



ESI-Ion Trap-MS (Burker • HCT/HCT)

一般ユーザーマニュアル

分析計測分野

kikibun@okayama-u.ac.jp

目次

○分析開始の前準備	1
○試料の測定	4
○測定結果の解析	5
○終了操作	7
○参考資料	9
○トラブル発生時の連絡先	12

<設置場所>

自然科学研究科棟 4階 405号室 (内線 8633)

<試料調製について>

(1) 溶媒にはメタノールやアセトニトリルを用いるが、水が5%以上含まれていた方がイオン化しやすい。

★ベンゼンやトルエンやクロロホルムは PEEK チューブを溶かすので、使用する場合は SUS 配管への付け替えが必要。

★ペプチドなどの両性イオンの試料の場合、pH3(ギ酸, アセト系)などとし、positive モードで測定することが多い。

(2) 試料濃度は 10 ug/mL を最高濃度として、10 倍希釈系列で3つほど調製(0.1, 1, 10 µg/mL)し、低濃度のものから測定する。

<持参するもの>

(1) 試料(上記各濃度品;200-1000 uL。MS 室で希釈するなら最高濃度品 100 uL だけでも可)

(2) 希釈用溶媒及び細バイアル(希釈用。MS 室で希釈するなら、1試料あたり3本ほど)

(3) 装置洗浄用アセトニトリル or メタノール (HPLC グレード以上)

(80%メタノール(洗浄用)は測定室に共同利用品あり)

分析開始の前準備

本体電源投入前の「使用申込書・使用報告書」記入

使用簿に、使用者・開始時刻など、必要事項を記入し、以下の「使用前の確認事項」を確認する。

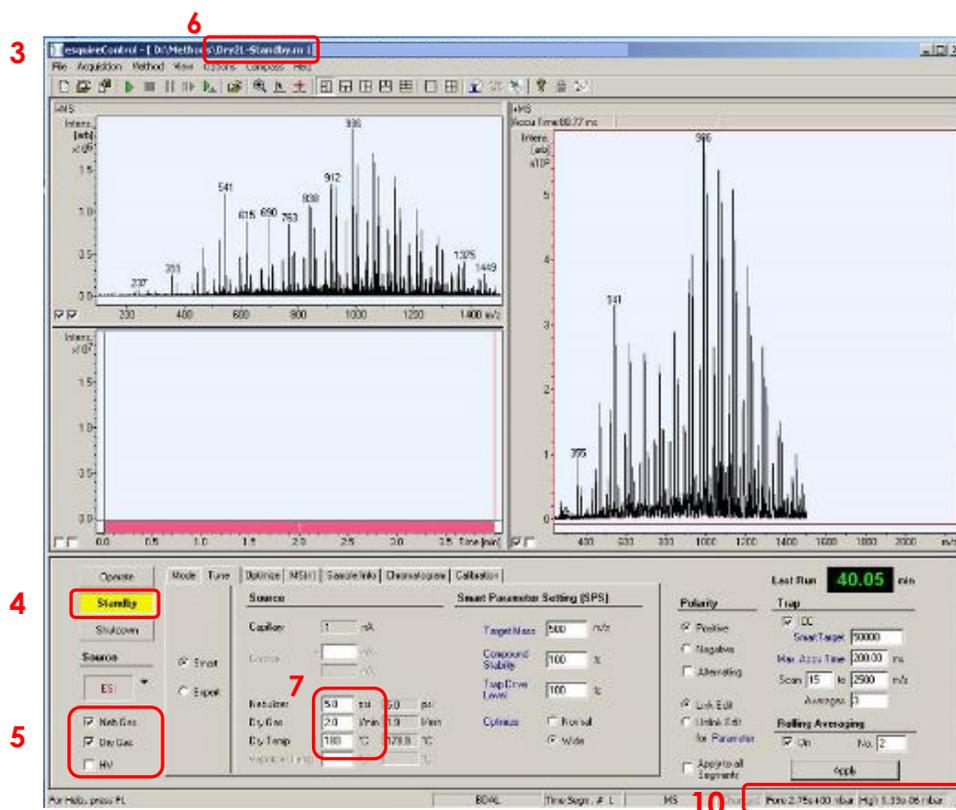
1. 【稼働前のチェック】

★ 下記の項目(チェック表 4)をチェックすること。

1. 室内空調のエアコンは正常に作動しているか(設定 23~25℃)
2. 部屋隅の温度計は正常な範囲(23~28℃)にあるか?
3. Esquire Control は起動しているか
4. Esquire Control 内の「Standby」(黄色)が選択されているか
5. Esquire Control 内の「Neb Gas」「Dry Gas」の欄にチェックが入っているか
6. メソッドファイルとして Dry-2L-Standby.m が呼び出されているか
7. Dry-2L-Standby.m の設定値通り「Neb Gas 5.0 psi, Dry Gas 2.0 L/min, Dry Temp 180℃」となっているか
8. 窒素ガス発生装置の Flow 値は正常(2.2~5.0 L/min)か
9. 窒素ガス発生装置の Pressure 値は正常(0.550-0.603 Mpa)か
10. 真空度は正常か(Fore: 2 mbar 程度、High: 9×10^{-6} mbar 程度)



窒素ガス発生装置の Flow 値は micrOTOF 測定時には、その測定条件の値が加算された値になります。

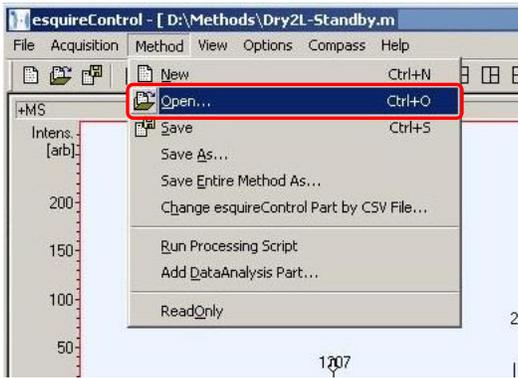


The screenshot shows the Esquire Control software interface. The top window displays two mass spectra plots. The bottom window shows the instrument settings. Red boxes and numbers 3 through 10 highlight specific settings and status indicators:

- 3: The method name 'Dry-2L-Standby.m' in the top window.
- 4: The 'Standby' mode selected in the 'Mode' dropdown.
- 5: The 'Neb Gas' and 'Dry Gas' checkboxes checked in the 'Sources' section.
- 6: The 'Neb Gas' value of 5.0 psi.
- 7: The 'Dry Gas' value of 2.0 L/min.
- 8: The 'Dry Temp' value of 180 °C.
- 9: The 'Pressure' value of 0.550 Mpa.
- 10: The 'Fore' vacuum value of 2.75400 mbar.

2. 【測定前状態の確認】

Method メニュー → open をクリック



基本 Method (DEF_MS.m)を呼び出す。

シリンジを洗浄し、ESI 用 TuningMix (20 倍アセトニトリル希釈液)をセットする。

Operate をクリックし、MS スペクトルが表示されることを確認する。

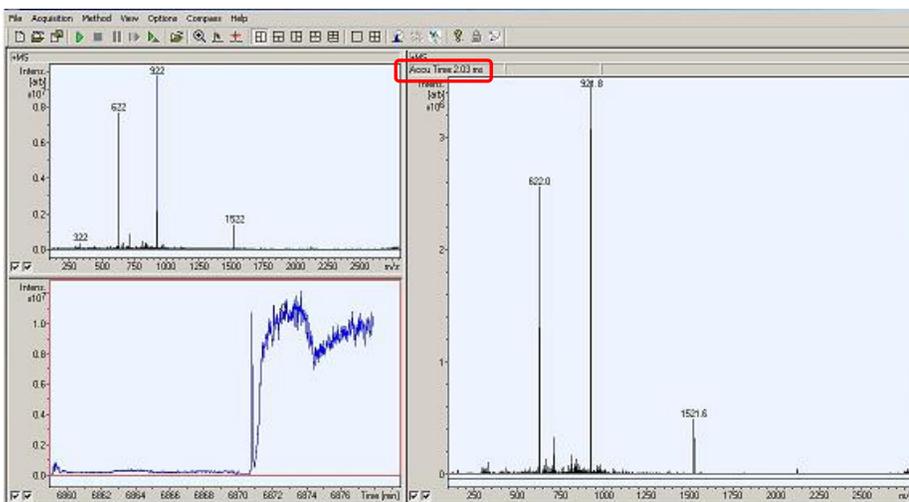
(Operate が緑色になる)



シリンジ流速: 180 μ l/h

DEF_MS.m はドライガス温度の設定値が 300°C と高めの設定になっています。(測定時は 250~300°C での設定が通常です。)

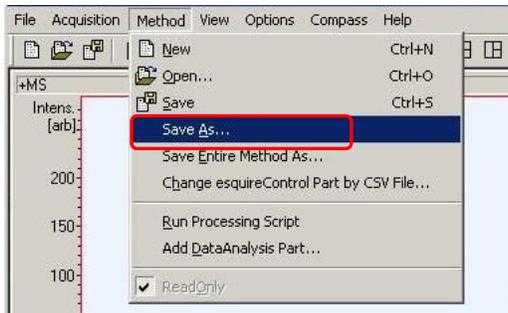
しばらくして、DryGas が 300°C になり、クロマトが安定したら、Acc Time の測定前の値を利用ノートに記録する。(正常範囲: 2-3ms)



3. 【測定用 Method の呼び出し】

以下に示した標準 Method を呼び出し、

選択した Method をコピーして研究室用の Method として名前を付けて保存する。



★ 標準Methodそのものは使用しない。

それをコピーしたもの、あるいはコピーを自分用にカスタマイズしたものを Methodフォルダ内に自分の名前フォルダを作って格納し、それを使うようにする。

<標準 Method>

ポジティブイオンモード: 20160113_Mw50-1000_pos.m

ネガティブイオンモード: 20160113_Mw15-1000_neg.m

2 回目以降、同じ条件の Method を使用する際は、コピーした研究室用の Method を読み込んで使用する。

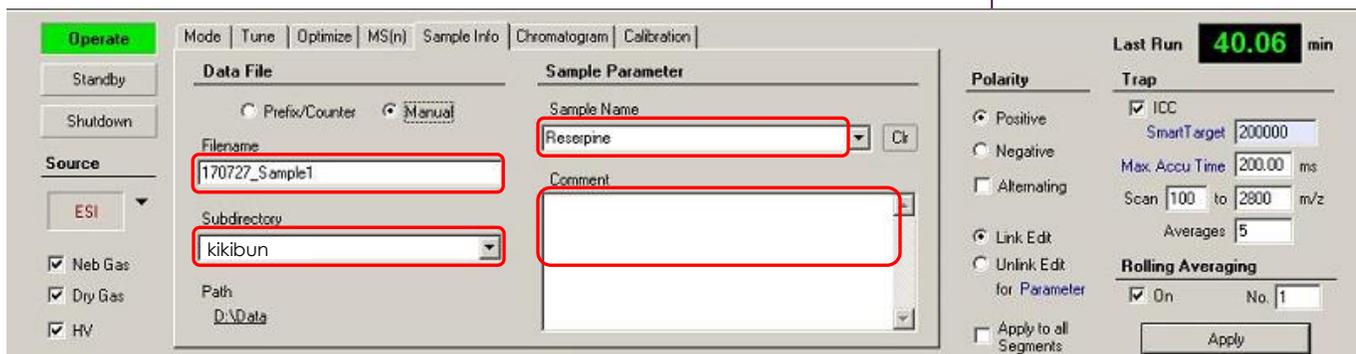
注意:

- Default Method の上書き禁止!
- 使用 Method は、各研究室フォルダに save しておくこと

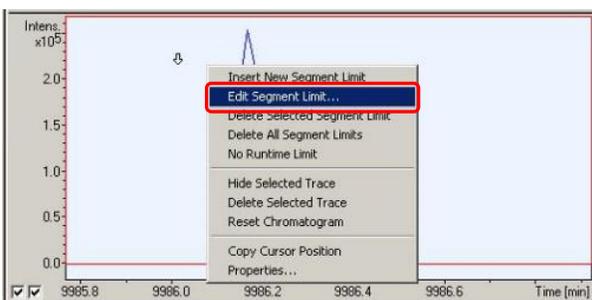
【試料測定】 MS 測定

Sample Info のタブにサンプル情報を入力する。

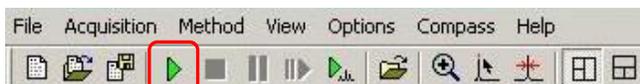
(MSMS 測定の設定については、
参考資料に記載)



1. Data File の Filename, Subdirectory(保存先)を入力、選択する。
各自研究室フォルダに保存する。(Path は D:/DATA/のまま変更しない。)
2. Sample Parameter に試料情報を入力することも可能。
3. 測定時間を入力する。
クロマト内で右クリックし、「Edit Segment Limit」をクリックし、測定時間を入力して、「OK」をクリックする。



4. ▶ ボタンをクリックして、測定をスタートする。
(「Operate」「PC」「MS」が青色になる)



5. 設定時間が経過すると自動的に取り込みが終了する。
(設定時間前に中断する時は、■ ボタンをクリックする。)



【データ解析】 (解析例)

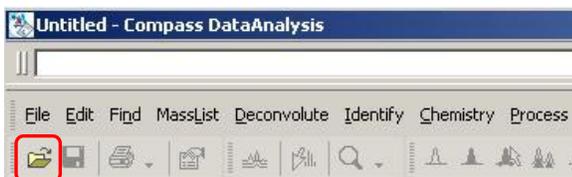
解析中は溶媒を流して洗浄する。

MS は Standby にしておく (HV は消え、Nebulizer はついている)。

1. 画面下に最小化してある解析ソフト (Compass Data Analysis) をクリックして画面を開く。



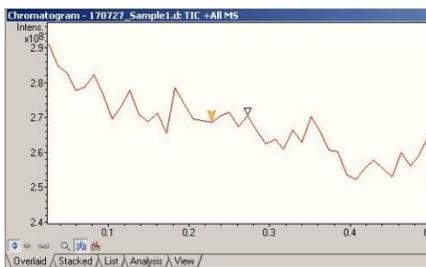
2. 解析したいファイルを開く。



3. MS スペクトルの確認

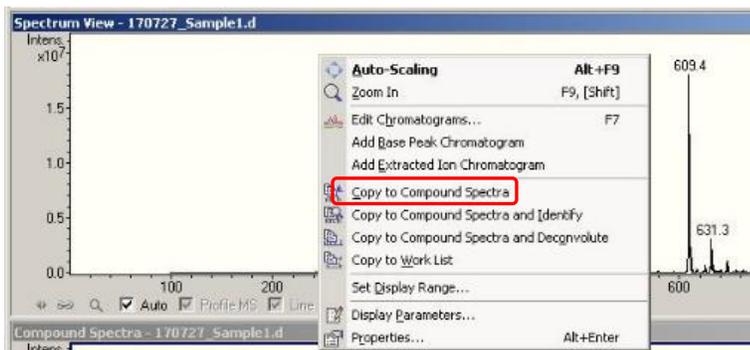


矢印のあるアイコンをクリックし、クロマト上で、クリックすると中段に MS スペクトルが表示される。(右ドラッグで範囲指定することも可能)



4. MS スペクトルの保存

表示させた中段の MS スペクトル上で右クリックし、「copy to compound」で下段にコピーされる。



5. 印刷

Print 設定で、印刷(Canon LBP3300)か PDF(PrimoPDF)を選択し、
希望の Layout 形式があれば選択して、印刷または、PDF で保存する。

(Layout 例)

General Display Report (Display で表示させている内容)

Mass Spectrum SmartFormula Report (組成式推定結果)

Acquisition Parameter Report (測定条件)



6. ソフトウェアの最小化

解析終了後、ソフトウェアは画面下に最小化しておく。

終了操作

【終了前状態の確認とイオン源の洗浄】

1. 基本 Method (DEF_MS.m)を呼び出す。

シリンジを洗浄し、ESI 用 TuningMix (20 倍アセトニトリル希釈液)をセットする。
Operate をクリックし、しばらくして、DryGas が 300°Cになり、クロマトが安定したら、Acc Time の測定後の値を利用ノートに記録する。(正常範囲: 2-3ms)

記録した後、シリンジを洗浄し、洗浄用溶媒を流して TuningMix 由来のピークが消え、イオン量が低い値で落ち着くのを TIC で確認する。

送液を止めて、standby をクリックする。

2. スタンバイ method の読み込み

esquire Control 画面で Method → open → 「Dry2L-Standby.m」を開く。

(MS は standby 状態。「Neb Gas」「Dry Gas」は on で「HV」は off)

3. イオン源の洗浄

イオン源右側面のレバーを奥方向に倒し、イオン源を開ける。

ネブライザーニードルの下にキムワイプを置き、洗浄したシリンジを用いて、洗浄用溶媒をイオン源に手押しで送液する。この操作を 2 回程行う。

溶媒を湿らせたキムワイプでスプレーシールド表面を拭き、イオン源を閉じる。

スプレーシールドの表面に汚れが残るようなら、監守者に連絡する。

4. シリンジポンプの電源を OFF にする。

【装置状態の確認】

★ 下記の項目(チェック表 4)をチェックする。

1. 配管チューブ・イオン源の洗浄は行ったか
2. メソッドファイルとして Dry-2L-Standby.m を呼び出したか
3. 2.の設定通り「Neb Gas 5.0 psi,Dry Gas 2.0 L/min, Dry Temp 180°C」となっているか
4. Esquire Control 内の「Standby」(黄色)が選択されているか
5. Esquire Control 内の「Neb Gas」「Dry Gas」の欄にチェックが入っているか
6. 真空度は正常か
7. 窒素ガス発生装置の Flow 値は正常(2.2~5.0 L/min)か
8. 窒素ガス発生装置の Pressure 値は正常(0.550-0.603 Mpa)か
9. シリンジ(or LC カラム)・溶媒類は適切に片付けたか
10. インフュージョンポンプ(or LC システム)は OFF にしたか
11. プリンター・PC ディスプレイは OFF にしたか

異常な点・気がついた点等あればメモをする

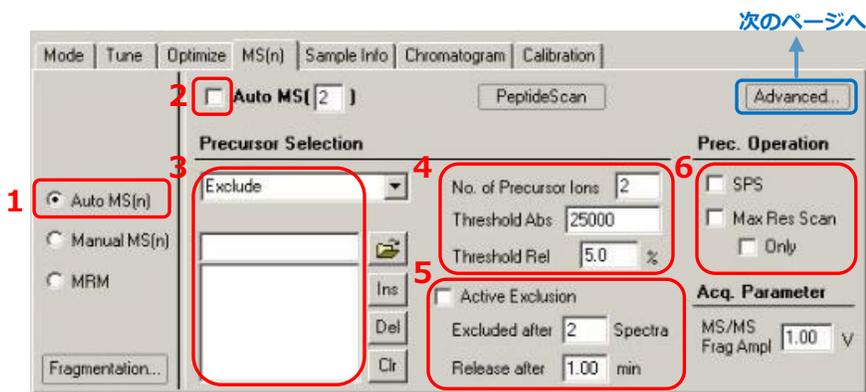
参考資料

MS (n)測定の場合、以下に詳細を示した。

「MS(n)」のタブをひらく。

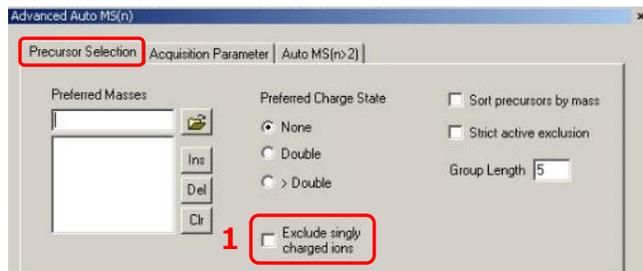
【 AutoMS(n) 】

1. 左側で AutoMS(n)を選択する
2. チェックを入れたら動作開始
3. Include: 親イオンとして認識する質量範囲の指定
Exclude: 除外する質量範囲の指定
MS List: 親イオンを指定、もしくは質量範囲を指定 (例;740、300-1500)
4. No. of Precursor Ions: 一つの MS から選択する親イオンの個数
Threshold Abs: MS 縦軸の強度より親イオンとする閾値を設定
Threshold Rel: デフォルト「5%」のまま
5. 自動削除の設定
Active Exclusion: 一定回数、親イオンを MS(n)測定したら、再び MS(n)測定を行わない
Excluded after ■ Spectra: ■回数を測定
Release after ● min: ●分後以降は再測定
6. SPS: 親イオンの質量に最適化
Max Res Scan: 親イオン選択後、高分解能モードで測定

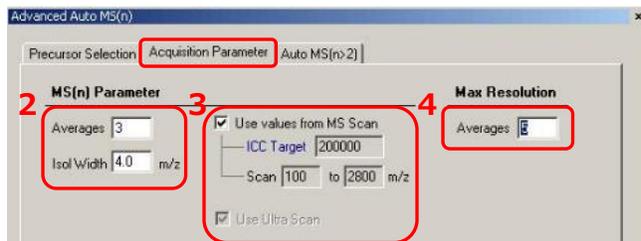


Advanced をクリックすると、以下の項目が設定できる。

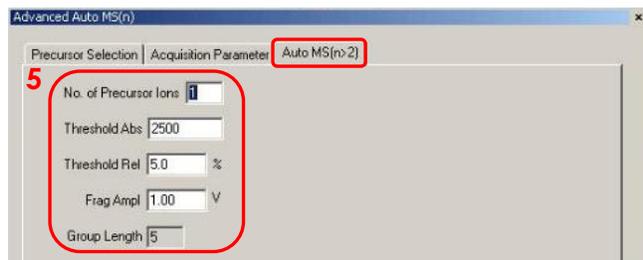
1. 同位体の質量差から一価と判断したピークに対して MS/MS を行わない場合はチェックを入れる。



2. MS(n) Avg.: MS(n)の積算回数
MS(n) Isol Width: Isolationしたい質量に対して質量幅を設定
3. MS/MS のみの設定
Use values from MS Scan: チェックを入れると前頁の設定値を使用
ICC: 前頁と同様
Scan: 前頁と同様
Use Ultra Scan: チェックを入れると MS/MS 測定のみ対応
4. Max Res Scan Avg.: Max Res Scan の積算回数

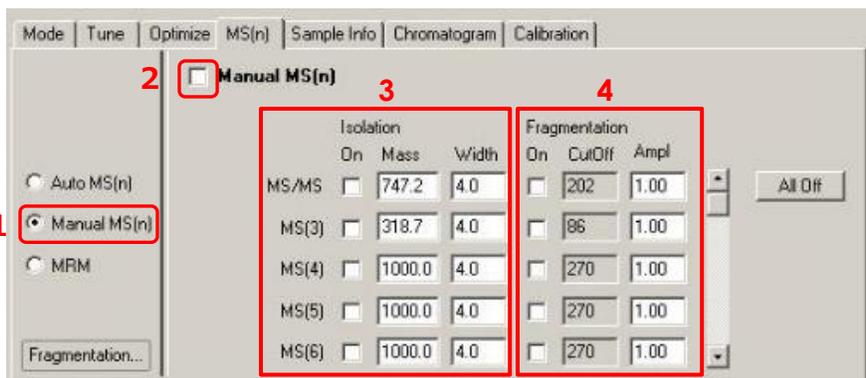


5. MS3 以降の設定
No. of Precursor Ions: 一つの MS から選択する親イオンの個数
Threshold Abs: MS 縦軸の強度より親イオンとする閾値を設定
Threshold Rel: デフォルト「5%」のまま



【 Manual MS(n) 】

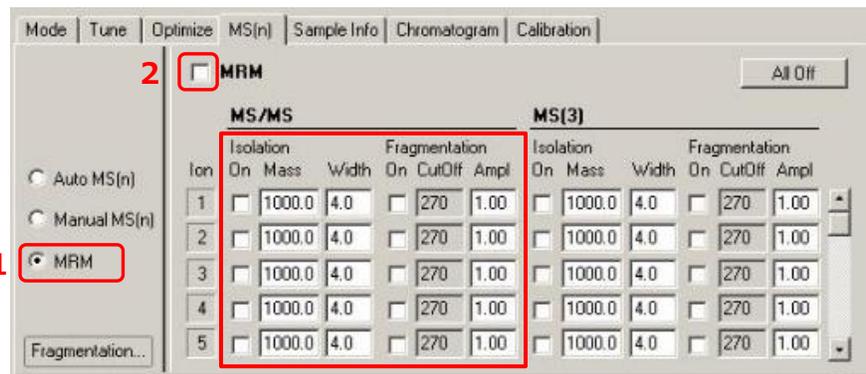
1. 左側で Manual MS(n)を選択する
2. チェックを入れたら動作開始
3. 「Isolation」
On: Isolation を実行するためにチェックを入れる
Mass: Isolation をしたい質量を入力
Width: Isolation したい質量に対して質量幅を入力（通常は「4.0」を設定）
4. 「Fragmentation」
On: Fragmentation を実行するためにチェックを入れる
CutOff: CutOff の設定（自動的に親イオンに依存して決定）
Ampl: Fragmentation のエネルギー（通常は「1.0」を入力）



【 MRM 】

「MRM」測定モードでは、MS/MS または MS3 での測定が可能になります。
Manual MS(n)では一つの親イオンに対して MS(n)測定を行いました、MRM 測定では、複数の親イオンに対して MS3 までの測定が可能になります。

1. 左側で MRM を選択する
2. チェックを入れたら動作開始
3. 「Isolation」、「Fragmentation」
Manual MS(n)と同様



トラブル発生時の連絡先

故障時には、機器管理責任者と所属研究室の指導教員へまず連絡して下さい。

装置の不具合、ご不明な点等ございましたら以下にご連絡をお願い致します。

機器管理責任者：仁戸田 照彦（内 8291）

岡山大学大学院環境生命科学研究科（農学系）