



# ESI-TOF-MS (Burker・micrOTOF)

一般ユーザーマニュアル

分析計測分野

kikibun@okayama-u.ac.jp

# 目次

○分析機器の構成	1
○分析開始の前準備	2
○試料の測定	5
○測定結果の解析	7
○終了操作	10
○参考資料	11
○トラブル発生時の連絡先	16

## <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 µg/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。
  - ★Peak intensity  $10^4$ - $10^5$  程度が適している。 $10^6$  オーダーになると、ハイマスが合いにくくなる。

## <持参するもの>

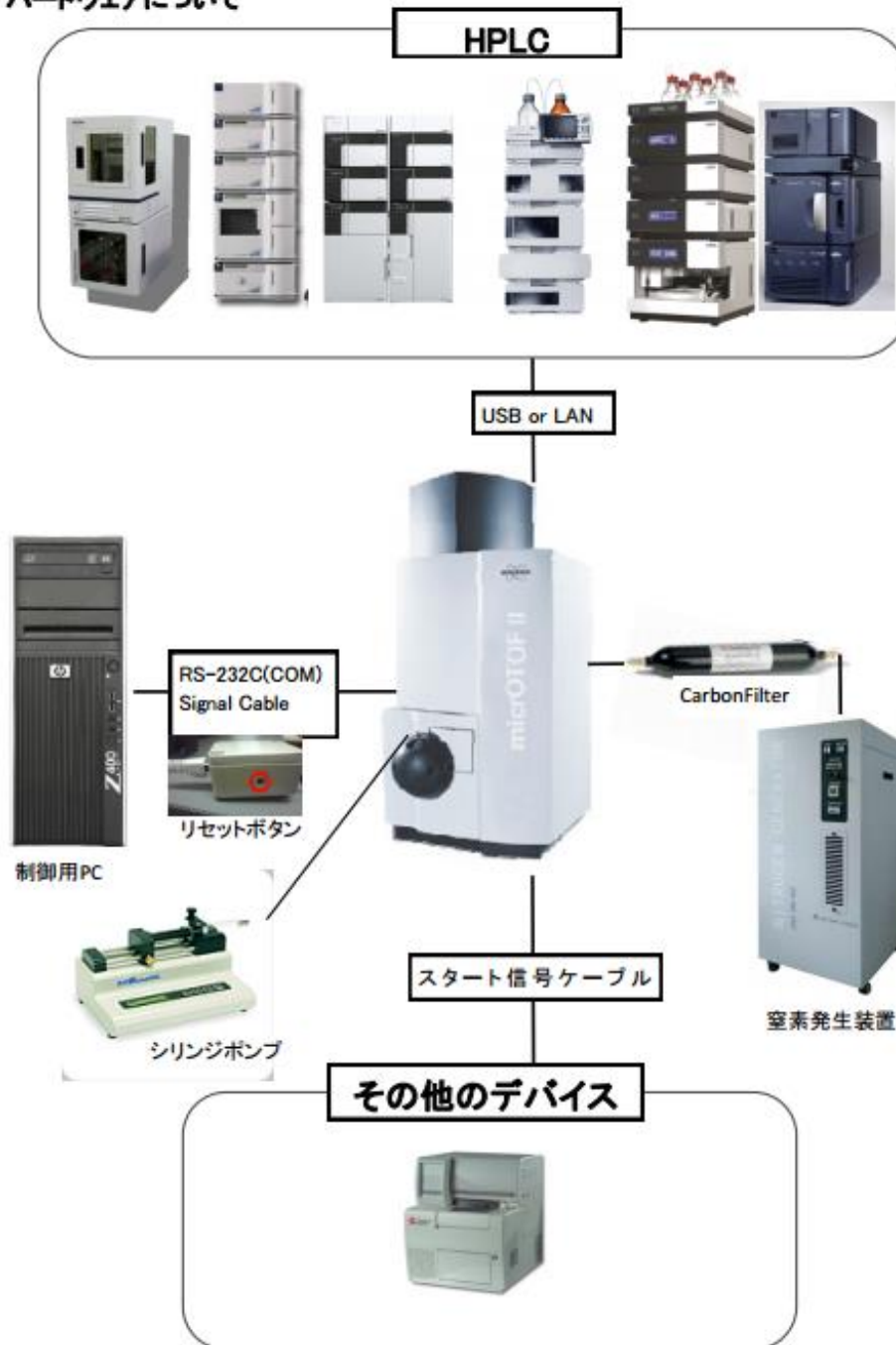
- (1) 試料(上記各濃度品;200-1000 uL。MS 室で希釈するなら最高濃度品 100 uL だけでも可)
- (2) 希釈用溶媒及び細バイアル(希釈用。MS 室で希釈するなら、1試料あたり3本ほど)
- (3) 3.5 mM ギ酸ナトリウム in 5-50% H<sub>2</sub>O-MeOH or MeCN(キャリブレーション用 m/z 100-1,000 程度)  
(Tune mix は m/z 2,700 程度まで, CsI は m/z 10,000 まで)
- (4) 装置洗浄用アセトニトリル or メタノール (質量分析グレード品)

(3.5 mM ギ酸ナトリウム in 50% H<sub>2</sub>O-MeOH、80%メタノール(洗浄用)は測定室に共同利用品あり)

# 分析機器の構成

## 1. 装置の構成

### 1-1. ハードウェアについて



# 分析開始の前準備

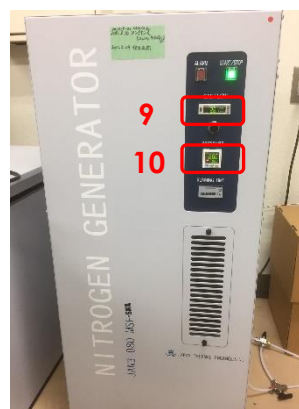
## 本体電源投入前の「使用申込書・使用報告書」記入

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℃)  
換気扇を ON にする
2. 部屋隅の温度計は正常な範囲(23~28℃)にあるか?
3. MicroTOF Control は起動しているか
4. MicroTOF Control 内の「Standby」(黄色)が選択されているか
5. MicroTOF Control 内の「PC」「MS」はグリーンになっているか
6. MicroTOF Control 内の「Neb Gas」「Dry Gas」欄にチェックが入っているか
7. メソッドファイルとして esi-standby.m が呼び出されているか
8. esi-standby.m の設定値通り「Neb Gas 0.4 Bar, Dry Gas 1.5 L/min, Dry Temp 180℃」となっているか
9. 窒素ガス発生装置の Flow 値は正常(2.2~5.0 L/min)か
10. 窒素ガス発生装置の Pressure 値は正常(0.550-0.605 Mpa)か
11. 真空度は正常か (High: 1e-06mbar 以下, Fore: 3e+00mbar 程度)
12. MicroTOF Control 内の「Operate」(緑色)を選択するとピークが検出されて



測定開始後に確認、記入する

3 [esi\_standby.m]

4 Standby

5 PC MS

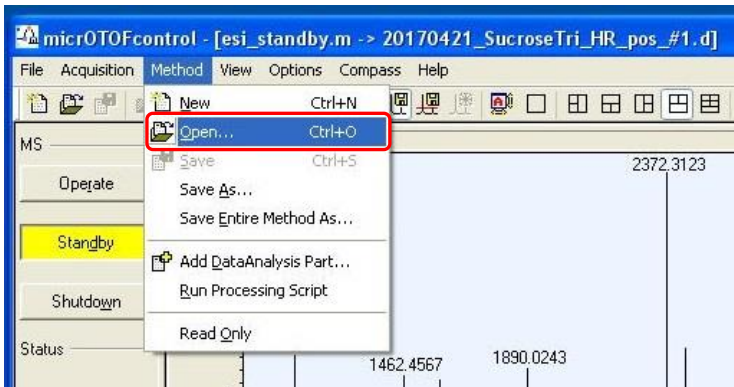
6  Nebulizer Gas  
 Dry Gas  
 HV

8 Nebulizer 0.4 Bar, Dry Gas 1.5 l/min, Dry Temp 180 °C

High 5.08e-07 mbar Fore 2.78e+00 mbar

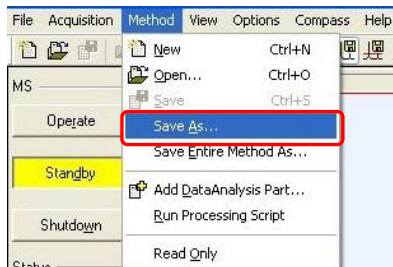
## 2. 【Method の呼び出し】

Method メニュー → open をクリック



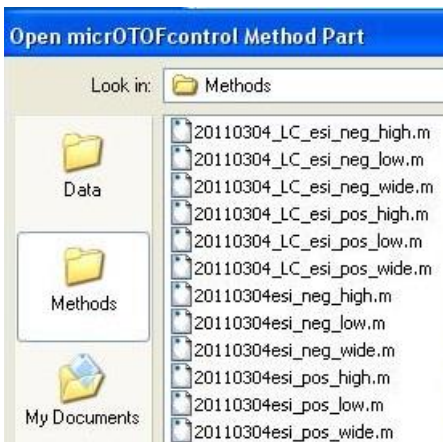
基本 Method の中から目的に応じた分子量範囲の Method を選択する。

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。



★ 装置設置時に作成された基本Methodファイル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。（ファイル名 "20100128esi\_pos\_low.m" など）



\* 基本 Method は目的に応じた分子量範囲のメソッドを選択する。表記の分子量は目安なので、これを元に、使用目的に応じたパラメータ変更を行う。

### ポジティブイオンモード

- esi\_pos\_low (m/z: 100-1000)
- esi\_pos\_wide (m/z: 300-2000)
- esi\_pos\_high (m/z: 1000-3000)

### ネガティブイオンモード

- esi\_neg\_low (m/z: 100-1000)
- esi\_neg\_wide (m/z: 300-2000)
- esi\_neg\_high (m/z: 1000-3000)

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。

Neg, Pos のモードを変更した時は 10min 程度待つ

Method 内容の詳細は参考資料で確認する。

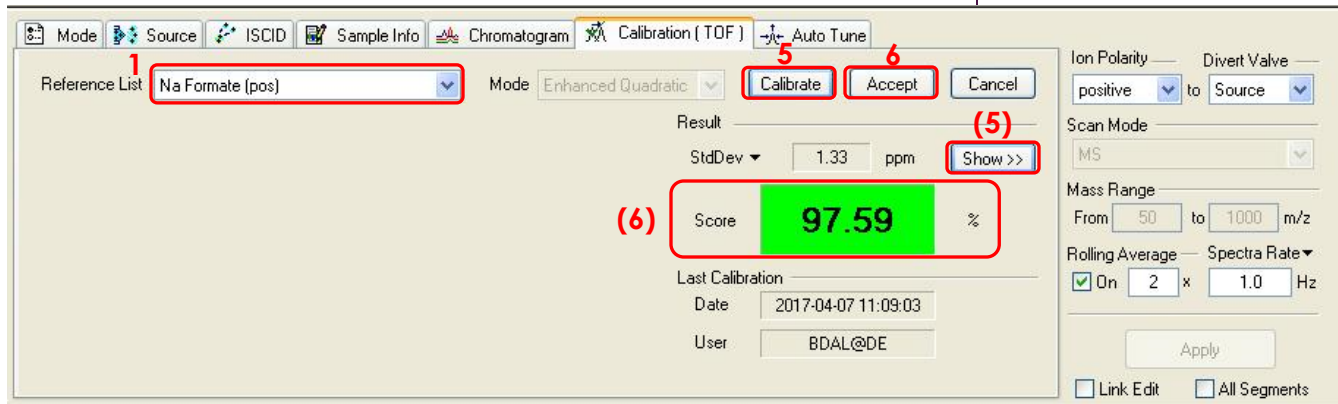
注意:

- default メソッドの上書き禁止！
- 使用メソッドは、各研究室フォルダに save しておくこと

### 3. 【キャリブレーション】

1. Calibration タブの Reference List で使用する標準物質を選択する。

通常は「Na Formate (pos)」もしくは「Na Formate (neg)」



2. シリンジを洗浄し、洗浄液をセットする。

3. 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)

4. スペクトル強度が低いことを確認後、シリンジを外し、標準物質に入れ替えてシリンジポンプにセットする。

5. ギ酸ナトリウムのスペクトルが検出されたら、Calibrate ボタン押す。

(「Show」ボタンを押すとキャリブレーターのマステーブルを見ることができる。)

6. スコアが黄色 (70-95%) もしくは緑色 (95-100%) が出たら Accept 押す。赤色 (70%未満) では Accept 押しても受け入れられない。

★ 外部標準法を行う場合は、標準物質の測定データをとっておく。

7. 必要に応じて、使用溶媒でシリンジとラインの洗浄を行う (MS operate のままで良い)

1.稼動前のチェック 12. 記入

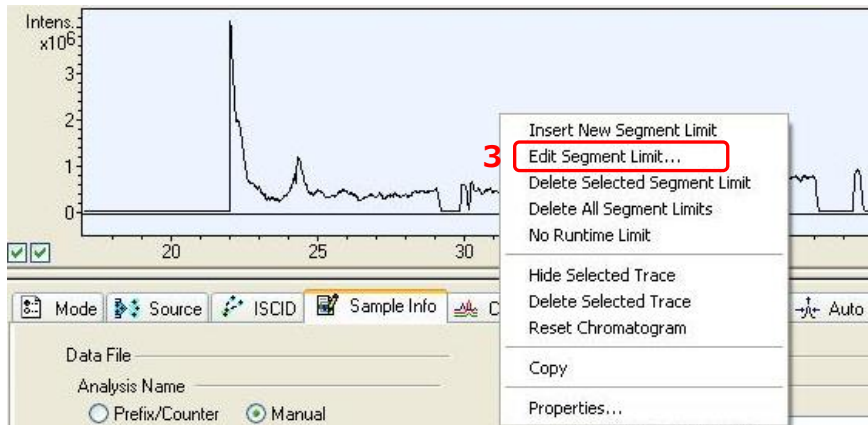
# 試料の測定

## メソッドパラメーターの編集・確認、データ取り込み開始

### 【試料測定】

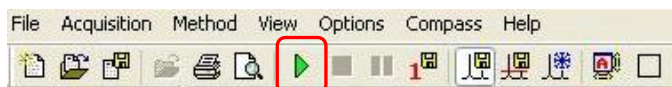
Sample Info のタブにサンプル情報を入力する。

1. Data File の Analysis Name, Subdirectory (保存先) を入力する。  
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。  
入力すると緑文字で入力され、Apply で確定すると黒字になる。
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。  
(途中で標準試料に入れ替えて測定する場合は、5min 程度は必要)



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)



4

5. 途中で標準試料に入れ替えて測定する場合は、1.5min 過ぎたくらいでシンジを外して、溶媒で洗浄後、校正物質を流す。

(試料と同程度の強度が良い)

6. 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。)





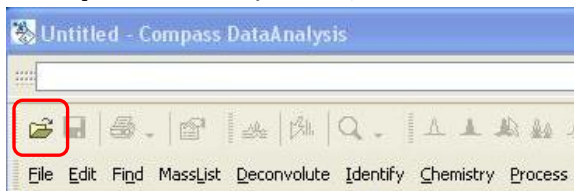
# 測定結果の解析

## 【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)。

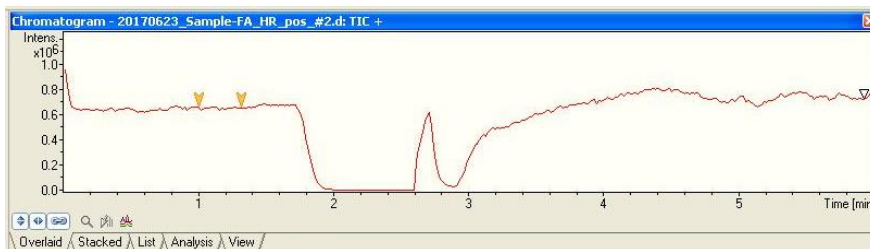
1. Compass Data Analysis で解析したいファイルを開く。



2. 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)

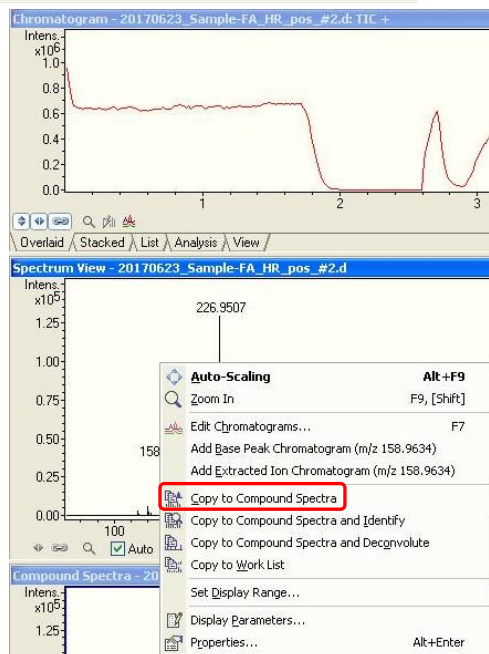


3. MS スペクトルの保存

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 Spectra」で下段にコピーされる。

同様に標準物質のスペクトルを表示させ、下段にコピーする。

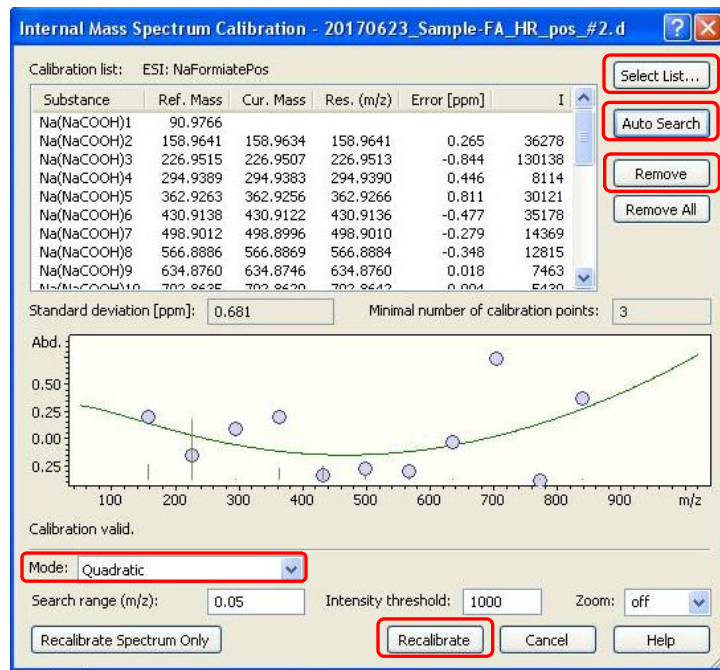
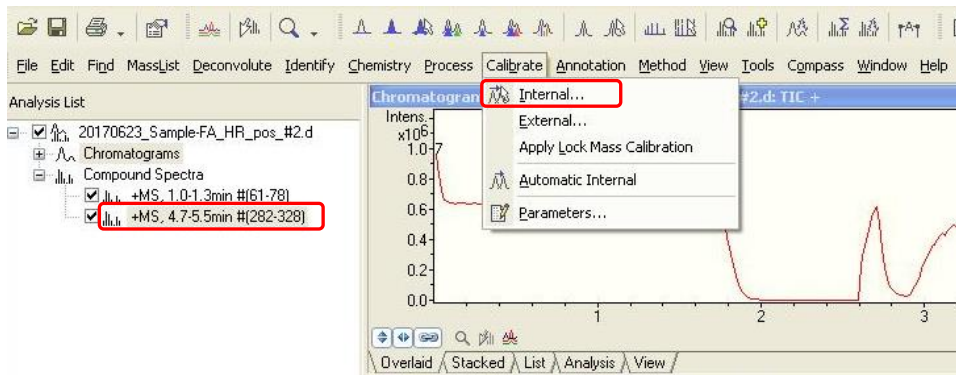
(Compound Spectra にサンプルと標準物質のスペクトルがある状態)



#### 4. MS スペクトルの校正

標準物質の MS スペクトルを選択した状態で、

上部バーの Calibrate → Internal をクリックする。



使用した校正用標準溶液を選択する

Mode を「Linear」「Quadratic」「Enhanced quadratic」から選択する。（\*参考）

「Auto Search」をクリックする。

Calibration list の Error が 1ppm 以内になるように不要な値は「Remove」で除く。

（目的物の値を挟み込むように残す値を選ぶ。）

「Recalibrate」をクリックすると、Compound Spectra の MS スペクトルの値が補正される。

\*参考:

Enhanced quadratic モードは狭い m/z 範囲には向かないが、Linear は通常使用しない。

<広い範囲>

↑ Enhanced quadratic

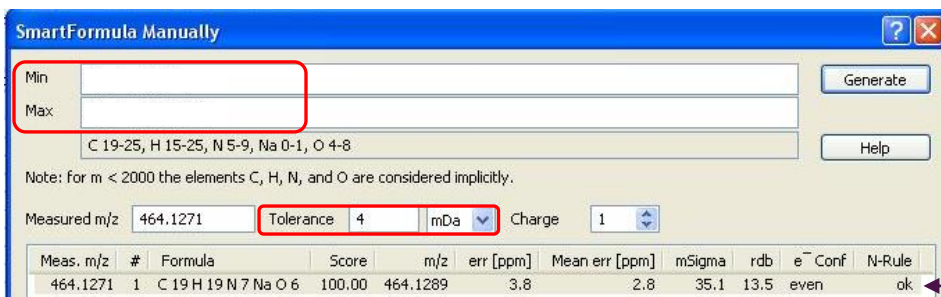
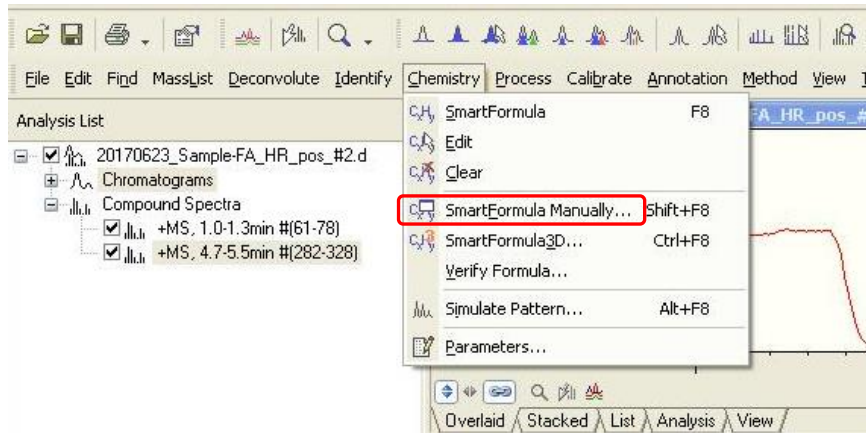
Quadratic

↓ Linear

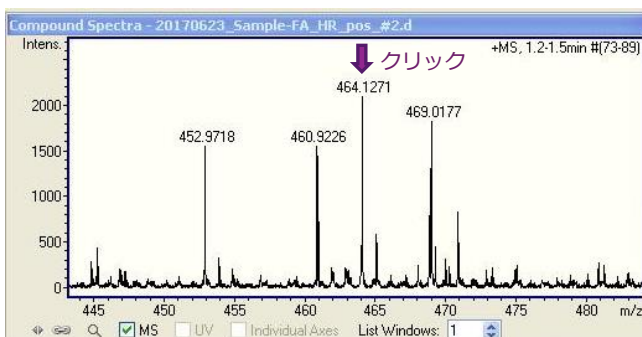
<狭い範囲>

## 5. 組成式の推定

上部バーの Chemistry → SmartFormula Manually をクリックする。



C,H,N,O の既知の数や、C,H,N,O 以外で、含まれている可能性のある組成があれば入力し、Tolerance で誤差を入力し、SmartFormula Manually の画面を開いたまま、Compound Spectra の目的物のイオンピーク上でクリックすると、SmartFormula Manually の画面に組成式推定の結果が表示される。



## 6. 印刷:

Print Preview の Layout で形式を選択して、印刷または、PDF で保存する。

(例) Generic 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)

# 終了操作

## 1. スタンバイ method の読み込み

micrOTOF control 画面で Method → open → 「esi-standby.m」を開く。

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

## 2. 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。

## 3. シリンジポンプの電源を OFF にする。

### ★ 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 esi-standby.m を呼び出したか
3. 2. の設定通り「Neb Gas 0.4 Bar, Dry Gas 1.5 L/min, Dry Temp 180°C」となっているか
4. MicroTOF Control 内の「Standby」(黄色)が選択されているか
5. MicroTOF Control 内の「PC」「MS」はグリーンになっているか
6. MicroTOF Control 内の「Neb Gas」「Dry Gas」の欄にチェックが入っているか
7. 真空度は正常か (High: 1e-06mbar 以下, Fore: 3e+00mbar 程度)
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(0.550-0.605 Mpa)か
10. シリンジ・溶媒類は適切に片付けたか
11. インフュージョンポンプは OFF にしたか
12. プリンター・PC ディスプレイは OFF にしたか  
換気扇を OFF にする

異常な点・気がついた点等あればメモをする

# データの転送と持ち出し

データの取り出しは、測定室中央机上の解析 PC から行う。

1. 解析 PC の電源を入れる。
2. micrOTOF 制御 PC のデスクトップにある「共有フォルダ」内に研究室フォルダを作成し、そこに取り出したいファイルをコピーする。
3. 解析 PC のデスクトップにある「共有フォルダ」にコピーしたファイルが入っているので、解析 PC からデータを取り出す。

\*USB メモリ等は必ず使用直前に最新のウイルス定義でスキャンしたウイルスフリーのものを使用すること。

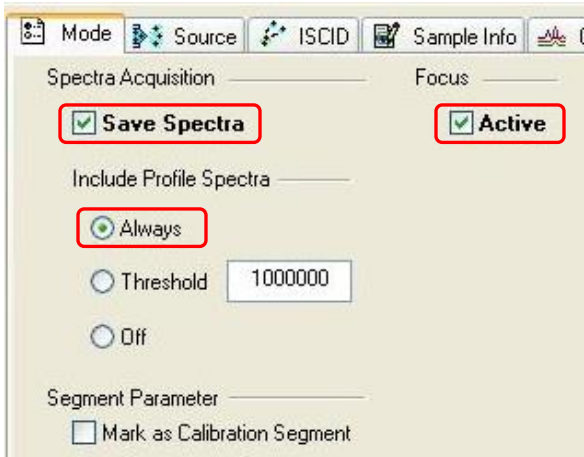
# 参考資料

Method 内容の詳細を以下に示した。

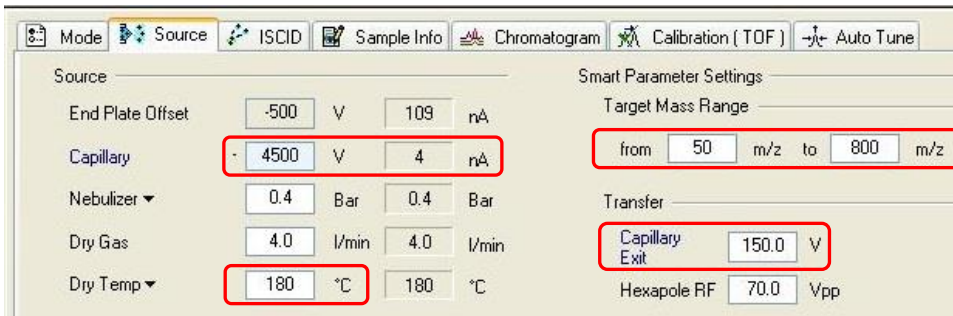
## <Mode タブ>

以下 3 つにチェックが入っていることを確認する。

- **Save spectra** (測定したスペクトルは毎回保存)
- 「Include Profile Spectra」の **always** (常にプロファイルスペクトルも取り込む(ハイマスに必要))
- 「Focus」の **Active** (これつけないと分解能落ちる。ただし、LC-MS ではデータ点かせぐためにチェックを外す)



## <Source タブ>

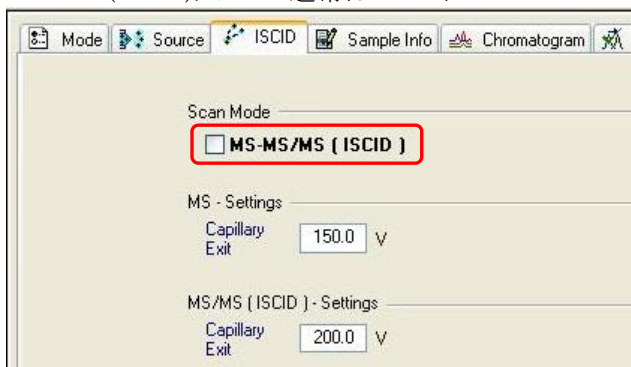


- Capillary : ポジでは電圧は-4500 Vのままに。電流は通常 15 nA 以上(18 など)。低い場合(3 や 5 など)は異常。 ネガでは初期値+3000V だが、+3500V にするとピークでやすくなることもある(2011.10.28)
- Dry Temp : 通常は 180°C 付近(200°C 越えないこと)。水 50% 以上の溶媒を用いるときは、180°C もしくはそれ以下。200°C では溶媒が沸騰してしまい、イオン化しなくなる可能性あり。

→ MS Operate の時の電流の値

- Target Mass Range : 試料濃度が低いなど、高感度での測定を行いたいときには、特に見たい質量範囲を狭めに設定して Autotune することで、その範囲に適したイオンガイド調整となり、感度を高めることができる。その場合、Hexapole RF も調整する必要がある。ただし、校正では使わない(標準試料の各ピークの強度が変わることで校正が合わなくなることもある)。
  - Capillary Exit : 数値を下げるほど、イオンの次の通過点である Skimmer 1 との電位差が小さくなるため、不安定なイオンや低分子のイオンが見えやすくなる (Insource CID の回避策)。ただし、検出器へ誘導されるイオンが減少するためか、感度低下することもあるので注意。ポジでは 150V が適当? (80V では校正できず。2010.11.17)
- ★Neb ガス量と Dry ガス量はそのままに (LC 導入の場合には、指定の値に変更する必要あり)。

<MSMS(ISCID)タブ> 通常は OFF に



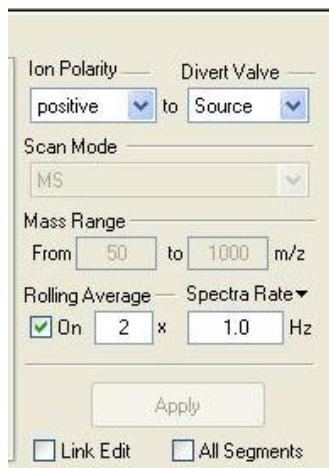
MS/MSMS(ISCID)にチェック入れると ON になり、導入されたイオンすべてがフラグメンテーション化する。選択的フラグメンテーションできないので、あまり実用性なし。

★純品でしかも MS でシングルピーク与えるものなら、フラグメントのハイマス測定できるので実用性あり!

<右側のウィンドウ(ポジネガ, 質量範囲)>

- Ion Polarity : ポジネガが、ロードした Method ファイルに一致していることを確認。
- Mass Range : 測定質量範囲を入力 (低分子測定なら 50-1000 にしておけばよい)

★ハイマスをより正確に合わせたいときは、レンジを狭めにする。レンジ内に試料ピークをはさむ形で、ギ酸ナトリウムのピークが3本 (quadratic) あるいは 4 本 (linear) が入っていればよい。狭いレンジの場合は enhanced quadratic は適さない(広いレンジの場合に有効)。

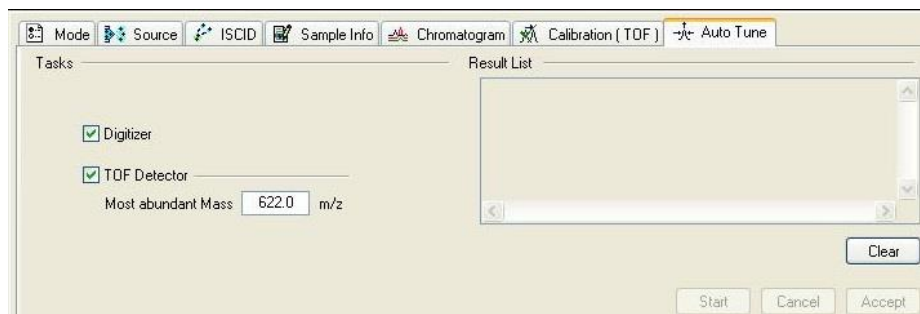


- Rolling Average : MS クロマトの平均化処理の設定値。通常は 2.0 × 1.0 Hz でよい。

## <AutoTune>

ほとんど使わない(Degitizer の補正により S/N 比向上させる)。

★Calibrarion を何回やってもスコアが赤色になるときには、有効なことがある。





## キャリブレーション標準試料の調製

$m/z=1000$ 以上の化合物を測定する場合は、Tuning Mixを使用します。

### 1. Tuning mix (G2421-60001)を使用する場合

・40倍に希釈して使用します。

\* 希釈溶媒は、アセトニトリル:水=95:5を使用します。

<希釈例>アセトニトリル\_950 $\mu$ L、水\_50 $\mu$ L、Tuning mix\_ 25 $\mu$ L

\* アセトニトリルおよび水はHPLCグレードもしくはLCMSグレードを使用します。

\* プラスチック容器、ガラス容器は種類によって、不純物ピークが多く検出されることがあります。

\* Reference Listは、Tuning Mix ES (ESI) (pos)またはTuning Mix ES (ESI) (neg)を選択します。



### 2. Low Concentration Tuning mix(G1969-85000)を使用する場合

・ボトル内の溶液を希釈せずそのまま使用します。

\* ボトルから直接、溶液をシリンジで吸引すると、ボトル内の汚染原因となります。必ずサンプルバイアルなどに移してからシリンジで吸引します。

\* プラスチック容器、ガラス容器は種類によって、不純物ピークが多く検出されることがあります。

\* Reference Listは、Tuning Mix ES-TOF (ESI) (pos) または Tuning Mix ES-TOF (ESI) (neg)を選択します。



## キャリブレーションポイント (※は Low Concentration Tuning mix(G1969-85000)のみに含まれます)

positive mode		negative mode	
組成式	m/z	組成式	m/z
C5H12O2N	118.0863	C2O2F3	112.9856
C6H19O6N3P3	322.0481	C6HF9N3O	301.9981※
C12H19O6N3P3F12	622.0290	C12HF21N3O	601.9790
C18H19O6N3P3F24	922.0098	C20H18F27N3O8P3	1033.9881
C24H19F36N3O6P3	1221.9906 ※	C26H18F39N3O8P3	1333.9690 ※
C30H19O6N3P3F48	1521.9715	C32H18F51N3O8P3	1633.9498
C36H19F60N3O6P3	1821.9523※	C38H18F63N3O8P3	1933.9306※
C42H19O6N3P3F72	2121.9332	C44H18F75N3O8P3	2233.9115
C48H19F84N3O6P3	2421.9140※	C50H18F87N3O8P3	2533.8923※

m/z=1000以下の化合物を測定する場合は、ギ酸ナトリウムを使用します。

### 3. ギ酸ナトリウムを使用する場合

5mMのギ酸ナトリウム溶液を調製します。

<調製例>

- ①ギ酸ナトリウム680mgを水100mLに希釈し、100mMギ酸ナトリウム水溶液を調製します。
- ②100mMギ酸ナトリウム水溶液5mLを、95mLの水：イソプロパノール=1：1で5mMに希釈します。

\* イソプロパノールの代わりに、アセトニトリル、メタノールも使用できます。

有機溶媒および水はHPLCグレードもしくはLCMSグレードを使用します。

\* 100mMギ酸ナトリウム水溶液を、ストックソリューションとして冷蔵庫に保管します。

\* ギ酸ナトリウム 例：和光純薬（品番：190-01995）

\* Reference ListはNa Formate (pos)またはNa Formate (neg)を選択します。

#### キャリブレーションポイント

positive mode

negative mode

組成式	m/z	組成式	m/z
Na(NaCOOH)1	90.976645	HCOO(NaCOOH)1	112.985627
Na(NaCOOH)2	158.964069	HCOO(NaCOOH)2	180.973051
Na(NaCOOH)3	226.951493	HCOO(NaCOOH)3	248.960475
Na(NaCOOH)4	294.938917	HCOO(NaCOOH)4	316.947899
Na(NaCOOH)5	362.926341	HCOO(NaCOOH)5	384.935323
Na(NaCOOH)6	430.913765	HCOO(NaCOOH)6	452.922747
Na(NaCOOH)7	498.901189	HCOO(NaCOOH)7	520.910170
Na(NaCOOH)8	566.888613	HCOO(NaCOOH)8	588.897594
Na(NaCOOH)9	634.876037	HCOO(NaCOOH)9	656.885018
Na(NaCOOH)10	702.863461	HCOO(NaCOOH)10	724.872442
Na(NaCOOH)11	770.850884	HCOO(NaCOOH)11	792.859866
Na(NaCOOH)12	838.838308	HCOO(NaCOOH)12	860.847290
Na(NaCOOH)13	906.825732	HCOO(NaCOOH)13	928.834714
Na(NaCOOH)14	974.813156	HCOO(NaCOOH)14	996.822138
Na(NaCOOH)15	1042.80058	HCOO(NaCOOH)15	1064.809562
Na(NaCOOH)16	1110.788004	HCOO(NaCOOH)16	1132.796986
Na(NaCOOH)17	1178.775428	HCOO(NaCOOH)17	1200.784410
Na(NaCOOH)18	1246.762852	HCOO(NaCOOH)18	1268.771834
Na(NaCOOH)19	1314.750276	HCOO(NaCOOH)19	1336.759258
		HCOO(NaCOOH)20	1404.746682
		HCOO(NaCOOH)21	1472.734106

# 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）

このマニュアルは、岡山大学 自然生命科学研究支援センターが装置ユーザーの為に作成したものです。許可なく内容の一部または全部を転載／複製することはできません。

2018. 4. 1 岡山大学 自然生命科学研究支援センター