolonSpray |                  | H            |                   |
| 10. レポートを保   | od:<br>AS3_397.2.msm   | Acquisition files<br>DASCIEX OS Dat | location:<br>a\SCIEX OS_Quad Data_Examp  | 11. 最適           | 化メソッ         | ドを開く              |
| Resolut<br>Expect<br>Polarity  | Resolution. Open<br>Expected miz: 000 Da<br>Polarity Postive |                                     | 000 Da /s<br>1000 Da /s<br>1000 Da /s    |                  |              |                   |
| Optim  | ilzation Results<br>m/z: 609.2 Da, 1.05E+7 cps               | MS <sup>9</sup> compou              | nd optimization completed successfu      | lly              |              |                   |
| MSINS Fragment 1:         397.2 Da (Loss of 212), 2.4E+6 cps           MS1 Method:         Reserptine_finalMcS3_397.2 msm           Oppinized DP:         100.0           Oppinized CE:         43           Oppinized AP2:         0.12 |  | ps                                  |  |                  |              |                   |
| MS <sup>1</sup> Per  | ak Centroid Mass(Da)   | 2nd Loss                            | Centroid Intensity(cps)                  |                  |              |                   |
| 1 2  | 288.137<br>147.959   | 249.241                             | 1.27E+7<br>1.25E+7                       |                  |              |                   |
| MS/MS  | Fragment 2: 448.2 Da (Loss of 161), 1.49E+6                  | cps                                 |  |                  |              |                   |

- 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。
- ② 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。
- ① Devices の Syringe Pump Model のアイコン III 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      | - MS <sup>3</sup> Infusion | (自動最適化プログラム)  | の結果>  |
|----------------------------|----------------------------|---------------|-------|
| $\sim$ Guidea Optimization | - MS Infusion              | (日勤取週16ノロクノム) | ~ ~ ~ |

| 1.  | ,た測    | 洰    | メソッド   |                       |          |                            |     |
|---|--------|------|--|-----------------------|----------|----------------------------|-----|
| 📙 🛛 🛃 🗧 🖌 Acquisition Me                                | thods  |      |  |                       |          | - 0                        | ×   |
| File Home Share   | View   |      |  |                       |          |                            | ~ 🕐 |
| $\leftarrow \rightarrow \checkmark \uparrow $ > This PC | > DATA | (D:) | → SCIEX OS Data → SCIEX OS_Quad Data_Example | > Acquisition Methods | 5 V      | Search Acquisition Methods | Q   |
| - Quick accord  |        | ^    | Name   | Date modified         | Туре     | Size                       | ^   |
|   |        |      | Reserpine_EPI_CE_Spread_0.msm                | 12/11/2023 12:12      | MSM File | 72 KB                      |     |
| Desktop   |        |      | Reserpine_EPI_CE_Spread_609.2.msm            | 12/11/2023 12:15      | MSM File | 72 KB                      |     |
| 🕂 Downloads   | *      |      | Reserpine_ER_609.msm                         | 12/11/2023 12:14      | MSM File | 72 KB                      |     |
| Documents   | 1      |      | Reserpine_FinalMS3_236.2.msm                 | 12/8/2023 2:01 PM     | MSM File | 52 KB                      |     |
| Pictures  | 1      |      | Reserpine_FinalMS3_236.3.msm                 | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| QT55-015407_AA  |        |      | Reserpine_FinalMS3_365.2.msm                 | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| Quantitation Methods                                    |        |      | Reserpine_FinalMS3_397.2.msm                 | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| Quantitation Methods                                    |        |      | Reserpine_FinalMS3_448.1.msm                 | 12/8/2023 2:01 PM     | MSM File | 52 KB                      |     |
| Quantitation Results                                    |        |      | Reserpine_FinalMS3_448.2.msm                 | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| Quantitation Results                                    |        |      | Reserpine_FinalMS3_577.3.msm                 | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| 💻 This PC   |        |      | Reserpine_FinalOptimalMS3_397.2.msm          | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 52 KB                      |     |
| 🗊 3D Objects  |        |      | Reserpine_MRM_RampCE_609.2.msm               | 12/11/2023 12:16      | MSM File | 76 KB                      |     |
| Desktop   |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_236.2.msm              | 12/8/2023 2:00 PM     | MSM File | 76 KB                      |     |
|   |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_236.3.msm              | 12/11/2023 12:16      | MSM File | 76 KB                      |     |
| Documents   |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_365.2.msm              | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 76 KB                      |     |
| - Downloads   |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_397.2.msm              | 12/11/2023 12:16      | MSM File | 76 KB                      |     |
| Music   |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_448.1.msm              | 12/8/2023 2:00 PM     | MSM File | 76 KB                      |     |
| Pictures  |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_448.2.msm              | 12/11/2023 12:16      | MSM File | 76 KB                      |     |
| Videos  |        |      | Reserpine_MS3_RampAF2_577.3.msm              | 12/11/2023 12:17      | MSM File | 76 KB                      |     |
| 🏪 SYSTEM (C:)   |        | 1    | Reserpine_Q1MI_609.msm                       | 12/11/2023 12:14      | MSM File | 56 KB                      | ~   |
| 41 items  |        |      |  |                       |          |                            |     |

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。

| 🔄 > Ti | his PC > DA | TA (D:) > SCIEX O | S Data > Optimization >   |                    |             | 5 V  | DATA (D:) > SCIEX | OS Data > Optimization > M  | S3Optimization-2024-0 | 2-09-11-04-28 | v Ö    |
|--------|-------------|-------------------|---------------------------|--------------------|-------------|------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|--------|
| :ts    | ^           | Name              | ^                         | Date modified      | Туре        | Size | Name              | ^                           | Date modified         | Туре          | Size   |
|        | - 10        | MS3Optimiz        | ation-2024-02-09-11-04-28 | 2/9/2024 11:04 AM  | File folder |      | Log.txt           |                             | 2/9/2024 11:08 AM     | Text Document | 3 KB   |
| nts    |             | Optimization      | -2022-05-25-09-47-12      | 5/25/2022 9:47 AM  | File folder |      | Reserpine         | EPI_CE_Spread_609.wiff.scan | 2/9/2024 11:06 AM     | SCAN File     | 375 KB |
| ids    |             | Optimization      | -2022-05-25-09-48-31      | 5/25/2022 9:48 AM  | File folder |      | Reserpine         | EPI_CE_Spread_609.wiff2     | 2/9/2024 11:06 AM     | WIFF2 File    | 208 KB |
|        |             | Optimization      | -2023-10-16-17-38-17      | 10/16/2023 5:38 PM | File folder |      | Reserpine         | ER_609.wiff.scan            | 2/9/2024 11:05 AM     | SCAN File     | 181 KB |
|        |             | Optimization      | -2023-10-16-17-39-44      | 10/16/2023 5:39 PM | File folder |      | Reserpine,        | ER_609.wiff2                | 2/9/2024 11:05 AM     | WIFF2 File    | 372 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | 🛁 Reserpine       | FinalOptimalMS3_Report.xps  | 2/9/2024 11:08 AM     | XPS Document  | 375 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MRM_RampCE_609.wiff.scan    | 2/9/2024 11:07 AM     | SCAN File     | 2 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine,        | MRM_RampCE_609.wiff2        | 2/9/2024 11:07 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_236.4_609.wiff  | 2/9/2024 11:08 AM     | SCAN File     | 5 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_236.4_609.wiff2 | 2/9/2024 11:08 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_365.4_609.wiff  | 2/9/2024 11:08 AM     | SCAN File     | 6 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_365.4_609.wiff2 | 2/9/2024 11:08 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_397.5_609.wiff  | 2/9/2024 11:07 AM     | SCAN File     | 11 KB  |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_397.5_609.wiff2 | 2/9/2024 11:07 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_448.5_609.wiff  | 2/9/2024 11:07 AM     | SCAN File     | 5 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_448.5_609.wiff2 | 2/9/2024 11:07 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_577.7_609.wiff  | 2/9/2024 11:08 AM     | SCAN File     | 5 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | MS3_RampAF2_577.7_609.wiff2 | 2/9/2024 11:08 AM     | WIFF2 File    | 216 KB |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine         | Q1M1_RampDp_609.wiff.scan   | 2/9/2024 11:05 AM     | SCAN File     | 1 KB   |
|        |             |                   |                           |                    |             |      | Reserpine,        | Q1M1_RampDp_609.wiff2       | 2/9/2024 11:05 AM     | WIFF2 File    | 180 KB |

# Log.txt :

| 🧾 Log.txt - Notepad                                  |  | - 0                  | ı ×  |                    |
|--|--|----------------------|------|--------------------|
| 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                     | I I St Pred          | curs | sor                |
| [12/11/2023 12:14:22 PM]                             | > Q1 MI 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 6         | 09.2 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                     | 2nd Due              |      |                    |
| [12/11/2023 12:15:37 PM]                             | 250.5 Da, 1E+000 Cps                     | Z <sup>ind</sup> Pre | curs | sor                |
| [12/11/2023 12:15:37 PM]                             | $505.2 \text{ Da}, 11\pm000 \text{ Cps}$ |                      |      |                    |
| [12/11/2023 12:15:39 PM]                             | > MRM scan of 2nd precursors             | と見演                  | ルキ   | もたてに店              |
| [12/11/2023 12:16:06 PM]                             | Optimized CEs for 2nd precursors:        | こ取過                  | IL C | イレ/こしヒ  旦          |
| [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 | E    | きおん ちち ちょうのつ       |
| [12/11/2023 12:16:39 PM]                             | Optimized AF2 = 0.12                     |                      | Ī    | 豆1向11, ご れし/こ1V103 |
| [12/11/2023 12:16:39 PM]                             | Peak 1: 144.28 Da, 1E+007 cps            |                      | - 15 |                    |
| [12/11/2023 12:16:39 PM]                             | Peak 2: 501.055 Da, 12+007 Cps           | 236 3 Do 15,006 cms  | +    | ァニ グ メ いん          |
| [12/11/2023 12:10:41 FN]<br>[12/11/2023 12:16:56 PM] | Optimized AE2 = $0.16$                   | 250.5 ba, 124000 cps |      |                    |
| [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 metho        | ods                  |      |                    |
| [12/11/2023 12:17:31 PM]                             | Reserpine_FinalMS3_397.2                 |                      |      |                    |
| [12/11/2023 12:1/:31 PM]                             | Reserving_FinalMS3_448.2                 |                      |      |                    |
| [12/11/2023 12:1/:31 PM]<br>[12/11/2023 12:17:32 PM] | Recorpting FinalMS2 200.0                |                      |      |                    |
| [12/11/2023 12:17:32 PM]                             | Reserving FinalMS3 577 3                 |                      |      |                    |
| [12/11/2023 12:17:32 PM]                             | Ontimization completed successfully      | v1                   |      |                    |
| [12/11/2023 12:17:33 PM]                             | Refer to Log.txt for optimization        | details.             |      |                    |
|  |  |                      | ~    |                    |
| <  |  |                      | >    |                    |
|  | Windows (CRLF)                           | Ln 1, Col 1 100%     |      |                    |
|  | (citer)                                  |                      | .11  |                    |

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。

| Acquisition   |          |  |  |  |  |
|---------------|----------|--|--|--|--|
| Batch 🗷       |          |  |  |  |  |
| <u></u>       | Queue    |  |  |  |  |
| MS Method 🛛 🗷 | C Method |  |  |  |  |
| -             | MS Tune  |  |  |  |  |

- 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 Pa        | irameters -   |        |                  |          |                      |       |           |
| lon source gas 1         | 20            | 🗘 psi  | Curtain gas      | 20 🗘 psi | Source temperature   | 0     | °C        |
| lon source gas 2         | 0             | 🗘 psi  | CAD gas          | 12       |                      |       |           |
| xperimen MS <sup>3</sup> | •<br>Positive | •      | Spray voltage    | 5500 C V | Scan rate            | 10000 | Da/s      |
| CE spread                | 0             | • v (5 | Precursor ion    | 609 🗘 Da | Second precursor ion | 397.2 | Da        |
| Excitation time          | 25            | ms     | ·                |          |                      |       |           |
| Advanced Experiment      | Settings      |        |                  |          |                      |       |           |
| Settling time            | 0             | 🗘 ms   | Pause time:      | 1.5 ms   |                      |       |           |
| Dynamic fill time        |               |        | Fixed fill time  | 10 🗘 ms  | Step size            | 0.12  | C Da      |
| Q0 trapping              |               |        | Q3 entry barrier | 2 🗘 V    | Q1 resolution        | Unit  | •         |
| Mass Table Import fro    | m file        |        |                  |          |                      |       |           |
| 6<br>Start               |               | itop   | Scan             | DP       | EP                   | CE    | Auxiliary |
| 1 50.000                 | 4             | 00.000 | 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。

| Parameter | AF2 |         | *       |         |     |
|-----------|-----|---------|---------|---------|-----|
| Start at  | 0   | \$<br>V | Step si | ze 0.01 | ۵ ۱ |
| Stop at   | 1   | \$<br>V | L       |         |     |

Start ボタンを押し測定を開始します。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。





 ② 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。



- ② ②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。

- ④ 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。
- 値数の 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。

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

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

備考) カッコ()内は Negative モード時の設定値を表します

<!注意!>------

QTRAP® 5500 LC/MS/MS System

TISの設定温度は最大700度までにしてください

750℃でも使用できますが、ヒーターの寿命が短くなりますので推奨しません。

#### 3.5 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。

#### <u>複数 Experiment による MS3 メソッドの作成</u>

- ① Hardware Configuration の Profile を MS+HPLC のものに変更します。
- 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。
- 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 MS <sup>3</sup> | v                 |                  |          |                      |              |                                     |
|----------------------------|-------------------|------------------|----------|----------------------|--------------|-------------------------------------|
| 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   | 例) 609/397/236の場合                   |
| Excitation time            | 25 🗘 ms           |                  |          |                      |              |                                     |
| Advanced Experiment        | t Settings        |                  |          |                      |              | 2 <sup>nd</sup> Precursor: 397.5    |
| Settling time              | 0 🗘 ms            | Pause time:      | 1.5 ms   |                      |              | CE: 41                              |
| Dynamic fill time          | $\checkmark$      | Fixed fill time  | 10 🗘 ms  | Step size            | 0.12 🗘 Da    | $CE \cdot 41$                       |
| Q0 trapping                |                   | Q3 entry barrier | 2 🗘 V    | Q1 resolution        | Low 👻        | AF2: 0.1                            |
| Mass Table Import fr       | om file           |                  |          |                      |              |                                     |
| Start (Da)                 | Stop              | Scan             | DP       | EP                   | CE           | Auxiliary                           |
| 1 50.000                   | 400.000           | 0.0350           | 155.0    | 10.0                 | 41.0         | 0.100                               |
|                            |                   |                  |          |                      |              |                                     |
| Experiment MS <sup>3</sup> | • •               |                  |          |                      |              |                                     |
| 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   | 例) 609/448/195の場合                   |
| Excitation time            | 25 🗘 ms           |                  |          |                      |              |                                     |
| Advanced Experimen         | at Settings       |                  |          |                      |              | 2 <sup>nd</sup> Precursor: 448      |
| Settling time              | 0 🗘 ms            | Pause time:      | 1.5 ms   |                      |              | CE: 42                              |
| Dynamic fill time          |                   | Fixed fill time  | 10 🗘 ms  | Step size            | 0.12 🗘 Da    | CE: 45                              |
| Q0 trapping                |                   | Q3 entry barrier | 2 🗘 V    | Q1 resolution        | Low 👻        | AF2: 0.12                           |
| Mass Table Import fr       | rom file          |                  |          |                      |              | Paralana (2007) - SARADY das Roccia |
| Start                      | Stop              | Scan             | DP       | EP                   | CE           | Auxiliary                           |
| 1 50.000                   | 400.000           | 0.0350           | 155.0    | 10.0                 | (V)<br>43.0  | 0.120                               |
|                            |                   |                  |          |                      |              |                                     |
| Experiment MS <sup>3</sup> | •                 |                  |          |                      |              |                                     |
| 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   | 例) 609/365/2510) 場合                 |
| Excitation time            | 25 🗘 ms           |                  |          |                      |              | 2 <sup>nd</sup> Precursor: 365      |
| Advanced Experiment        | t Settings        |                  |          |                      |              | 00. 15                              |
| Settling time              | 0 🗘 ms            | Pause time:      | 1.5 ms   |                      |              | CE: 47                              |
| Dynamic fill time          |                   | Fixed fill time  | 10 0 ms  | Step size            | 0.12 📮 Da    | AF2: 0.12                           |
| QU trapping                | -                 | Q3 entry barrier | 2 🗸 V    | Q1 resolution        | Low          |                                     |
| Mass Table Import fr       | om file           |                  |          |                      |              |                                     |
| Start<br>mass (Da)         | Stop<br>mass (Da) | Scan<br>time (s) | DP       | EP<br>(V)            | CE<br>(V)    | Auxiliary<br>frequency 2 (V)        |
| 1 50.000                   | 400.000           | 0.0350           | 155.0    | 10.0                 | 47.0         | 0.120                               |
|                            |                   |                  |          |                      |              |                                     |

- 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。

| Advanced Experiment Setti | ngs |    |                  |      |     |               |      |      |
|---------------------------|-----|----|------------------|------|-----|---------------|------|------|
| Settling time             | 0   | ms | Pause time:      | 1.5  | ms  |               |      |      |
| Dynamic fill time         | ✓   |    | Fixed fill time  | 10 🗳 | ms  | Step size     | 0.12 | 🗘 Da |
| Q0 trapping               |     |    | Q3 entry barrier | 8 🗘  | ) v | Q1 resolution | Low  | -    |

- 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。

| Acquisition |             |
|-------------|-------------|
| Batch 💌     | Queue       |
| ••••••      | LC Method 🔹 |
| MS Method   | MS Tune     |

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のグラジェントや流速の条件を設定します。

| AC P   | ump                           |                 |           | Binary                                  | Gradient   |  |   |  |                                  |
|--|-------------------------------|-----------------|-----------|---|--|--|---|--|----------------------------------|
| itop time: [<br>B.Conc A<br>100<br>80<br>60<br>%<br>40<br>20<br>0 0.00 | 8.00 min<br>Cone<br>1.60 3.20 |                 | 6.40 8.00 | Grad<br>0<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6 | Advanced<br>Time<br>5.00<br>5.50<br>5.60<br>8.00 | Simple<br>Flow<br>0.2000<br>0.2000<br>0.2000<br>0.2000<br>0.2000<br>0.2000 | A.Conc<br>95.0<br>5.0<br>95.0<br>95.0<br>95.0 | B.Conc<br>5.0<br>95.0<br>95.0<br>5.0<br>5.0<br>5.0 | B.Curve<br>0<br>0<br>0<br>0<br>0 |
| How:   | 0.2000 mL/<br>95.0 %          | 'min<br>B.Curve | 0         | Com                                     | pressibility<br>Compressibil<br>pump settir      | settings   |   |  |                                  |
| - Pressure limit<br>Minimum:   | 5.0 MPa                       | Maximum: [      | 60.0 MPa  | Purg<br>1st:<br>2nd                     | ge order<br>d:<br>lnit conc-re                   | ngs<br>Mobile phase r<br>None<br>None<br>placement:                        | name Pu                                       | rge time<br>5 min<br>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。

| Autosampier      |                           |      | Sample rack settings   |  |
|------------------|---------------------------|------|--|--|
| jection settings |                           |      | Specify rack   |  |
| Sampling speed:  | 5.0                       | µL/s |  |  |
| Cooler tempe     | rature: 15                | °C   | Type<br>Rack   | Needle Stroke [mm]   |
| inse settings —  |                           |      | Rack 1.5mL 105 vials   | 52   |
|                  | Before and after aspirati | ion, | Rack 1.5mL 70 vials  | 52   |
| Kinse mode:      | Dip time:0s               | •    | Rack 1mL Cool  | 51   |
| Rinse pump       | Rinse port, then Pump,    | _    | Rack 4mL Cool  | 15   |
| method:          | Time:2s                   |      | Rack MTP 384 Cool  | 45   |
|                  |                           |      | Rack Deep Well 96 Cool   | 40   |
|                  |                           |      | Rack Deep Well 384 Cool  | 40   |
|                  |                           |      | - Injection settings   |  |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim  | 52 mm  |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:  | 52 mm  |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:  | 52 mm<br>ization<br>Off •<br>0.00 min                      |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:<br>Rinse settings  | 52 mm<br>Off •<br>0.00 min                                 |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:<br>Rinse settings<br>Rinsing speed:                                    | 52 mm<br>0ff •<br>0.00 min<br>35 µL/s                      |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:<br>Rinse settings<br>Rinsing speed:<br>Rinse volume:                   | 52 mm<br>0.00 min<br>35 µL/s<br>500 µL                     |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:<br>Rinse settings<br>Rinsing speed:<br>Rinse volume:                   | 52 mm<br>ization<br>Off •<br>0.00 min<br>35 µL/s<br>500 µL |
|                  |                           |      | Injection settings<br>Control vial needle stroke:<br>Acquisition cycle time optim<br>Pretreatment start timing:<br>Pretreatment overlap time:<br>Rinse settings<br>Rinsing speed:<br>Rinse volume:<br>Purge settings | 52 mm<br>0.00 min<br>35 µL/s<br>500 µL                     |

⑤ Oven の条件を設定します。

| AC Column Oven              |      |        |    |   |
|-----------------------------|------|--------|----|---|
|                             |      |        |    | Column Oven                                   |
|                             |      |        |    |   |
| 🗹 Column C                  | lven |        |    | CAdvanced                                     |
| Oven temperature:           |      | 40     | °C | Wait for temperature equilibration before run |
| Temperature limit(Maximum): |      | 90     | °C |   |
| Valve                       |      |        |    |   |
| Valve L:                    | None | None 👻 |    |   |
| Valve R:                    | None | None 👻 |    |   |
| Ready check:                |      | On     |    |   |

⑥注入量の設定を行います。

| Injection Volume | 10.0     | μL   |             |                   |
|------------------|----------|------|-------------|-------------------|
| Binary Gradient  | Autosamp | oler | Column Oven | System Controller |

- 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。

#### <u>MRM3 メソッド作成</u>

- 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 ポント以上のデータポ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。

- 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。



② TICのX軸にある矢印をダブルクリックします。





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。

- 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。



 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。

Project: Training\_MRM3 Projects

- \* 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。

| efault Proj | cts | ▼ R | lesults | •   |
|-------------|-----|-----|---------|-----|
| New         |     |     |         | - t |
| Open        |     |     |         |     |

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。

| Process New Results   | Process New Results  |
|---|--|
| 1. Select batch samples to process Current Location: (C:VAnayt: Data) Topics(Training_MRMAData) Selected  A > 2 Ascending  A > 2 Ascending  Selected  Selected Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected  Selected Selected  Selected  Selected Selected | 1. Sleet batch samples to process          Correct Location: CAAAayla Data/Projects/Istining_MBRUsDat/       Browse         Soft by:       *>2 Ascending         * *>2 Ascending       *         * *> To istining       *         * Bromocriptine_20090510125505       *         * Bromocri |
| 2. Select a processing method Browse New Edit   | 2. Select a processing method Browse New Edt   |
| 3. Select a workspace layout  | 3. Select a workspace layout   |
| Default Browse  | Default Browse   |
| 4. Select a comparison sample for Non-targeted workflow   | 4. Select a comparison sample for Non-targeted workflow  |
| <none></none>   | <none></none>  |
| Process Cancel Help   | Process Cancel Help  |

⑤ 解析メソッドを作成します。

Select a processing method  $\mathcal{O}$  New  $\mathcal{E}$  $\mathcal{O}$  $\mathcal{V}$  $\mathcal{O}$  $\mathcal{V}$  $\mathcal{O}$  $\mathcal{O}$ 

- \* 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。

| [MQ4] Untitled Method | X  |
|-----------------------|--|
| Workflow •            | Select the workflow and then select a reference sample, if applicable  |
| Components            | Quantitation   |
| Integration           | Quantitation and targeted identification Non-targeted screening  |
| Library Search        | The recommended Defense a Samola has been supersticably related. Channe the relation only if require   |
| Calculated Columns    | Sample Name Sample |
| Flagging Rules        | DataSE12.wiff (sample 1) - BL Blank DataSET2.wiff (sample 2) - STD0.01 DataSET2.wiff (sample 2) - STD0.1 Standard DataSET2.wiff (sample 3) - STD0.1 Standard   |
| Advanced              | DataSET2wiff (sample 5) - STD10         Standard           DataSET2.wiff (sample 5) - STD10         Standard   |
| Formula Finder        | DataSET2.wiff (sample 6) - STD100 Standard   |
| Non-targeted Peaks    |  |
|                       | TIC from DataSET2.wiff (sample 4) - STD1<br>3e5<br>2e5<br>1e5<br>0e0<br>1 2 3 4 5 6 7<br>Time, min   |
|                       | Save Print Close Help  |

- 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。

| [MQ4] Untitled Method |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   | X |
|-----------------------|-----|--------|--------|----------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------|-------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|---|
| Workflow              | Sel | ect or | verify | the anal | yte and interna   | l standard names an         | id masses.                 |              |                         |                   |                      |                   |   |
| Components •          |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         | Import            | ♥ Export             | Options           | • |
| Integration           | F   | Row    | IS     | Group    | Name              | Precursor (Q1)<br>Mass (Da) | Fragment (Q3)<br>Mass (Da) | Start - Stop | Retention<br>Time (min) | IS Name           | Experi<br>Ind        | ment<br>ex        |   |
| Library Search 🛛 🚺    |     | 1      |        |          | Internal Standard | 654.2                       | 346                        | 300 - 302    |                         |                   | 2 MS3 of 654.2, 346. | 0 (288.5 - 313.5) |   |
| Coloridated Columna 8 | 12  | 2      |        |          | Analyte           | 609.2                       | 397.1                      | 235 - 237    |                         | Internal Standard | 1 MS3 of 609.2, 397. | 1 (223.6 - 248.6) | ] |
|                       |     | 3      |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   |   |
| Flagging Rules        |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   |   |
| Advanced              |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   |   |
|                       |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   |   |
| Non-targeted Peaks    |     |        |        |          |                   |                             |                            |              |                         |                   |                      |                   |   |
|                       |     |        |        |          |                   |                             |                            |              | Save                    | Print             | Close                | Help              |   |

 \* 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。
- 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。

| [MQ4] Untitled Method | l,  |                               | l l l l l l l l l l l l l l l l l l l                                     |
|-----------------------|---|-------------------------------|---|
| Workflow              | Define a rule   | to flag results in the table. |   |
| Components            |   |                               | Add Rule  |
| Integration           | Apply Rule  | Rule Name                     | Formulas, Columns and Rules Used  |
|                       |   |                               | Columns: Ion Ratio Confidence   |
|                       | <ul> <li>Image: A set of the set of the</li></ul> | Accuracy Acceptance           | Columns: Accuracy   |
| Calculated Columns    | ~   | Concentration Acceptance      | Columns: Calculated Concentration   |
| Flagging Rules        | $\checkmark$  | Integration Acceptance        | Columns: Quality, Asymmetry Factor, Total Width, Retention Time Error (%) |
| Advanced              |   | Qualitative Rules             | Columns:  |
|                       |   |                               |   |
| Formula Finder        |   |                               |   |
| Non-targeted Peaks    |   |                               |   |
| Non-targeted Peaks    |   |                               |   |

| [MQ4] Untitled Method |   |     |      |    |  |  |  |  |  |
|-----------------------|---|-----|------|----|--|--|--|--|--|
| Workflow              | <ul> <li>Accept changes and return to Flagging Rules</li> </ul>       |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Components            | Identify the standards and QCs that are outside of the specifications |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Integration           | Rule name Accuracy Acceptance   |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Library Search        | Maximum tolerance for accuracy:                                       |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Calculated Columns    | Standards at Lower Limit of Quantitation (LLOQ)                       | +/- | 20.0 | %  |  |  |  |  |  |
|                       | Standards   | +/- | 15.0 | %  |  |  |  |  |  |
| Flagging Rules        | V Quality Controls (QC)   | +/- | 15.0 | 70 |  |  |  |  |  |
| Advanced              |   |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Formula Finder        |   |     |      |    |  |  |  |  |  |
| Non-targeted Peaks    |   |     |      |    |  |  |  |  |  |

② 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。

| Process New Results  | X  |
|--|--|
| 1. Select batch samples to process<br>Current Location: C:\Analyst Data\Projects\Training_MR<br>Sort by: A->Z Ascending  | M3\Data\ Browse  |
| Available<br>P a Bromocriptine_20090610130709<br>P a Reserpine_20090610125505  | Selected<br>A DataSET2.wiff<br>W BL<br>W STD0.01<br>STD0.1<br>STD1<br>STD1<br>STD1<br>STD1<br>STD10<br>STD100<br>K |
| 2. Select a processing method<br>C:¥Analyst Data¥Projects¥Training_MRM3¥Quantitat<br>5. Select a workspace layout<br>Default<br>5. Select a comparison sample for Non-targeted | ion Methods¥test.qmethor Browse New Edit<br>Browse<br>workflow   |
| <none></none>  | *  |
|  | Process Cancel Help  |

 (1) 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ください。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

| <i>د</i> ، .                             |          |          |               |               |                     |                      |
|--|----------|----------|---------------|---------------|---------------------|----------------------|
| Options                                  |          | <u>ጉ</u> | 51 🕺 🛔 🛔      | A Az (*       |                     | <b>.</b>             |
| All Components                           |          | Index    | Sample Name 🛛 | Sample Type   | Component<br>Name ⊽ | Actual<br>Concentr ⊽ |
| Internal Standard                        |          | ▶ 2      | BL            | Blank         | Analyte             | N/A                  |
| Internal Standard                        |          | 4        | STD0.01       | Standard      | Analyte             | 0.010                |
|  |          | 6        | STD0.1        | Standard      | Analyte             | 0.100                |
| All Analytes                             |          | 8        | STD1          | Standard      | Analyte             | 1.000                |
| Analyte                                  |          | 10       | STD10         | Standard      | Analyte             | 10.000               |
|  | ~        | 12       | STD100        | Standard      | Analyte             | 100.000              |
| All Components<br>All Internal Standards |          | Index    | Sample Name ▼ | Sample Type ▼ | Component<br>Name   | Actual<br>Concentr ⊽ |
| Internal Standard                        | ין וה    | 1        | BL            | Blank         | Internal Standard   | 1.000                |
|  | <b>1</b> | 3        | STD0.01       | Standard      | Internal Standard   | 1.000                |
|  |          | 5        | STD0.1        | Standard      | Internal Standard   | 1.000                |
| All Analytes                             |          | 7        | STD1          | Standard      | Internal Standard   | 1.000                |
| Analyte                                  |          | 9        | STD10         | Standard      | Internal Standard   | 1.000                |
|  |          | 11       | STD100        | Standard      | Internal Standard   | 1.000                |

 ※ 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)**



Q0 Trapping Resolving Fragmentation Trap & Scan

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

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

- Ion statistics
  - Dwell time at 20,000 Da/s = 6 µs
  - Dwell time at 10,000 Da/s = 12 µs
  - Dwell time at  $1,000 \text{ Da/s} = 50 \text{ }\mu\text{s}$



<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。

| XIC from test_0209.v | viff2 (sample 1 | 0) - reserpi | ne_10ppb_l | CMS_width_ | 3, +MS3 o | f 609.0, 397.5 | (235 - 238)  | 235.0 to 237.    | 0 Da, Gaus  | sian_smoothe  | d (1.0 points | •)  |     |     |     |   |
|----------------------|-----------------|--------------|------------|------------|-----------|----------------|--------------|------------------|-------------|---------------|---------------|-----|-----|-----|-----|---|
| 4e5 -                | Widt            | h 3          |            |            |           |                |              |                  |             | 1 800         |               |     |     |     |     |   |
| 2e5 -                | Peak            | to-Peak      | S/N:       | 126        | 6.6       |                |              |                  |             | 4.090         |               |     |     |     |     |   |
| 0e0                  | 0.5             | 10           | 15         | 20         | 2.5       | 20             | 2.5          | 10               | 45          | 50            | 5.5           | 6.0 | 65  | 70  | 75  |   |
|                      | 0.5             | 1.0          | 1.5        | 2.0        | 2.0       | 3.0            | 3.5          | Time, min        | 4.0         | 5.0           | 5.5           | 0.0 | 0.5 | 7.0 | 7.5 |   |
| XIC from test_0209.v | viff2 (sample 1 | 1) - reserpi | ne_10ppb_l | CMS_width_ | 5, +MS3 o | f 609.0, 397.5 | (234 - 239)  | 235.0 to 237.    | 0 Da, Gaus  | sian smoothe  | d (1.0 points | ;)  |     |     |     |   |
| 4e5 -                | Widt            | h 5          |            |            |           |                |              |                  |             | 4 901         |               |     |     |     |     |   |
| 2e5 -                | Peak            | to-Peak      | S/N:       | 118        | .1        |                |              |                  |             | 1.001         |               |     |     |     |     |   |
| 0e0                  | 0.5             | 10           | 15         | 20         | 2.5       | 30             | 3.5          | 40               | 45          |               | 5.5           | 60  | 65  | 7.0 | 75  | - |
|                      | 0.5             | 1.0          | 1.5        | 2.0        | 2.0       | 3.0            | 3.0          | Time, min        | 4.0         | 5.0           | 5.5           | 0.0 | 0.5 | 7.0 | 7.5 |   |
| XIC from test_0209.v | viff2 (sample 1 | 2) - reserpi | ne_10ppb_l | CMS_width_ | 10, +MS3  | of 609.0, 397. | 5 (231 - 241 | ): 235.0 to 23   | 7.0 Da, Gau | ussian smooth | ed (1.0 poin  | ts) |     |     |     |   |
| 4e5                  | Widt            | h 10         |            |            |           |                |              |                  |             | 1 010         |               |     |     |     |     |   |
| 2e5 -                | Peak            | to-Peak      | S/N:       | 175        | 5.9       |                |              |                  |             | 4.919         |               |     |     |     |     |   |
| 0e0                  |                 |              |            |            |           |                |              |                  |             |               |               |     |     |     |     |   |
|                      | 0.5             | 1.0          | 1.5        | 2.0        | 2.5       | 3.0            | 3.5          | 4.0<br>Time, min | 4.5         | 5.0           | 5.5           | 0.0 | 0.0 | 7.0 | 7.5 |   |
| XIC from test_0209.v | viff2 (sample 1 | 3) - reserpi | ne_10ppb_l | CMS_width_ | 20, +MS3  | of 609.0, 397. | 5 (226 - 246 | i): 235.0 to 23  | 7.0 Da, Gau | ussian smooth | ed (1.0 poin  | ts) |     |     |     | _ |
| 5e5 -                | Widt            | h 20         |            |            |           |                |              |                  |             | 1 002         |               |     |     |     |     |   |
|                      | Peak            | -to-Peak     | S/N:       | 190        | ).7       |                |              |                  |             | 4.902         |               |     |     |     |     |   |
| 0e0                  |                 |              |            |            |           |                |              |                  |             |               |               |     |     |     |     |   |
|                      | 0.5             | 1.0          | 1.5        | 2.0        | 2.5       | 3.0            | 3.5          | 4.0<br>Time, min | 4.5         | 5.0           | 5.5           | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 |   |
| XIC from test_0209.v | viff2 (sample 1 | 4) - reserpi | ne_10ppb_l | CMS_width_ | 30, +MS3  | of 609.0, 397. | 5 (221 - 251 | ): 235.0 to 23   | 7.0 Da, Gau | ussian smooth | ed (1.0 poin  | ts) |     |     |     | _ |
| 5e5                  | Widt            | h 30         |            |            |           |                |              |                  |             | N. an         |               |     |     |     |     |   |
|                      | Peak            | -to-Peak     | S/N:       | 219        | 0.0       |                |              |                  |             | 4.911         |               |     |     |     |     |   |
| 0e0                  |                 |              |            |            |           |                |              |                  |             |               |               |     |     |     | ,   | _ |
|                      | 0.5             | 1.0          | 1.5        | 2.0        | 2.5       | 3.0            | 3.5          | 4.0<br>Time min  | 4.5         | 5.0           | 5.5           | 6.0 | 6.5 | 7.0 | 7.5 |   |

# 参考資料4 LIT にイオンを溜める方法

| Advanced Experiment Settings |                              |                  |    |      |               |           |  |  |  |  |
|------------------------------|------------------------------|------------------|----|------|---------------|-----------|--|--|--|--|
| Settling time 0              | ms                           | Pause time:      | 15 | ms   |               |           |  |  |  |  |
| Dynamic fill time            |                              | Fixed fill time  | 10 | 🗘 ms | Step size     | 0.05 🗘 Da |  |  |  |  |
| Q0 trapping                  |                              | Q3 entry barrier | 8  | 🗘 V  | Q1 resolution | Unit 💙    |  |  |  |  |
|                              |                              |                  |    |      |               |           |  |  |  |  |
| Advanced Experiment Settings | Advanced Experiment Settings |                  |    |      |               |           |  |  |  |  |
| Settling time 0              | 🗘 ms                         | Pause time:      | 15 | ms   |               |           |  |  |  |  |
| Dynamic fill time 🗹          |                              | Fixed fill time  | 20 | 🗘 ms | Step size     | 0.05 🗘 Da |  |  |  |  |
| Q0 trapping                  |                              | Q3 entry barrier | 8  | 🗘 V  | Q1 resolution | Unit 💙    |  |  |  |  |
|                              |                              |                  |    |      |               |           |  |  |  |  |

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 を使用する場合が多いです。

## 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)。



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。

| IDA Criteria Small mole     | cule 💙 |       |                                |   |       |
|-----------------------------|--------|-------|--------------------------------|---|-------|
| Maximum candidate ions      | 1      | 0     | Dynamic background subtraction | Discrete CE for MS/MS (5)   |       |
| Intensity threshold exceeds | 500    | 🗘 cps | Exclude former candidate ions  |   |       |
|                             |        |       | For 0 🗘 s                      | IDA: Discrete CE  | X     |
|                             |        |       | After 1 🗘 occurrent            |   |       |
|                             |        |       |                                | Apply the following discrete collision energy values for IDA meth | iods. |
|                             |        |       |                                | ✓ Collision energy 1 20 🗘 V                                       |       |
| Advanced Criteria           |        |       |                                | ✓ Collision energy 2 35 V   |       |
| Inclusion List              |        |       |                                | Collision energy 3 50 V   |       |
| Exclusion List              |        |       |                                | Save Cancel   |       |

\* 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。

| Add Experiment     |    | Add Experiment * |          | Add Experiment            |
|--------------------|----|------------------|----------|---------------------------|
| Dependent scans: 2 | 57 | Neutral Loss     | <b>5</b> | Dependent scans: 2        |
| 0 min - 1 min      |    | Precursor Ion    |          | 0 min - 1 min             |
|                    |    | Product Ion      |          |                           |
|                    |    | Q1               |          | IDA<br>Dependent scaps: 2 |
|                    |    | Q1 MI            |          | 0 min - 1 min             |
|                    |    | Q3               |          |                           |
|                    |    | Q3 MI            |          |                           |
|                    |    | ER               |          |                           |
|                    |    | EMS              |          |                           |
|                    |    | EPI              |          |                           |
|                    |    | MS <sup>a</sup>  |          |                           |
|                    |    | IDA              |          |                           |

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<br>Device: SCIEX QTRAP 6500+<br>Ion Source: Turbo Spray<br>IonDrive | Method   | d duration   | 15  | min   | Total scan tir   | ne:  | 0.759 s   | 1   |   | Estim  | ated cycles:  | 1186 |       |
|---|--|--|---|---|--|--|---|---|---|--|---------------|------|-------|
| Add Sopermonica St<br>IDA<br>Dependent scans: 1                                     | ▼ Source<br>Ion sou<br>Ion sou                                     | and Gas Pa<br>rrce gas 1<br>rrce gas 2   | 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 50 5  | <ul><li>psi</li><li>psi</li></ul>   | Curtain gas<br>CAD gas   |  | 35  | :   | psi   | Sourc  | e temperature | 350  | \$ °C |
| IDA<br>Dependent scans: 1<br>0 min – 15 min   | ▼ Experir<br>▼ Survey<br>Polarity<br>Advand<br>Settling<br>Q1 reso | r<br>ceed Experiment<br>time<br>solution   | RM V<br>Positive V<br>Settings<br>15<br>Unit V                                  | • <i>ms</i>   | Spray voltag<br>Pause time<br>Q3 resolution                                    | 2  | 5500<br>5<br>Unit                                 | •<br>•<br>•   | V<br>ms   |  |               |      |       |
|   | Mass T<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6                               | Group<br>ID<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SDZ<br>SD | Compound<br>ID<br>SDZ_1<br>SDZ_2<br>SMZ_1<br>SMZ_2<br>SMX_1<br>SDMX_1<br>SDMX_2 | Q1<br>mass (Da)           251.200           255.100           265.100           265.100           311.200 | Q3<br>mass (Da)<br>156.100<br>92.000<br>108.100<br>92.100<br>156.200<br>92.100 | <ul> <li>Dwell<br/>time (ms)</li> <li>5.000</li> <li>5.000</li> <li>5.000</li> <li>5.000</li> <li>5.000</li> </ul> | DP<br>(V)<br>43.0<br>43.0<br>46.0<br>51.0<br>51.0 | EP<br>(V)<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0 | CE<br>(V)<br>29.0<br>39.0<br>37.0<br>45.0<br>31.0<br>35.0 | CXP<br>(V)<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>10.0<br>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。

|     | 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 1  |          |                    |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|-----|---|----------|--------------------|-----------|-----------|----------|------------------|-------------|------|-----------|-----------------------|-------|-------|------|
|     | Method Overview<br>Device: SCIEX QTRAP 6500+<br>Ion Source: Turbo Spray<br>IonDrive | IDA C    | riteria Small m    | olecule 💙 |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     | Add Executional H   | Maxim    | um candidate ions  | 1         | ÷.        | V Dyna   | mic background   | subtraction |      |           | Discrete CE for MS/MS |       |       |      |
| 1   | Add Experiment  | Intensi  | ty threshold excee | ds 500    | Cps       | Exclu    | de former candio | date ions   |      |           |                       |       |       |      |
| i . | IDA<br>Dependent scans: 1   |          |                    |           |           |          | F                | or 0        | Ŷ S  |           |                       |       |       |      |
| L   | 0 min - 15 min  |          |                    |           |           |          | Aft              | er 1        | ÷ 0  | ccurrence |                       |       |       |      |
|     |   |          |                    |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     | IDA   |          |                    |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     | Dependent scans: 1<br>0 min - 15 min  | * Adv    | anced Criteria     |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   | Inc      | lusion List        |           |           |          |                  |             |      |           | Mass tolerance +/-    | 250   | . o m | Da   |
|     |   | Exc      | lusion List        |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       | Ор    | pm   |
|     |   |          |                    |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   |          |                    |           |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   | Depend   | EPI                | ~         |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   | Polarity | /                  | Positive  | ~         | Spray v  | oltage           | 5500        | \$   | v         | Scan rate             | 10000 | *     | Da/s |
|     |   | CE spre  | ad                 | 15        | ≎ v       | Precurs  | or ion           | 30          | * *  | Da        |                       |       |       |      |
|     |   | Advan    | ced Experiment S   | Settings  |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   | Settling | j time             | 15        | 🗘 ms      | Pause t  | time:            | 1.5         |      | ms        |                       |       |       |      |
|     |   | Dynam    | nic fill time      | ~         |           | Fixed fi | ll time          | 10          | * ¥  | ms        | Step size             | 0.12  | \$    | Da   |
|     |   | Q0 traj  | oping              |           |           | Q3 enti  | ry barrier       | 2           | \$   | V         | Q1 resolution         | Unit  | *     |      |
|     |   | Mass 1   | Table Import from  | n file    |           |          |                  |             |      |           |                       |       |       |      |
|     |   |          | Start              |           | Stop      |          | Scan             |             | DP   |           | EP                    | CE    |       |      |
|     |   |          | mass (Da)          |           | mass (Da) |          | time (s)         | _           | (V)  |           | (V)                   | (V)   |       |      |
|     |   | 1        | 50.000             |           | 315.000   |          |                  |             | 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。

| Method Overview <  |                            |                |                        |            |               |       |       |             |       |       |
|--|----------------------------|----------------|------------------------|------------|---------------|-------|-------|-------------|-------|-------|
| Device: SCIEX QTRAP 6500+<br>Ion Source: Turbo Spray<br>IonDrive | • Experi                   | ment IDA       | <b>•</b> –             |            |               |       |       |             |       |       |
| Add Experiment 🛛 👻   | <ul> <li>Survey</li> </ul> | N              |                        |            |               |       |       |             |       |       |
| IDA  | Polarit                    | У              | Negative               | 3          | Spray volta   | ge    | 4500  | ۵ ۱         | /     |       |
| Dependent scans: 1<br>0 min - 15 min                             | Advan                      | ced Experiment | t Settings             |            |               |       |       |             |       |       |
|  | Settling                   | g time         | 15                     | 🗘 ms       | Pause time    |       | 5     | <b>\$</b> 7 | ns    |       |
| IDA  | Q1 res                     | olution        | Unit                   | ~          | Q3 resolution | n     | Unit  |             |       |       |
| Dependent scans: 1<br>0 min = 15 min                             | Mass 1                     | Table Import   | <ul> <li>MR</li> </ul> | M Mode MRM |               | •     |       |             |       |       |
|  |                            | Group          | Compound               | Q1         | Q3            | Dwell | DP    | EP          | CE    | CXP   |
|  | 1                          | SD7 neg        | SDZ 1 neg              | 249 000    | 156 100       | 5.000 | -43.0 | -10.0       | -29.0 | -10.0 |
|  | 2                          | SDZ_neg        | SDZ_1_neg              | 249.000    | 92,000        | 5.000 | -43.0 | -10.0       | -39.0 | -10.0 |
|  | 3                          | SMZ neg        | SMZ 1 neg              | 263.000    | 108.100       | 5.000 | -46.0 | -10.0       | -37.0 | -10.0 |
|  | 4                          | SMZ_neg        | SMZ_2_neg              | 263.000    | 92.100        | 5.000 | -46.0 | -10.0       | -45.0 | -10.0 |
|  | 5                          | SDMX_neg       | SDMX_1_neg             | 309.000    | 156.200       | 5.000 | -51.0 | -10.0       | -31.0 | -10.0 |
|  | 6                          | SDMX_neg       | SDMX_2_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+<br>Ion Source: Turbo Spray | IDA Criteria Small molec     | cule 👻            |                       |                   |                       |              |
| IonDrive   | Maximum candidate ions       | 1                 | Dynamic background    | subtraction       | Discrete CE for MS/MS |              |
| Add Experiment 👻                                     | Intensity threshold exceeds  | 500 🗘 cps         | Exclude former candid | late ions         |                       |              |
| IDA<br>Dependent scaps: 1                            |                              |                   | Fc                    | n 0 🗘 s           |                       |              |
| 0 min - 15 min                                       |                              |                   | Afte                  | r 1 🗘 occurrences |                       |              |
| /  |                              |                   |                       |                   |                       |              |
| IDA<br>Dependent course 1                            |                              |                   |                       |                   |                       |              |
| Omin - 15 min  | Advanced Criteria ——         |                   |                       |                   |                       |              |
|  | Inclusion List               |                   |                       |                   | Mass tolerance +/-    | 250 🗘 💿 mDa  |
|  | Exclusion List               |                   |                       |                   |                       | ppm          |
|  |                              |                   |                       |                   |                       |              |
|  |                              |                   |                       |                   |                       |              |
|  | Dependent     EPI            | <u> </u>          |                       |                   |                       |              |
|  | Polarity                     | Negative 💙        | Spray voltage         | 4500 🗘 V          | Scan rate             | 10000 💙 Da/s |
|  | CE spread                    | 15 🗘 V            | Precursor ion         | 30 🗳 Da           |                       |              |
|  | Advanced Experiment Setti    | ings              |                       |                   |                       |              |
|  | Settling time                | 15 <b>*</b> ms    | Pause time:           | 1.5 ms            |                       |              |
|  | 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  |                   |                       |                   |                       |              |
|  | mass rable import from file. | -                 |                       |                   |                       |              |
|  | Start<br>mass (Da)           | Stop<br>mass (Da) | Scan<br>time (s)      | DP<br>(V)         | EP<br>(V)             | CE<br>(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



### <u>IDA Explorer の縦軸表示の変更</u>

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



#### <u>Filtering Controls と Table タブ</u>

#### **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

| RT               | :   |                     | 0  |  |   |   |   | -0     |            |
|------------------|---|---------------------|--|--|---|---|---|--------|------------|
| m/:              | z:  |                     | ř  |  |   |   |   | _ř     |            |
|                  | _   |                     | ž  |  |   |   |   | ž      |            |
| TIC              | 2:  |                     | $\smile$   |  |   |   |   | -V     |            |
| Qu               | ality:  |                     | 0  |  |   |   |   | -0     |            |
|                  | مرا ام مراجع  | . (%).              | ř.   |  |   |   |   | ň      |            |
|                  | iliched m   | l. [⁄o].            | V  |  |   |   |   | $\neg$ |            |
| Sim              | nilarity:   |                     | 0  |  |   |   |   | -0     |            |
| Ма               | ee De   |                     | 6  |  |   |   |   |        |            |
|                  |   |                     | ~ ~ ~ ~  | тыси   | · / 11  | - h   |   |        | - N        |
|                  | 133 170   | Tabl                | e の谷   | 垠日々  | ミクリ   | ツク  | するこ   | - 2-0  | でン         |
| Del              | fect ir   | Tabl<br>- ト         | e の谷<br>ができ  | 唄日々<br>キオ  | ミクリ   | ツク  | するこ   | - 8-0  | ピン         |
| Del              | fect in   | Tabl<br>ㅡ ト         | e の谷<br>ができ  | 頃日を<br>ます。   | 299   | ツク  | するこ   | - 8 0  | ビン         |
| Del              | fect in<br>tope Pat   | Tabl<br>ᅳ ᅡ         | e の谷<br>ができ<br>□ Filter usin   | 頃日を<br>ます。<br><sup>1g Placence</sup>   | or Tsotope P  | ック<br>Pattern   | するこ   | _ 8 '  | с <i>у</i> |
| Del<br>Isol      | fect in<br>tope Pat   | Tabl<br>ート<br>tern: | e の谷<br>ができ<br>Filter usin   | 頃日を<br>ます。<br><sup>rg Presens</sup>  | or Tsotope F  | ック<br>Pattern   | するこ   | - 2 "  |            |
| Del<br>Isol<br>G | fect in<br>tope Pat   | Tabl                | e の各<br>ができご<br>「Filter usin<br>」 m/z  | 唄日を<br>ます。<br>Mass D   | TIC   | ック<br>Pattern   | するこ<br>Quality  | - 2 '  |            |
| Del<br>Isol<br>G | fect in<br>tope Pat<br>aph Ta<br>ndex                                     | Tabl                | e の各<br>ができ<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894  | 頃日を<br>ます。<br><sup>19 Pleases</sup><br>Mass D<br>0.0894  | TIC   | ック<br>Pattern<br>Num  | りるこ<br>Quality<br>89  |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>aph Ta<br>ndex<br>1<br>2                           | Tabl                | eの各<br>ができご<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925  | 頃日を<br>ます。<br><sup>19 Presenter</sup><br>Mass D<br>0.0894<br>0.0925  | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3   | Pattern   | Quality<br>89<br>80   |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>aph Ta<br>ndex<br>1<br>2<br>3                      | Tabl                | eの合<br>ができ、<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758  | リロク<br>ます。<br>Mass D<br>0.0894<br>0.0925<br>0.1758   | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2  | 9 7<br>Pattern  | Quality<br>89<br>80<br>44                                   |        |            |
| Del<br>Isol<br>G | fect in<br>tope Pat<br>aph Ta<br>ndex<br>1<br>2<br>3<br>4                 | Tabl<br>            | e の各<br>ができ、<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758<br>198.9401   | リーク<br>ます。<br>Mass D<br>0.0894<br>0.0925<br>0.1758<br>0.9401   | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2<br>9.9e2                                     | 9 2<br>Pattern<br>1<br>1<br>1<br>1<br>1   | Quality<br>89<br>80<br>44<br>58                             |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>ndex<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5                      | Tabl<br>            | eの合<br>ができ、<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758<br>198.9401<br>273.0135                                    | 項日 2<br>ます。<br><sup>19</sup> Pre   | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2<br>9.9e2<br>3.6e3                            | Pattern           Num           1           1           1           1           1           1   | Quality<br>89<br>80<br>44<br>58<br>41                       |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>aph Ta<br>ndex<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6       | Tabl                | eの合<br>ができ、<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758<br>198.9401<br>273.0135<br>182.9632                        | 項日 2<br>ます。<br>9 Presents<br>0.0894<br>0.0925<br>0.1758<br>0.9401<br>0.0135<br>0.9632                          | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2<br>9.9e2<br>3.6e3<br>4.6e2                   | Pattern Num 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1   | 9         58           44         58           41         9 |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>aph Tandex<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6<br>7      | Tabl                | e の合<br>ができ<br>Filter usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758<br>198.9401<br>273.0135<br>182.9632<br>189.0617            | 項日 2<br>ます。<br>19 Presents<br>0.0894<br>0.0925<br>0.1758<br>0.9401<br>0.0135<br>0.9632<br>0.0617               | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2<br>9.3e2<br>3.6e3<br>4.6e2<br>2.8e3          | Pattern Num 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1   | Quality<br>89<br>80<br>44<br>58<br>41<br>9<br>66            |        |            |
|                  | fect in<br>tope Pat<br>aph Tandex<br>1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6<br>7<br>8 | Tabl<br>            | eの谷.<br>ができ<br>Fiker usin<br>m/z<br>214.0894<br>279.0925<br>188.1758<br>198.9401<br>273.0135<br>182.9503<br>189.9617<br>198.9406 | 項日 2<br>ます。<br><sup>19</sup> F<br>0.0894<br>0.0925<br>0.1758<br>0.9401<br>0.0135<br>0.9632<br>0.0617<br>0.9406 | TIC<br>2.0e3<br>5.4e3<br>9.6e2<br>9.3e2<br>3.6e3<br>4.6e2<br>2.8e3<br>4.8e2 | Pattern           Num           1           1           1           1           1           1           1           1           1           1           1           1           1           1 | Quality<br>89<br>80<br>44<br>58<br>41<br>9<br>66<br>22      |        |            |

#### <u>Filtering Controls の設定例</u>

 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。



- ② 保持時間 3.0 分以降のイオンのみ表示されます
- Graph Table Time versus TIC Intensity for IDA Dependents Graph Table Time versus TIC Intensity for IDA Dependents 311.20/6.43 311.20/6.40 1.4e9 -1.4e9 + 311.20/6.43 1.3e9 1.3e9 311.20/6.40 1.2e9 1.2e9 311.20/6.43 311.20/6.43 311.20/6.41 311.20/6.43 311.20/6.43 311.20/6.41 1.1e9 1.1e9 1.0e9 1.0e9 9.0e8 9.0e8 311.20/6.40 311.20/6.40 8.0e8 8.0e8 4 • 7.0e8 - 311.20/0.12 6.0e8 - 311.20/0.11 ₽ ₽ 7.0e8 311.20/6.39 6.0e8 311.20/6.39 311.20/6.40 265.10/4.90 -251.20/6.45 311.20/6.40 265.10/4.90 265.10/4.87 251.20/6.45 5.0e8 5.0e8 4.0e8 4.0e8 265.10/4.87 265 10/4 87 3.0e8 3.0e8 265.10/4.88 -311.20/6.38 -311.20/6.38 265.10/4.88 2.0e8 2.0e8 -311.20/6.38 265.10/4.85 -265 10/11 48 1 1.0e8 1.0e8 0.0e0 0.0e0 78 Time, min 10 11 12 13 14 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 Time, min 9 5 4 6 1071 spectra visible 990 of 1071 spectra visible
- \* 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<sup>M</sup> 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。

 $\ensuremath{\mathbb{C}}$  2024 K.K. AB SCIEX.