# **NanoFrontier LD (UHPLC)**

# フローインジェクション法

# 操作マニュアル

横浜国立大学機器分析評価センター

作成日	2022年 7月 15日				
手順書 No.	NanoFIA-1				
作 成	承認				

## 目次

装置	3
操作手順	4
【LC の準備】	4
【MS のイオン源部の準備】	12
【MS のパソコン設定】	15
【試料の調製】	19
【マススペクトルの測定】	20
【終了操作】	23
データ処理	26
【共通操作】	26
【精密質量測定の処理(高分解能 MS)】	30
【その他の補足事項】	31

【著作権・免責】
本マニュアルの著作権は、『横浜国立大学 研究推進機構 機器分析評価センター』
に帰属します。
本マニュアルの印刷およびダウンロードにつきましては、当該設備の利用者およ
び利用予定者に限り認めます。オンライン上での閲覧についての制限はございま
せん。
登録から抹消された利用者は、印刷またはダウンロードしたファイルを破棄して
ください。
著作権および免責につきましては、こちらの URL
(https://www.iac.ynu.ac.jp/site\_policy) にて詳細が記載されています。

■ 装置



LC : LaChromULTRA

MS: NanoFrontier LD 液体クロマトグラフ質量分析装置 MS のイオン源: セミミクロ ESI/APCI 共用イオン源

LC/MS またはフローインジェクション(オートサンプラーを使用)で測定を行 う場合、通常セミミクロ ESI/APCI 共用イオン源を使用する。

ミクロ ESI イオン源になっている場合には、イオン源の交換方法(別紙)にしたがってセミミクロ ESI/APCI 共用イオン源に交換する。



ミクロ ESI イオン源



セミミクロ ESI/APCI 共用イオン源 LC/MS の場合こちらを使用する

### ■ 操作手順

4.

## 【LC の準備】

- 1. 使用する溶媒の確認を行う。ミリQ水は長期間(数日程度)使用していない場合は交換する(208号室に超純水製造装置がある)。新しく入れ替えた場合や、長期間使用していない場合は、超音波洗浄機に15分程度かけて脱気を行う。
  - 注意! 溶媒は HPLC 用または LCMS 用を用いる。また、水はミリQ水を 用いる(センターの 208 号室に装置がある)。
- LCの主電源、ポンプA、ポンプB、UV検出器、カラムオーブン、オート サンプラー全ての電源を入れる。主電源を最初にすれば、後の順番は問わ ない。



3. LC用のノートパソコンを起動し、ユーザーLaChromUでログインする。



5. HPLC システムの状態のアイコン うをクリックしてモジュール状態の画 面を開く。続いて <u>イニシャライズ</u>を押す。電源をつけた各ユニットと LC のパソコンが通信し、以下のように表示されるのを確認したら OK を押す。

モショール状態					X
状態:  モニタ				キーロック: する しない	
-ty'1-W			ንግታንችል NO	>ули NO	
インタフェース:	JI-B-0		8918190-00		
ホッンフ°A:	JL-2160U		8918110-03	2123-005	
ホッフプB:	L-2160U		8918110-03	2123-015	
オートサンプラン	L-2200U		8918120-01	2112-001	
オーフシン	L-2300		8908130-04	21E71-036	
検出器Ch1:	L-2400U		8918140-00	2111-007	
検出器Ch2	· [		Í	— (	
付属装置:			·		
			,	,	
123	ハゥライズ	接	続解除( <u>D</u> )	(OK	

- 移動相に用いる溶媒の準備をする。チューブ A、B はシステムで表示されるポンプ A、B に対応しているので、間違えないように選んだ溶媒の中にチューブの先端を入れる。通常は、A が水、B が有機溶媒となっている。洗浄液用のチューブ(細いチューブ)は、試料が溶解する適当な洗浄液に入れる。A.B 溶液で対応できなければ、別途洗浄液を用意して使用する。
- オートサンプラーの wash ボタンを押して、シリンジの溶媒置換を行う (wash1回では溶媒は全て入替らないので、数回押す)。気泡が入っていた 場合は、washを繰り返して抜く。
- 8. LC とイオン源を接続しているチューブが廃液瓶に接続していることを確認する。
  - ※ NanoFrontierのコンパネ上で、Instrument Status を On にしていない状態で イオン源に送液すると、溶媒がセミミクロ ESI/APCI 本体のイオン化部に たまって、装置を汚損させることがあるので、必ず確認する。
- 9. パージ作業 (数日間装置を使っていない場合に行う)
  - 9-i 装置のポンプ A、B のそれぞれのドレインバルブを1 周程度回転させ て開く(反時計方向)。



9-ii モジュール詳細情報のアイコン **い**をクリックして、ポンプのタブの パージ を開く。

2 そシュール詳細情報 よやファ いいま サンフラ まーフツ えひ UV1 - モーカ	
ホシフ <sup>3</sup> 状態(L-2160U) 状態 〕逐液停止中 □ 全ホンフ <sup>*</sup>	
圧力: 0.0 MPa 最小: 0.5 MPa 流量: 0.000 mL/min 最大: 60.0 MPa	コントロール ハパージ ハパージ ハパージ ハパージ ハパージ ハパージ ハパージ ハパージ
※A: 100.0 パルフ: 1 %B: 0.0 パルフ: 1	マニュアル設定           圧力セロ点補正
	<mark>∧*ーシ* L-2160U形 ホウフ*A.B</mark> 法量 5000 mL/min AT 1 2 3
	<u>パージ開始 パージ(存止</u> 開いる

9-iii パージ開始 を押すと確認メッセージが出るので、バルブを開けたこ とを確認したら OK とする。このとき、現在設定されている%A-%B 比でパージが開始する。もし、ポンプ A から順にパージするなら、 <u>100% FLOW</u>の Aを押すと A だけ流れるようになる。A のチューブ 配管の気泡が無くなるまで、概ね 1~2 分程度パージする。続いて B を押して、A と同様にポンプ B のパージを行う。パージ停止を押して 終了する。

- 9-iv パージが終わったら、パージ停止を押す(バルブを戻すようにメッセ ージが表示される)。ポンプの FLOW が 0 になったら、ポンプ A、B 両方のドレインバルブを閉める。バルブを閉める作業が早すぎると、 ポンプ圧が高まってエラー停止することがある。
- 9-v 閉じるで終了する。
- 10. カラム交換は LC/MS 編を参照。通常はカラムではなく、細いキャピラリー チューブが繋がっている。
- 11. LC のメソッドの設定
  - 11-i アプリケーション変更アイコン を選択する。

the second second	
分析ファイル名	作成日時
sasakura peptide	2010/09/01 15:31
sasakura protein test	2010/08/26 14:58
TESTメンッド	2010/12/06 11:38
TESTメンッド2	2010/02/25 14:03
メチルパラベン分析	2010/02/18 09:55
	2010/02/18 11:24
	2010/02/10 11:24
ファイルダイプ・ で メンッド Samples	10002/18/1124
ファイルダイプ <sup>●</sup> で メソット <sup>×</sup> で サンフ <sup>*</sup> ルテーブル で デードメリーズ <sup>×</sup> フフ <sup>*</sup> リケージョン: Samples Validation 横山幸男研究室	<u> </u>

補足 分析ファイルを新規に作成し、パラメータ設定を行う場合は以下のとおりにする。

- 1. "ファイル"メニュー中の"新規作成"をクリックする。
- "新規"ダイアログの"分析ファイル"を指定し、 OK ボタンを押す。
   分析ファイル情報を表示するウィンドウが表示される。

3. 分析装置の構成のアイコン をクリックし、分析装置の構成を以下のように設定する。インタフェースは「IFB-U」、グラジェントタイプは「高圧」に設定する。

∮ カラム無_95 AC N_30 °C		
	<u></u>	
12 🖩 🕌 🕊 🖬 📳		
分析装置の構成	Ch1 検出器 加5ム	
	L-2400U ▼ Column Ch2 検出器	•
IFB-U	<sup>1</sup> 754 <i>π</i> −7°∕ L-2300 ▼	
_h*=;,*_*),b/¬*	オートサンプラ — L-2200U	
C #	ホ <sup>∞</sup> /フ <sup>°</sup> (A) — L-2160U	
• 高圧	L-2160U	

11-iii 選択した分析ファイルの画面でポンプパラメータのアイコン クリックして、ポンプの送液条件を設定する。圧力リミッタの上限と 下限に、カラムの仕様に合った値を入力する。下段の表にグラジエン ト条件を設定する。流量は 0.200 mL/min が標準である。入力した列を 訂正、削除する場合は、左ドラッグで選択し、D-2000Elite の編集タブ で操作する。

<b>∫ カラム無_95 AC N_30 ℃</b>				
12 🖩 👪 🗶 🚽		Å		
ホツフ <sup>®</sup> パラメータ(Lー2160U, Lー2160U)				
圧力リミッター 下限 上限 全ポシフ <sup>*</sup> 0.1 40.0 MP	「溶麺液 木 <sup>か</sup> フ <sup>*</sup> (A) <u>「 ンル ヘ<sup>*</sup>ン+セル</u> ・ 1:	また また また また また また また また また して また して また して また して して して して して して して して して して	*(B)	2698 1 -
時間 時間 (min) (min) XA	XB 流量(mL/min)	接点出力1	■ 「 茶」 「 茶」 二 二 本 * ンフ - - - - - - - - - - - - -	'*(A) 接点出力3 <sup></sup>
0.0 0.0 5.0	95.0 <b>0.200</b>			
				<b></b>

注意! セルの耐圧がかなり低いので、カラムや抵抗管を接続していないと 破損する可能性がある。この場合は、圧力リミッタも低い値(数 MPa) に設定すること。 11-iv オートサンプラアイコン をクリックして、オートサンプラーの動 作条件を設定する。試料が難溶性を示す、ひどく汚れている、などの 場合には、洗浄回数を標準の3回より多く設定する。ニードル降下速 度は、(1)ふたをしない、(2)アルミでふたをする、または(3)切れ込み のある専用セプタムを用いる場合は FAST、それ以外の標準セプタム を使用する場合は SLOW を選択する。

💵 🧕 🚺 🚺	₹ 20	
12 🖩 🖁 🖉 🖄		
オートサンプ <sup>®</sup> ラパ <sup>®</sup> ラメータ (Lー2200)		
_```		
シリンジ動作速度		
ニードル降下速度 Fa	ast 💌	
シリシシ 容積(mL) 0	1 💌	
注入時洗浄条件	注入	
洗浄ポートの洗浄回数 3	□ ホンフと同期する	
洗浄ポートの洗浄速度 4	▶ バイアルセンサを有効にする	

- 11-v カラムオーブンパラメータのアイコン をクリックして、設定温度 を入力する。またカラムの最高使用温度を入力する。
- 11-vi Ch1-検出器パラメータのアイコンジをクリックして、

<b>al</b> 🚺	<b>I</b> _ 101	$\geq 0$ $\geq 0$ $\geq 0$	<b>F</b>		
12				] <u>Å</u>	
Ch1 - 検出器ハ	ゔメータ (L-2400U	)			
レスホシス (s) 吸光度レンジ オフセット(AU) 極性	(AU)	0.05 • 1.0 • 0.000 Positive •			
- テ └ ウ 収集 収集時間(m ☞ 注入前オ 収集間)	in 0.50 - ト 1 夏(ms) マ		波長\$/45~7) <mark>時間</mark> (min) 0-0	▶ 波長(m) へ*~スライン 2 220	

パラメータを設定する。波長タイムテーブルに、200 nm ~ 600 nm の 範囲で、測定する試料に応じた吸収波長を入力する。データの収集時 間、検出器パラメータは必要に応じて設定する。

- レスポンス(s): 0.05 が通常。小さいほどクロマトグラムの分解能が良くなり、大き いほどノイズが低減される(相互関係)。
- 収集時間(min): 1回の測定で検出器を作動させる時間。通常は測定時間と同じ時間を 入れるが、データの収集をせずにカラム安定化時間を入れる場合などは短くする。
- 収集間隔(ms): 50 が通常。収集間隔が長いほど信号強度が大きくなるが、クロマトグ ラム分解能が悪くなる。定量分析する場合は、検出器の最大レンジにも注意。
- 11-vii 以上の設定を終えたら、ファイルメニューから、「メソッド名変更し 保存」を選び、名前を付けて保存する(上書きでよい場合は上書き保 存)。

#### 12. LC のテーブルの設定

12-i 測定試料をサンプルラックにセットする。サンプルラックには 20 行
 10 列の合計 200 個の溝があり、一番奥左端が1番、 一番手前右端が
 200 番である。



12-ii サンプルテーブル設定のアイコン をクリックして、適当なサンプ ルテーブル名を選択する。

- 12-iii 「分析ファイル名」の欄が、先程保存したメソッドファイル名と同じ であることを確認する。このことから、テーブル名はメソッド名に基 づいて名前を付けた方が管理しやすい。測定試料をセットしたサンプ ルラックの番号と同じ番号を、バイアル番号に入力する。注入量等を 適宜入力する。MS 測定の場合はノイズテストを行う必要がないので、 許容ノイズ (Ch1) と許容ドリフト (Ch1)の値は、それぞれ最大値で ある 8,000、30,000 にしておく。
- 12-iv 以上の設定を終えたら、ファイルメニューから「テーブル名変更し保存」を選び、名前を付けて保存する(上書きでよい場合は上書き保存)。

#### 13. データ収集

データ収集モニタのアイコン<sup>⇒</sup>をクリックして、データ収集用のサンプル テーブルの中から、先程保存したサンプルテーブル名を選択し、OK を押 す。右フレームにあるシステムの状態が'モニタ'になっているかどうか確 認する。'ポンプのレディ状態待ちです。'になっていたら、 ■ ポンプアイ コンを ON にし、ベースラインが安定するまで待つ。待っている間に、次 の (MS のパソコンの設定) を行う。

ノイズテストを行う場合には、ノイズテストをクリックすると自動で開始される。

### 【MS のイオン源部の準備】

 セミミクロ ESI/APCI 共用イオン源のカバーを 真上に引き上げながら取り外し、AUX ガスヒー ター背面にあるイオン化切替えコネクターが ESIモードに接続されていることを確認する。



モードを切り替えるときは、コネクターを入れ替える。カバーはネジ回しに なっているので、まずカバーを外してからゆっくりコードを引き抜く。取り 付けるときは、コネクターを差し込んだ後、カバーを閉める。



(セミミクロ ESI/APCI を上から見たところ)

2. 【<u>APCIモードで測定を行う場合</u>】は、つまみを回して針電極を挿入する。



操作盤はイオン源の前方部についている。上図のずれている赤丸の部分を ぴったり合うように調整する。ESI で行う場合には必要ない。

- イオン源を止めている右手前にあるストッパーを緩めた後、取手を持って イオン源を左側にスライドさせる。下図の AP1 のキャップをピンセットで はずす。キャップは減圧により貼り付いている状態になっている。
  - ※ <u>AP1 はコーン型に出っ張っていて、そこにキャップを強く当てると破</u> 損を招くので注意して外す。



- イオン源を右側へスライドさせ、壁にぴったりと密着させる。このとき IS ケーブルと HV ケーブルをイオン源と壁の間に挟まないように注意しなが ら動かす。イオン源はやや重いので、力を入れすぎて壁にイオン源を勢い よくぶつけないよう注意する。
- 5. セミミクロ ESI/APCI 共用イオン源のカバーを取り付ける。
- N2 ガスジェネレーターのブレーカースイ ッチの電源を入れる。このとき、圧力が 0.7 MPa になっているか確認する。背面の三方 コックが NanoFrontier 側になっていること を確認する (9/29 現在は未設置)。



ヘリウムボンベの弁を、それぞれボンベの元栓(①)→出口バルブ(②)の順に開ける。二次圧調整バルブは触らないこと

バルブ①②は、どちらも<u>上から見て反時計回り</u>が OPEN 二次圧は 0.35 MPa の値になっている のを確認する。調整作業は圧抜き操作 が必要なので担当者に依頼すること。





ヘリウムボンベ

- 8. HPLC を設置しているラックの下にあるトランスのブレーカーを入れた後、 Semi-Micro ESI Controller ユニットの主電源を入れる。
  - このとき、NanoFrontier本体のエラーランプが点いていないと、エラーが 発生してLCが止まる仕様になっている。
  - <u>温度設定およびガス圧は、重要なパラメータなので必ず確認して記録し</u> ておくこと(測定データには記録されない)。
  - ヒーター電源に緑ランプが点いていることを確認する。



Semi-Micro ESI Controller ユニット

通常設定 : ガス温度→ 400~500 °C	(標準 480℃)
AUX FLOW $\rightarrow$ 5 $\sim$ 10 L/min	(標準10L)
NEB. FLOW $\rightarrow$ 1 $\sim$ 1.5 L/min	(標準1.5L)

## 【MS のパソコン設定】

- 1. MS のパソコン(hp 製デスクトップパソコン)を起動する。ユーザー名 NanoFrontier をクリックする。
- 通常の測定(フローインジェクション)では Control Panel のアイコンをダ ブルクリックして、NanoFrontier LD の画面を立ち上げる。LC/MS (カラム 有りで行う測定)を行うときは、LCMS 用マニュアルを見ること。



NanoFrontier LD Control Panel 基本画面

この時、ツールバーの Instrumental Setting1、System Setting2、Acquisition Status3、Spectrum Acquisition4、Data Storage5 が閉じていたら全て開く。

īn	ont	ier	LD	Со	ntra	ol Pa	nel	- C:	<b>VN</b> ā	anoFr	ontie	er\Tra
d	⊻i	ew	Ins	trum	ent	<u>D</u> isp	lay	Proce	ss	<u>T</u> ools	<u>W</u> in	dow
₿	3	Ŷ		¥°C +++	B				E	3 🔟	6	
				1	2	3	4	5	•			

3. System Status が Minor Fault (黄色) になっていたら、コントロールパネルの ツールバーで Instrument  $\rightarrow$  Instrument-Standby にする。もしくは、ツー ルバーのボタン<sup>1</sup>をクリックする。左フレームの System Status が Mainer fault から OK に変わることを確認する。



4. TOF Pressure (Pa) が 10<sup>-4</sup> Pa 以下であることを確認し、使用簿に圧力を記載 する。

※ 例えば 3.02e-005 と表示されていたら 3.02×10<sup>-5</sup> Pa をあらわす。

- 5. 以下の 6. 7. の操作を行う必要があるときは、一旦、 Instrument → Instrument-OFF にして、測定パラメータの設定を行う(設定後は戻す)。
- 測定したい試料に応じて Posi モード(正イオン)<sup>⊕</sup>か Nega モード(負イオン)
   <sup>⊖</sup>かを選択し、対応するボタンをクリックする。
- Instrument → System Settings を指定して、Instrument タブの設定を通常 TOF にする。Trap モード(MS/MS 測定)で行う場合は、管理者に相談する こと。
- 8. ファイルメニューの Open Instrument Settings を開き、bic フォルダ (C:\ NanoFrontier\TrapTof\bic) から測定に適したファイルを選択する。

ファイル名は、質量分離法(Tof または Trap)\_イオン源(LS/MS の場合 semiMicroESI または APCI)\_イオン化モード(Posi または Nega)\_電圧設 定\_日付の順に付いている。(例:TOF\_semiMicroESI\_Posi\_700V\_120406 等) 適したものがなかったらデスクトップの hitachi フォルダに標準ファイル があるので、日付が新しい所から適したファイルを選び、名前を変えて bic フォルダに保存し使用する。(hitachi 内のファイルは上書き不可!!)

 必要に応じて、以下のパラメータの説明を参照して Instrument Setting (下 段) パラメータの設定を行う。

Ionization, AP Lens | Octapole Lens, Trap Lens | Ion Trap | QPole Lens, TOF | Syringe Pump |

- ・ Ionization, AP Lens タグを開き、Saplay Potential (イオン化電圧), Ex Potential (励起電圧)を変更する。
- Trap モードの場合は、Ion Trap タグでキャリブレーションするサンプルの 質量数に合わせて、Accumulation Mass の範囲を変更する。
- ・ QPole Lens. TOF タグを開いて QPole RF Voltage を変更する。目安は、サン プルの *m/z* 1000 以上で 1000 [v]程度。
- ・Syringe Pump タグを開き、Detector Potential を変更する。
- ※ 実際にはこれらのパラメータ調整は、測定の結果を見てから行うものが 多い。特に、イオン化電圧と励起電圧の調整は、ピーク強度やフラグメ ントの生成具合などを見て調整するのが普通である。
- 10. 右フレームの Data Storage の部分は、まず Root Directory に E:\User\(ユー ザー名)を選択する。

普段は、前回使用したフォルダが選択される。Directory と File Name は必要に応じて任意に入力する。Directory に測定年月日、File Name にはサン プル名を入れておくのがわかりやすい。なお、同じ名前で測定を行った場 合、データの名前の後に自動で No が振られる。

11. Start on の Immediately にチェックが入っていることを確認する。また、デ

ータ収集時間の Stop on Time (min) は、ピークの検出時間に応じて設定する。手動で測定する場合、長めに 3 分位取っておく。実際には測定後に自分で停止することになる。

12. Spectrum Acquisition の Ion Count Threshold を、イオンの検出強度に応じて 0~10 に設定する。Mass range は通常 50.00 から 2000.00 に設定する。

Data Storage         Root Directory         Directory         11062         File Name         Cal_po         ✓         Auto Sequence         ✓         Standby at End of Accord         Standby at End of Accord         Contact Close         Delay (min)         O.00         Sample Information         Sample ID         Comment	er\Fuji 1 si equisition Stop on Time (min) 10.00 Spectrum # 1	↓ 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕 〕	時間は長めに取 で1点だけ測定 場合で3分、標 料と2点同時に
Spectrum Acquisition Seconds Per Spectrum Ion Count Threshold First Mass Last Mass Inst Peak Detec	1.2 1 50.00 2000.00 stion	- 程度	にする。

- 13. 何かパラメータを変更していたら、Apply Instrument Setting のアイコン をクリックする、もしくは Enter キーで保存する。
- 14. Instrument  $\rightarrow$  Instrument-Standby になっていることを確認し、ツールバ ーの (Heater On/Off のアイコン)をクリックする。

### 【試料の調製】

- 1. 十分に精製された試料を用意する。以下のような試料は前処理などが必要 であるので注意すること。
  - ① Na、K などのアルカリ金属系を多く含む試料
    - → 再結晶、再沈殿、蒸留、固相抽出などで Na を除去する。
  - ② 不溶物が入っている試料(結晶、微粒子、埃なども含む)
  - → シリンジフィルターでのろ過が必要。結晶化しやすい試料は、噴 霧時にニードルが詰まることがあるので、試料濃度に注意する。
  - ③ エバポレーションや凍結乾燥で濃縮した試料
    - → 濃縮しない方が望ましい。どうしてもしなければならない場合は、 安定剤の入っていない高純度溶媒やミリQ水を用いること。
  - ④ カラム分離しただけの試料
    - → いろいろな不純物を含むため、基本的に測定を推奨しない。少な くともシリンジフィルターでのろ過が必要。
  - ⑤ イオン性の試料
    - → 基本的に好ましくないため、管理者に相談すること。かなり薄め に調製するとよい。
- 移動相の溶媒と同じか、または混和できる溶媒を用いて、2mmのサンプル 瓶など(オートサンプラーに入るサイズ)に試料を溶かす。規格を確認す るときは管理者に相談する。 濃度は薄めに調製し、初回の測定は 0.1~1ppm(1ppm≒1mg/L=1µg/mL) 程度の濃度になるようにする。目安としては、測定したときの TIC 強度が 10<sup>6</sup>以上にならないようにするとよい。

# 注意! 有機溶媒は HPLC 用または LCMS 用を用いる。水はミリQ水。 注意! 有機溶媒を使うときは換気扇をすること。

 LCのテーブル設定で行ったオートサンプラーの番号に試料をセットする。 針が通らないキャップをつけたまま注入させようとすると装置が壊れるの で、絶対にしないこと。また、使用するセプタムと溶媒の組み合わせによ っては、コンタミしてバックグラウンドが出るので注意すること。

## 【マススペクトルの測定】

- 【MS のパソコンの設定】System Status の AP1, AP2 が 100℃ 以上になり、 ランプが緑色に変わるまで待つ。ここでエラーが出る場合は、どこかに不 具合があるので確認する。
- Instrument → Instrument-On にする。またはツールバーの ダ をクリッ クする。(これにより、イオン源・分析部・検出器など各部の電圧が ON に なり、イオンを観測できる状態になる。Semi-Micro ESI Controller の AUX ガスの温度も上昇する。)
- 3. LC 出口のチューブを MS のイオン源に接続する。



- ※ LC 出口チューブをイオン源に接続、またはイオン源から取りはずす ときは、必ず Instrument On にしてから行うこと!
- 4. MSのパソコンのTIC画面でバックグラウンドピークが安定するまで待つ。

安定までに時間がかかりそうな場合は、Ex potential (Ionization, AP Lens タ グ)の電圧をゼロにしておくと、MS 内部にイオンが流れないので、汚れる 心配が軽減される。測定中に高濃度に汚染されたサンプルを入れてしまっ た場合も、緊急措置として同様の対策ができるので覚えておくことを推奨 する。更に長時間の洗浄が必要な場合は、①LC 出口のチューブを外して ②廃液瓶につなぎ、③Instrument Off にしておく(手順を間違えないこと)。

- 【LC のテーブルの設定】で設定したサンプルの数に応じて、一分析実行 か 連続分析実行 をクリックし、LC 側のデータ取得を開始する。一分析の 場合、オートサンプラーが動き出したら(大体十数秒程度かかる)、MS のパ ソコンの Acquisition Start/Stop のアイコンジをクリックして、測定を開始 する。
  - ※ LC のパソコンと MS のパソコンは Auto Sequence プログラムを使用し ない限り、連動はしていない。個別にボタンを押すこと。また、連続 分析は、LC-MS の操作手順と同じように Auto Sequence を使用するの が望ましい。
- 測定中は記録したいスペクトルを選択した状態で<sup>▲</sup>アイコンをクリック すると、マススペクトルのスナップショットを記録しておくことができる。
   <sup>Ψ</sup><sup>−</sup>でスペクトルのウィンドウを最大3つまで増減させることができる。
- 7. サンプルが出きったと思ったら、<sup></sup> をクリックして、測定を停止する。また、LC 側がまだ測定中であれば停止する。

高分解能測定(HRMS)を行う場合は、標準試料を連続で注入する場合が ある。その場合は MS 側の Acquisition をそのままにして、試料を入れ替え た後、一分析実行をもう一度行う。

- ●分析実行を続けて行うには、試料を入れ替えてもう一度実行する。新た に測定しなおすときは、モニタ画面を閉じて必要に応じてメソッドやテー ブルを変更し、データ収集モニタのアイコンジをもう一度クリックする。
  - ※ メソッドやテーブルを変更した場合は、必ず上書き保存すること!
- **9.** 測定終了後、Instrument Setting を保存したい場合は、名前を付けて保存する。測定前に事前に行っておいてもよい。

-その他の作業――

【パラメータファイルを変更する場合】

LC のパソコンからポンプ **L** を停止し、ファイルメニューの Open Instrument Settings から開き、その後にポンプを元に戻す。

【イオン化の正負を変更する場合】

手順を間違えないように注意!!

LC のパソコンからポンプ L を停止し、MS のパソコンから Instrument Off に する。ツールバーの + または - アイコンを押して正負を変更し、ファイ ルメニューの Open Instrument Settings から適切なファイルを読み込む。その 後、Instrument On に戻し、ポンプを戻す。

【溶媒を交換する場合】

LC のパソコンからポンプ L を停止し、溶媒ビンを取り替える。気泡が入り そうな場合は、立上げ時に行うパージ作業を同様に行う。ポンプを再稼動後 は、少なくとも 2 分程度の送液をする(カラムがなくても、溶媒が入替るま でそのくらいの時間が必要)。

## 【終了操作】

 MS のパソコンの画面をモニタしながら、残留ピークが無くなるまで洗浄 する。このとき短時間であれば、Ex Potential 値 (Ionization, AP Lens タグ) を落とすことで、溶液が検出器側に入らなくなり、汚染が軽減される。

バッファー等を添加した場合は、別途記載のバッファー抜きの作業を行う (通常では、1~3時間程度洗浄すると回復する)。このときは、先に MS 側 のイオン化を止めてよい。

- 2. 洗浄できたら、スクリーンショットの画面を印刷し、溶媒の情報を書き込んだ上で、使用簿にファイルしておく。
- 3. イオン源に接続してあった LC のチューブを廃液瓶側に接続する。
  - ※ くれぐれもLC出口チューブをイオン源に接続、またはイオン源から取りはずすときは、 Instrument On 状態で行うこと!
- 4. MS  $\mathcal{O}$  Instrument  $\rightarrow$  Instrument-Off  $\mathfrak{l}\tau$
- 5. LC のポンプ 基 がまだ動いていたら止める。
- 6. D-2000 Elite を閉じ、LC のパソコンをシャットダウンする。
- LC のポンプ A、ポンプ B、UV 検出器、カラムオーブン、オートサンプラ ーの 5 ヶ所の電源を切る。最後に LC の主電源を切る。
- Semi-Micro ESI Controller のヒーター温度が 40℃ 位まで下がったら、電源 をオフにする。高いままでオフにするとセンサーが故障することがある。 MS 本体の Error ランプが赤く点き、また MS の Control Panel 画面の System Status が Minor Fault になるが、そのままで問題ない。
- 9. 取手を持ってイオン源部を左側にスライドさせて、AP1のキャップをピン セットで取り付け(終了直後は高温なので注意)、イオン源部を右側にスラ イドさせて元に戻す。忘れやすい作業なので必ず行うこと。

- 10. 窒素ガスジェネレーターとヘリウムガスを止める。
- Control Panel を閉じ、タスクバーの Control Server が自動で消えるのを待って、MS のパソコンをシャットダウンする。
- 12. 使用記録をノートに記載する。

#### 【バッファーを抜く作業】

バッファーやイオン対試薬は、高濃度のイオン性試料を入れているのに相 当するため、サンプル測定に<u>使用する正負イオンとは逆のイオンモードにお</u> いて、極めて強いバックグラウンドが検出される。したがって、他の利用者 に配慮するため、十分な洗浄を行う必要がある。

- ※ 以下は逆相カラム(C18 または C8 等)の洗浄作業である。他のカラム では対応が違うことがあるので、カラムメーカーのマニュアルを参照す ること。
- A) 前述の MS の停止まで進める。
- B) 溶媒をバッファー等が入っていない純粋なものに交換する(手順は溶媒 交換作業を参照すること)。
- C) ポンプを稼動し洗浄する。カラムを接続している場合は、バッファーの 洗浄に適した比率の溶媒を、カラム体積の 20~30 倍流す。接続していな い場合は 30 分程度洗浄する。

直径 2mm×100mm なら、0.2 mL/min で 31.4~47.1 分

- D) 次に有機溶剤 100%に変更し、カラム体積の 10 倍程度流す。カラムを接続していない場合は、適宜洗浄する。
- E) カラムを接続している場合は取り外し、追加の洗浄を行う。洗浄時間は 使用したバッファー等による。1晩かかることもあるため、経験がない バッファーの場合は、予約を十分に取っておく。
- F) 十分な洗浄が終わったら、動作確認をするため、もう一度 MS を起動する。
- G) バッファーが酸性の場合は負イオン、塩基性の場合は正イオン、イオン ペア試薬の場合は両方のモードでバックグラウンドを測定する。このと

- き、Qpole RF voltage は 200V とする
- H) バックグラウンドの大きさかわからないときは、流している溶媒と同じ 比率のブランク溶媒を用意し、注入する。このとき、ピーク強度がほとん ど変わらずにフラットであれば、十分に洗浄されていることがわかる。
   TIC が極端に上に凸か、下に凹となる場合は、洗浄が不十分な可能性が高いので、継続して洗浄する(若干であれば許容)。
- I) 洗浄が終わったら、有機溶剤 100%に設定して軽く置換する。終わったら MS と LC を切って終了

#### ■ データ処理

### 【共通操作】

- 1. MS のパソコン(hp 製デスクトップパソコン)起動し、ユーザー名 NanoFrontier をクリックする。
- 2. Data Processing のアイコン Processing をダブルクリックする。
  - ※ 測定ソフトとデータ処理ソフトを、ひとつの PC で同時に開くことはでき ない。測定中は、ネットワーク共有した別の PC でデータ解析を行う。
- 3. まずデータファイルを開く。

File → Open で Select File(s)の 画面を開き、標準試料の入っている データを選択し、Add をクリック する。 下欄に選択したファイルが表示される ので、OK をクリックする。

Select File(s)	? 🛛
Look jn: 🧀 120618 💌 🗢 🖻	📥 🖬 -
Logs YOKUDELNA001 GTTC_preg_Nega001 GTTC_preg_Nega nodu001 GTTC-Preg_Te001 GTTC-Preg_Te001 GttC_preg_Te001 GttC_preg_Te001	
File name: FITC-Preg001	Add
Files of type: Data Processing File (*:dat)	
2 Files Selected	Add All
E:\User\Fuji\120618\FITC-Preg001.dat	<u>R</u> emove
	Remove All
	Cancel
	<u>0</u> K

- 4. 基本操作
  - 左ドラッグ:ドラッグの範囲内を拡大する。拡大を戻すときは、右クリッ クで出てくるメニューから戻す。TIC 画面、SPEC 画面共通。

右ドラッグ:TIC 画面では、範囲内の平均スペクトルを取り、右の SPEC 画面に表示する。

> SPEC 画面では、範囲内のピークの XIC が左のウィンドウに 表示される。TIC に戻したいときは、上の TIC アイコンで戻 す。

主に使用するアイコン

スペクトルを1スキャンずつずらしていく。
 画面内に表示できるスペクトルの数を増やす。
 同一画面内のスペクトルの横軸を同調させる。

- 5. キャリブレーション LC オートサンプラーから標準試料を注入した場合は、以下の手順でスペク トルを校正する。
  - 5-i ピークのある程度高い範囲を右ドラッグして、数点(3-4 点、SPEC 画 面に表示される)のスキャンの平均スペクトルをとり、SPEC 画面で標 準物質のピークの Intensity (右側縦軸の数値) が最低 100 カウント、 できれば 200 カウント以上であることを確認する。
  - 5-ii SPEC 画面を指定して、上のタブの内、 Process → Mass Calibration → Manual Calibration の画面を開く。



5-iii Manual Mass Calibration 画面の Browser をクリックして、デスクト ップの Ref file フォルダを開き、正イオンで測定したなら posi.ref を、 負イオンなら YOKUDELUNA.ref を開く。

anual Mass Calibr	ation		E
- Select Calibration Ref	erence File		
ts and Settings\Nano	Frontier\Desktop\Ref F	ile\posi.ref	<u>C</u> lose
– Reference Matching a	and Calibration Criteria		_
Min Intensity 5	% Relative I	Intensity <u>Match Peaks</u>	Export
Mass <u>T</u> olerance 1	m/z	Plot	
Peak Weighting Facto	or (none)	Apply Calibration	-
Peaks Matched	,		-
Reference Mass	Peak Mass	Initial Error (m/z)	ſ
1121.99760	1121.71366	-0.2839	
1221.99120	1221.84261	-0.1486	
	1321.95226	-0.0325	
1321.98480	1400.07005	0.1004	
1321.98480 1421.97840 1521.97200	1422.07885	0.1004	
1321.98480 1421.97840 1521.97200 1621.96560	1422.07885 1522.22829 1622.35088	0.1004 0.2563 0.3853	
1321.98480 1421.97840 1521.97200 1621.96560 609.28120	1422.07885 1522.22829 1622.35088 609.38957	0.1004 0.2563 0.3853 0.1084	

5-iv 標準試料のピークを観測できるような相対強度を Min Intensity に入力 する。posi marker と nega marker の m/z は以下のとおりである。

Positive ion marker :

242.2848(TBA<sup>+</sup>: [Tetrabutylammonium]<sup>+</sup>) 609.2812([Reserpine] + H<sup>+</sup>) ウルトラマーク: 1100-1200 付近に 5本 Negative ion marker:

YOKUDELNA (トリフルオロ酢酸とそのナトリウム塩)

213.0552([4-Hydroxybenzoic Acid Phenyl Ester] – H<sup>+</sup>) 821.3960([Glycyrrhizin] - H<sup>+</sup>) ウルトラマーク: 1100-1200 付近に 5本

- 5-v Match Peaks  $\delta c \rho \cup \gamma \rho \tau \delta_o$
- 5-vi 下欄に複数のピークが表示されたら、Peak Mass の値が SPEC 画面の 値と同じピークだけを残すようにする。不必要なピークは、Delete Selected Match で削除する。

5-vii Plot をクリックする。

SPEC 画面に「⇒MC」と表示される。

5-viii 次の操作は、同一 TIC (total ion current) で2点取った場合と、別々の
 TIC で2点取った場合で異なる。同一 TIC で2点取った場合は(a)~
 (b)を、別々の TIC で2点取った場合は(A)~(F)を参照する。

### 同一の TIC で試料と標準物質の2点をとった場合

- a) <u>Apply Calibration</u>をクリックする。この作業により、TIC すべての質 量が校正されて、SPEC 画面のタイトルに「⇒MC」と表示される。
- b) Manual Mass Calibration 画面を閉じる。

### 試料と標準物質を別々の TIC でとった場合

- A) Export をクリックして、キャリブレーションデータを保存する。
- B) Manual Mass Calibration 画面を閉じる。
- C) 測定試料の入っているデータを開く。
- D) 同様に、測定試料の数点のスキャンの平均スペクトルを取る。
- E) SPEC 画面を指定して、 Process → Mass Calibration → Import Calibration の画面を開き、A) で保存したキャリブレーションデータ を開く。
- F) 測定試料の TIC すべてに、キャリブレーションデータを適用するとき は Process → Mass Calibration → Apply Calibration を実行する。

### 【精密質量測定の処理(高分解能 MS)】

- 1. 標準試料と測定試料の測定を、できるだけ時間を空けずに連続で測定する。
- 2. 測定試料の数点のスキャンの平均スペクトルを取り、高分解能で解析した い m/z の付近を拡大する。

このとき、裾に他のピークが重なっていると正確な高分解能の解析ができ ない。もしそうなっていたら、左上の←,→のアイコンで、きれいなピーク になる所を捜す。また、ピークの Intensity は最低で 100 カウント、できれ ば 200 カウント以上であることが望ましい。

 Application → Elemental Composition Calculator を開き、目的のピークを左 ドラッグする、これでピークの m/z が登録され Calculate を押すと計算結 果が画面の下に表示されるので、目標の組成式を探す。

論文・学会発表等で使用する場合は、エラーは±3 ppm 以内に抑える必要がある。

- 補足 1 初期設定では CHNO しか計算されないので、目的の物質に他の元素が含まれている場合は、Element limit で元素を加える。必要な元素がこの中にもない場合は、右上に周期表のアイコンがあるのでそこから探す。
- 補足 2 組成式の候補は、最大で 100 個までしか表示されない。もし、100 を超えていたら、エラーの許容値を小さくする、Element limitで元素の範囲を狭める等で、候補を 100 以内に抑える必要がある。
- 補足 3 m/z の値を消すには、一度選択状態にしてから、すぐ右上の赤い× 印で消去できる。

## 【その他の補足事項】

- 画面下の Instrument Setting で MS の細かい条件を見ることができる。
- Isotope Calculator で組成式を入力することで、マススペクトルの m/z や、 同位体パターンをシミュレーションすることができる。
- Display → Default でスペクトルの背景の色を変えることができる。初期の ままでは、印刷するときなどインクを大量に消費するので、背景は白にし ておく。
- Edit → Trace Image で現在選択中の画面をクリップボードにコピーできる。 ワードパッド等に貼り付けることができる。
- 画面下に表示されるピークテーブル等は、Copyを選択するとワードパッド などに貼り付けることができる。