

NanoFrontier LD (UHPLC)

LC-MS

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	2023年 9月 7日	
手順書 No.	NanoLC-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】	15
【MS のパソコンの設定】	18
【試料の調製】	23
【マススペクトルの測定】	24
【終了操作】	27
■ データ処理	30
【共通操作】	30
【精密質量測定処理（高分解能 MS）】	34
【その他の補足事項】	35

【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： セミマイクロ 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、通常セミマイクロ ESI/APCI 共用イオン源を使用する。

マイクロ 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）**にしたがってセミマイクロ ESI/APCI 共用イオン源に交換する。



マイクロ ESI イオン源



セミマイクロ 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

【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。

注意！ 使用を許可している溶媒は、水、アセトニトリル、メタノールの3種類である。それ以外の溶媒を使うときは担当者に相談すること。

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）。

注意！ 瓶出しの溶媒は、メンブランフィルターでろ過しておくこと（ただし、市販の未開封 LC/MS 溶媒はろ過済みのことがある。開封済みの場合は保管状況による）。ろ過キットはセンター用意されているので、使用する場合は担当者に相談すること。

注意！ 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こと。

注意！ この装置は LC/MS に接続されているため（HPLC 用途でも）、溶媒にバッファーを添加する場合は、LC/MS で使用できる揮発性の試薬を使う必要がある。詳しくは担当者に相談すること。

2. 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。

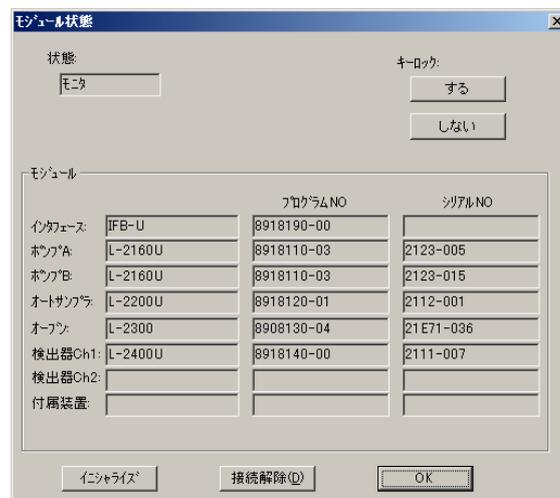


3. LC 用のノートパソコンを起動し、ユーザー-LaChromU でログインする。

4. D-2000 Elite  を起動する。



5. HPLC システムの状態のアイコン  をクリックしてモジュール状態の画面を開く。続いて左下の **イニシャライズ** をクリックする。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** をクリックする。



6. 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が、通常は B 液につながっている。。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。

※ キャップは GL45 規格となっているが、径が合わない場合は径違いを取り付ける。試薬瓶用とガロン瓶用が用意されている。ただし、ガロン瓶は溶

媒ラックに入らないので使用しないこと。

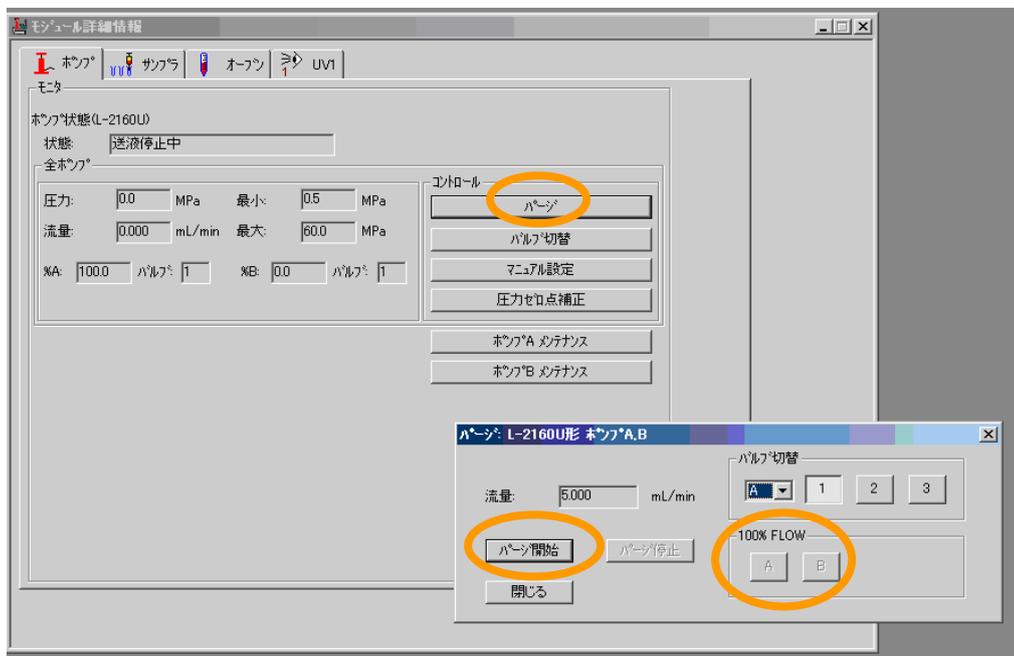
- ※ HPLC で使っているベントフィルター付きキャップは、チューブフィッティングの赤がチューブ AB 用、紫が洗浄用、白が穴をふさぐための栓、となっている。



- ※ 溶媒が枯れると、気泡が入ってカラムや検出器に不具合を生じさせる可能性があるため、十分な量を入れておくこと。
 - ※ ろ過などで溶媒の浮遊物を除去していない場合は、溶媒フィルター（トラップ）を付けておくこと
7. 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（wash 1 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. 検出器の出口から接続しているチューブ（茶色の PEEK 製のチューブ）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、溶媒がセミマイクロ 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  をクリックして、ポンプのタブの ページ を開く。
- 9-iii ページ開始 をクリックする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 比でページが開始する。もし、ポンプ A から順にページするなら、100% FLOW の A をクリックすると 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 分程度ページする。続いて B を押して、A と同様にポンプ B のページを行う。



- 9-iv ページが終わったら、ページ停止 をクリックする (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

10-i モジュール詳細情報のマニュアル設定をクリックし、Flow を 0.05~0.2 mL/min に設定する(流量は作業しやすい量にする)。ポンプ I が OFF になっていたら、ON にする。

10-ii カラムオープンのフロントカバーを手前に引いて開け、下図左のカラムフィッティングを手前と奥の両方外す (2 段構造になっている)。

10-iii 下図中央のように手前のフィッティングを手締めでしっかり締める。このとき、黒いフェラルが手前や奥に行き過ぎていたら、無理に挟んで破損させないように注意して締めること。旧式の装置と異なり、フェラル位置を正確に合わせる必要はない。

10-iv 次に奥側のフィッティングを被せて締める。このとき、チューブがカラムに押し込まれ、先端が密着するような構造になっている。



10-v カラムの出口から液が流れてきたら、反対側のテフロンフィッティングを繋ぐ。

10-vi マニュアル設定で使用する Flow 設定に戻し、漏れがないことを確認したら、ケーブルを挟まないようにしてフロントカバーを締める。

11. カラム洗浄

11-i カラムを洗浄する手順は、規格サイズや用途によって異なる。詳しくは、カラムの説明書を参考とするか、または担当者に相談すること。

- ※ 溶媒に溶けないバッファを使う場合は、析出に注意すること。洗浄する場合は十分に水で洗い流してから有機溶剤に置換する必要がある。
- ※ ほとんどのカラムは塩基性に弱いので、耐塩基性のスペックに注意すること。
- ※ 逆相カラムは水系で保管すると劣化が進みやすいので、長期間保存するときは有機溶剤系で置換することが多い（マニュアルに保管方法について記載があることが多いので、それに従うこと）
- ※ 溶媒を違う溶媒に入れ替えるときは、必ずパージを行うこと（パージを行わないと、ポンプにたまった溶媒が排出されないの）。

12. LC のメソッドの設定

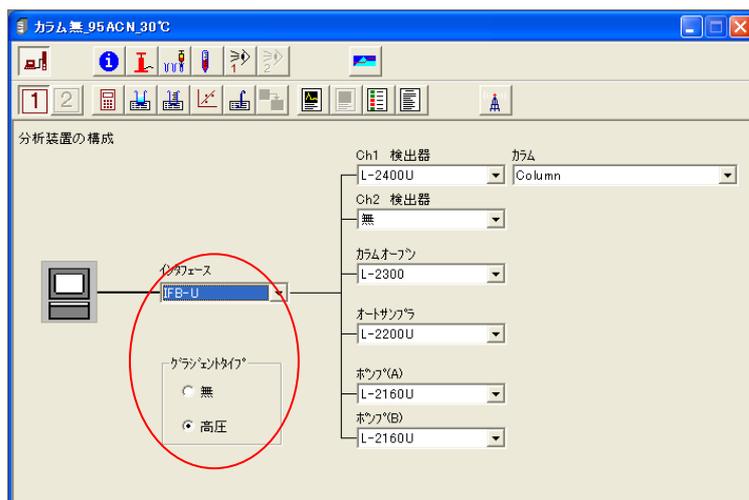
12-i アプリケーション変更アイコンをクリックして、利用者（研究室）を選択する。

12-ii 分析ファイル設定アイコンをクリックして、ファイルオープン画面を開く。分析に適したファイルを選択し **OK** をクリックする。

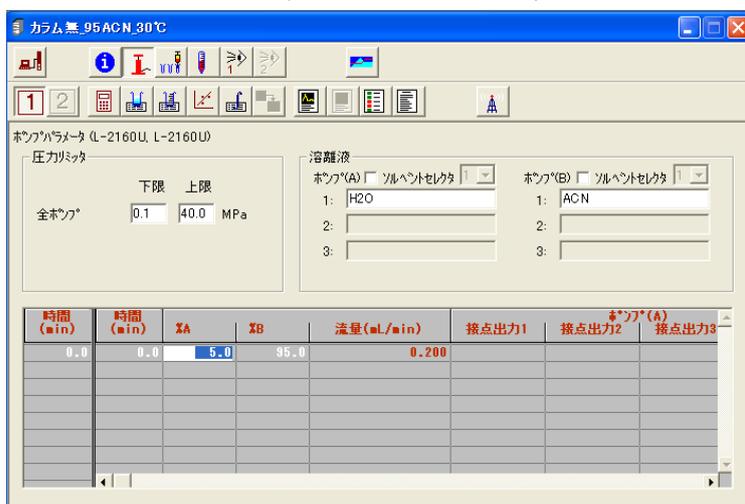


補足 分析ファイルを新規に作成し、パラメータ設定を行う場合は以下のとおりにする。

1. “ファイル”メニュー中の“新規作成”をクリックする。
2. “新規”ダイアログの“分析ファイル”を指定し、**OK** ボタンをクリックする。
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」、グラジエントタイプは「高圧」に設定する。

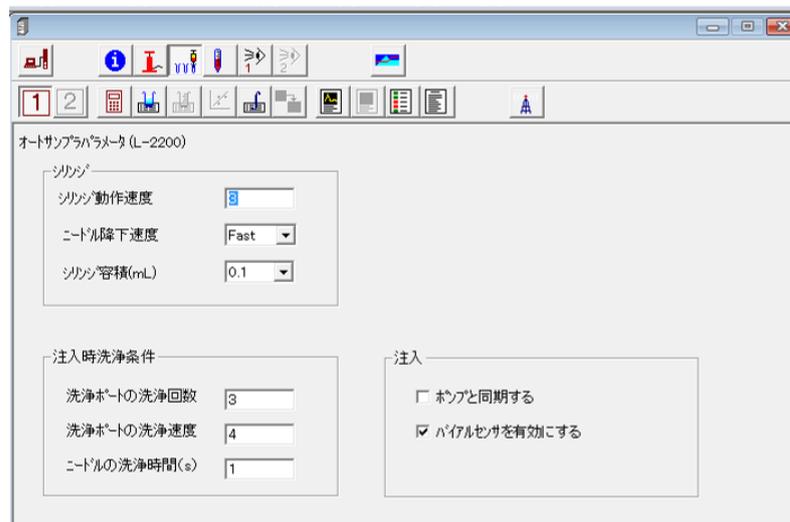


- 12-iii [変更なしなら操作不要] 選択した分析ファイルの画面でポンプパラメータのアイコンをクリックして、ポンプの送液条件を設定できる。圧力リミッタの上限と下限に、カラムの仕様に合った値を入力する。下段の表にグラジエント条件を設定する。流量は 0.200 mL/min が標準である。入力した列を訂正、削除する場合は、左ドラッグで選択し、D-2000Elite の編集タブで操作する。



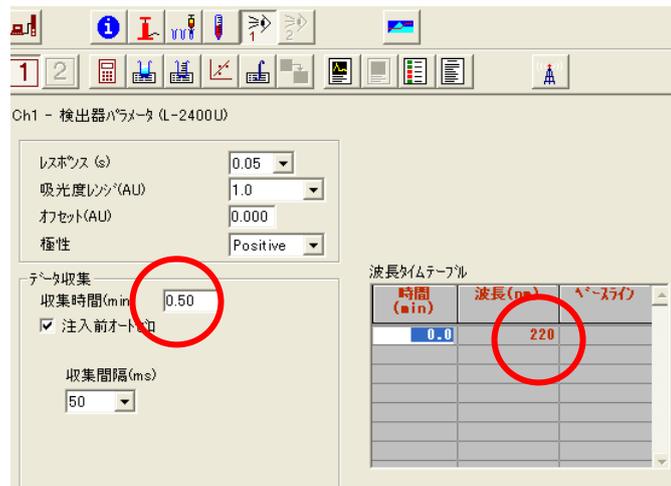
注意！ セルの耐圧がかなり低いので、カラムや抵抗管を接続していないと破損する可能性がある。この場合は、圧力リミッタも低い値(数 MPa)に設定すること。

- 12-iv [変更なしなら操作不要] オートサンプラアイコン  をクリックして、オートサンプラの動作条件を設定できる。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。



- 12-v [変更なしなら不要] カラムオープンパラメータのアイコン  をクリックして、設定温度を入力できる。またカラムの最高使用温度を入力する。

- 12-vi [変更なしなら不要] Ch1-検出器パラメータのアイコン  をクリックして、パラメータを設定できる。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。

- 12-vii [メソッドの変更をしていないなら不要] 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)。

13. LC のテーブルの設定

- 13-i 測定試料が既に用意されているのであれば、サンプルラックにセットする (サンプルは他の作業の待ち時間の間に作ってもよい)。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。



一番手前右端が 200 番

- 13-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。
- 13-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。
- 13-iv [テーブルを変更していないなら不要] 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)。

14. データ収集

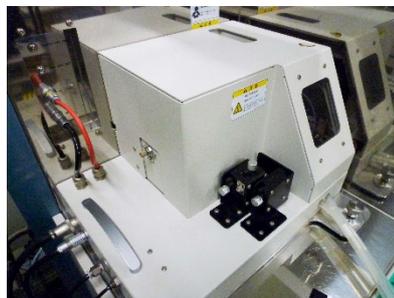
データ収集モニタのアイコン  をクリックして、データ収集用のサンプルテーブルの中から、先程保存したサンプルテーブル名を選択し、**OK** をクリックする。右フレームにあるシステムの状態が「モニタ」になっているかどうか確認する。「ポンプのレディ状態待ちです。」になっていたら、**II** ポンプアイコンを **ON** にし、**ベースラインが安定するまで待つ**。待っている

間に、次の【MS のパソコンの設定】を行う。

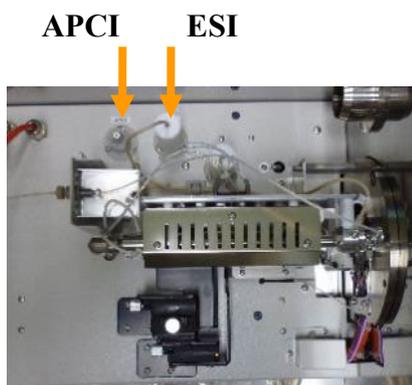
ノイズテストを行う場合には、ノイズテスト をクリックすると自動で開始される。

【MS のイオン源部の準備】

1. セミマイクロ 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。



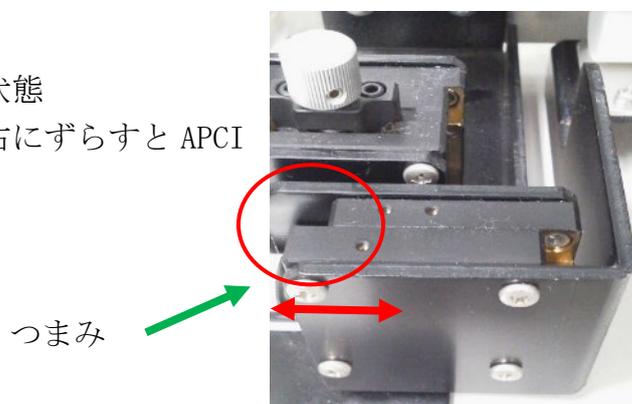
モードを切り替えるときは、コネクタを入れ替える。カバーはネジ回しになっているので、まずカバーを外してからゆっくりコードを引き抜く。取り付けるときは、コネクタを差し込んだ後、カバーを閉める。



(セミマイクロ ESI/APCI を上から見たところ)

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

図は ESI の状態
手前の板を右にずらすと APCI

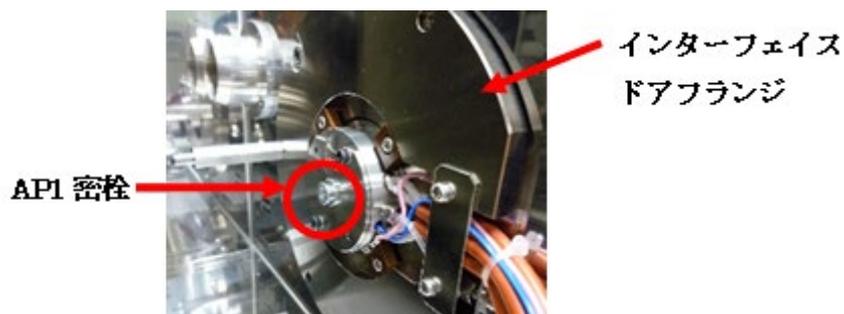


操作盤はイオン源の前方部についている。上図のずれている赤丸の部分を

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。

3. 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なく。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。

※ 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損を招くので注意して外す。



4. 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. セミマイクロ ESI/APCI 共用イオン源のカバーが外れていたなら、取り付ける。

6. 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)。



7. 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、どちらも上から見て反時計回りが 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。
 - 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。

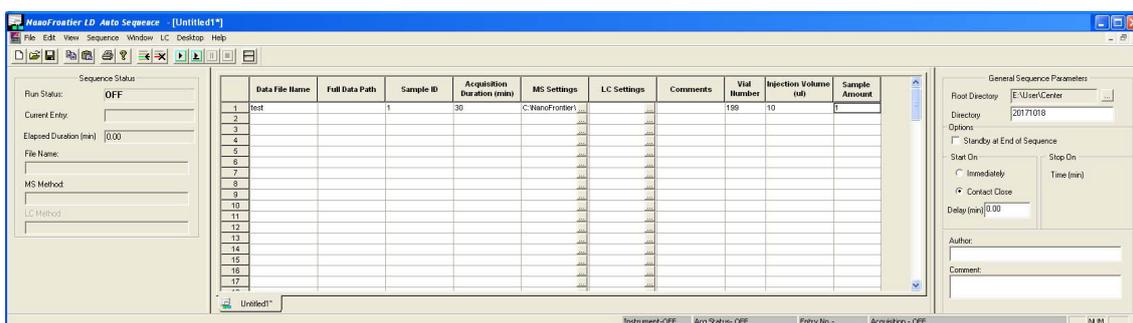


Semi-Micro ESI Controller ユニット

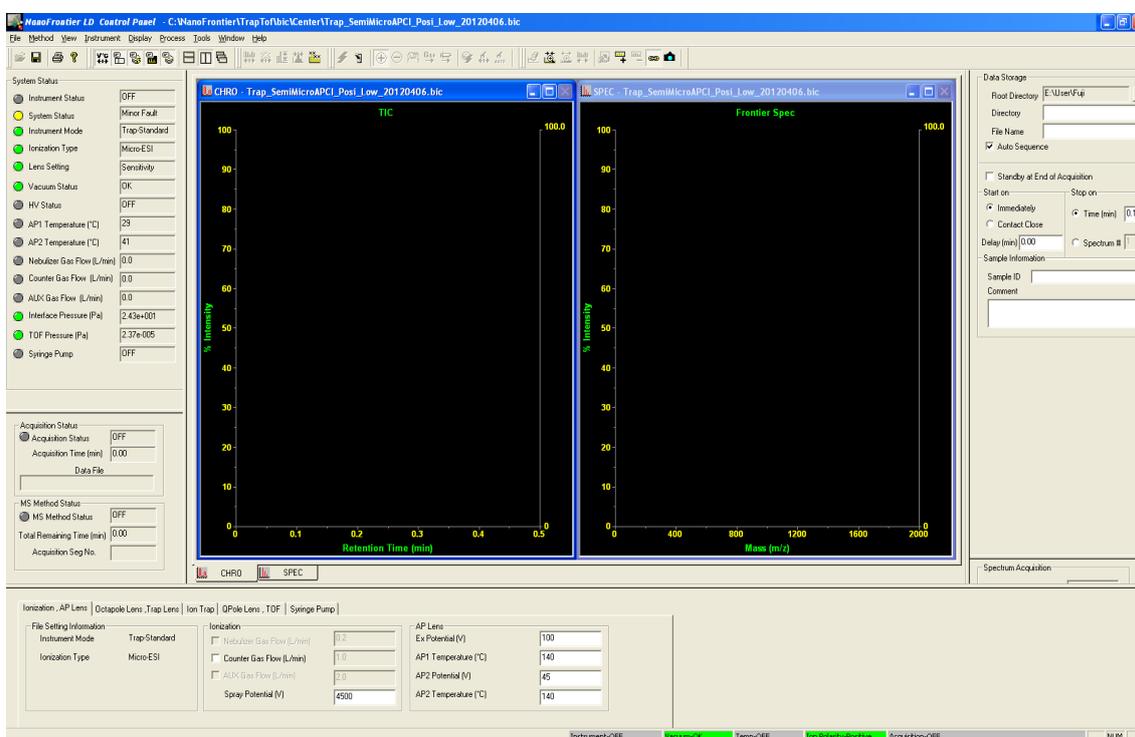
通常設定 : ガス温度 → 400~500 °C (標準 480°C)
 AUX FLOW → 5~10 L/min (標準 10L)
 NEB. FLOW → 1~1.5 L/min (標準 1.5L)

【MS のパソコンの設定】

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。
2. LC-MS での測定では Auto Sequence のアイコンをダブルクリックして、自動測定の画面を立ち上げる。同時に Control Panel が立ち上がる。

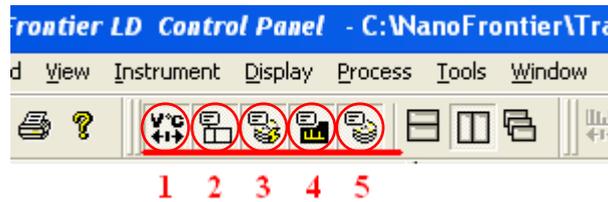


NanoFrontier LD Auto Sequence 画面



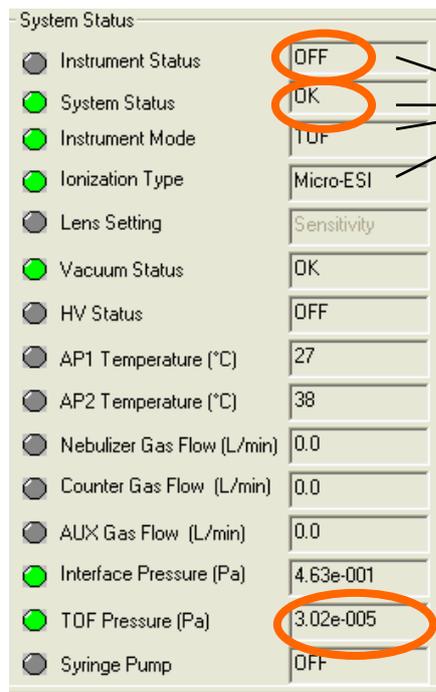
NanoFrontier LD Control Panel 基本画面

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。



【Control Panel の設定】

- 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** → **Instrument-Standby** にする。もしくは、ツールバーのボタン  をクリックする。左フレームの System Status が Mainer fault から OK になることを確認する。



現在の装置ステータス、装置モード、イオン源が表示される。(イオン源をAPCIに変更してもフレーム上ではESIと表示される)

- TOF Pressure (Pa) が 10^{-4} 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^{-5} Pa をあらわす。
- 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)。

6. 測定したい試料に応じて Posi モード(正イオン)⊕か Nega モード(負イオン)⊖かを選択し、対応するボタンをクリックする。
7. **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_Pos_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!!)

9. 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。

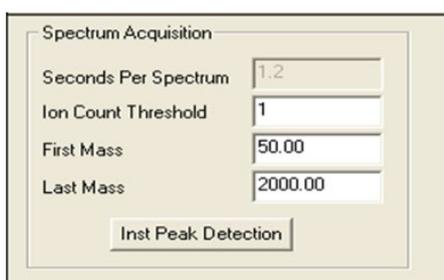


- Ionization, AP Lens タグを開き、Saplay Potential (イオン化電圧), Ex Potential (励起電圧)を変更する。
- Trap モードの場合は、Ion Trap タグでキャリブレーションするサンプルの質量数に合わせて、Accumulation Mass の範囲を変更する。
- QPole Lens, TOF タグを開いて QPole RF Voltage を変更する。目安は、サンプルの m/z 1000 以上で 1000 [v]程度。
- Syringe Pump タグを開き、Detector Potential を変更する。

- ※ 標準プリセットとしていくつかの電圧設定を用意しているが、 m/z 200 以下を見る場合は 200V を推奨する。逆に、 m/z 1000 以上を見る場合は 1000V 程度の設定にする。
- ※ 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。LC-MS の場合は、測定前に事前に用意しておく必要があるので、注意すること。

10. 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 (最大レンジ) に設定する。



11. すべての設定が完了したら、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。Instrument Setting ファイル (bic) の変更をしたときは、研究室のフォルダを用意してファイルに名前をつけて保存 (または上書き) すること。bic フォルダに入っている標準ファイルは上書きしないように注意。
12. **Instrument** → **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。

【Auto Sequence の設定】

13. 真ん中のフレームの各項目に入力する。意味がない項目でも全て入力する必要がある。

	Data File Name	Full Data Path	Sample ID	Acquisition Duration (min)	MS Settings	LC Settings	Comments	Vial Number	Injection Volume (ul)	Sample Amount
1	test		1	30	C:\NanoFrontier\...	...		199	10	1
2										

「Data File Name」 (必須) ファイル名

「Sample ID」 (※) 任意の数字

「Acquisition Duration」 データの取りこみ時間

「MS Settings」 (必須) MS 設定ファイルのパス (... をクリックして指定)

- 「Comments」 コメント 任意で使用可能
- 「Vial Number」 (※) オートサンプラーのバイアル番号
- 「Injection Volume」 (※) オートサンプラーの注入量
- 「Sample amount」 (※) サンプル量 (任意の数字)
- (※印は、入力する意味はないが、とりあえず必要)

MS Settings は、MS パラメータの **bic** ファイルだけでなく、メソッドファイルを読み込むこともできる。詳しくは **MS/MS 測定** のマニュアルを参照。

File Name にはサンプル名を入れておくのがわかりやすい。次の項目で入力する Directory には測定年月日がよい。

14. 上記について、HPLC 側の **LC テーブルの設定** に合わせて、必要な数だけ入力する。
15. General Sequence Parameter の欄に必要な事項を入力する。

- 「Root Directory」 ルート保存フォルダ名
- 「Directory」 保存フォルダ
 - ※ フォルダは、Root Directory ¥ Directory ¥ Data File Name となる。
- 「Standby at End of Sequence」 不要なのでチェック外す
- 「Start on」 **Contact Close、Delay 0 min とする(※)**
- 「Author」「Comment」 任意

※ Contact Close にしないと LC と連動しない

The screenshot shows a dialog box titled "General Sequence Parameters". It contains several input fields and options:

- Root Directory:** E:\User\Center (with a browse button)
- Directory:** 20171018
- Options:**
 - Standby at End of Sequence
- Start On:**
 - Immediately
 - Contact Close
- Delay (min):** 0.00
- Stop On:** Time (min)
- Author:** (empty text box)
- Comment:** (empty text box)
- NUM** button at the bottom right.

【試料の調製】

- 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。
 - 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。
 - 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。
 - 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。
 - 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。
 - 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 10^6 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う装置が壊れるので、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】

1. 【MS のパソコンの設定】 System Status の AP1, AP2 が 100°C 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。
2. **Instrument** → **Instrument-On** にする。またはツールバーの  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. Control Panel ウィンドウの 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、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)。

5. Auto Sequence ウィンドウを見て、Start  アイコンをクリックする。Run Status が **WAITING** に変わるまで待つ。
6. 【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（テーブルに複数のデータを入力した場合は、連続分析実行をする）。
7. 測定中は Control Panel から、記録したいスペクトルを選択した状態で  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。  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。
8. 測定終了後、**一分析実行** を続けて行うには、試料を入れ替えてもう一度実行する。このとき、Auto Sequence 側も手順通り設定しておくこと。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  をもう一度クリックする。

その他の作業

【パラメータファイルを変更する場合】

測定が停止している状態で、LC のパソコンからポンプ  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！！

測定が停止している状態で、LC のパソコンからポンプ  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】

測定が停止している状態で、LC のパソコンからポンプ **II** を停止し、溶媒ビンを取り替える。溶媒の入れ替えのため、必ず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）。

【高分解能データを取得する場合】

予めシリンジポンプを用意しておき、使用するシリンジや流量を設定しておく。シリンジに標準試料を入れて空気を抜き、MS に接続する直前までの状態まで用意しておく。

スペクトルを測定中、目的のピークが検出されたら、すぐにイオン源を HPLC 接続から、シリンジポンプ接続へと交換し、シリンジポンプを ON にする。標準試料のピークが検出されたら、すぐに元に戻す。**作業は手早く行うこと。**

【終了操作】

1. 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。汚れがひどい場合は、MS 側の電源を切った後に HPLC のみで洗浄するようにする (後述)。
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 の **Instrument** → **Instrument-Off** にする。

——測定用の PC を使って先にデータ処理をするには *Auto Sequence* を停止する必要があるが、この *Instrument-Off* まで進めれば停止することができる (再立ち上げが必要な場合はここでデータ処理できる)。

5. Semi-Micro ESI Controller のヒーター温度が **40°C 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、MS の Control Panel 画面の System Status が Minor Fault になり、LC のモニタおよびポンプが停止してエラー音がする。
6. 取手を持ってイオン源部を左側にスライドさせて、API 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。**
7. MS を使用しないのであれば、窒素ガスジェネレーターとヘリウムガスを止める。
8. Auto Sequence の **赤× (閉じる) アイコン**の下にある 小さい方の×アイコン をクリックして、現在ある測定リストを閉じる。次に **赤×アイコン** を押してプ

ログラムを閉じる。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。

9. LC のパソコンから、システムの状態のアイコン  をクリックして、エラー解除する。
10. 停止しているポンプ  を再稼働し、カラムを洗浄する。
11. カラムの洗浄が終わったら、取り付けと同じ手順でカラムを取り外し、備え付けのチューブと交換する。
12. LC のポンプが  まだ動いていたら止める。
13. 溶媒は、A 液がアセトニトリル、B 液が水（超純水）にしておくこと。

溶媒やバッファーを戻したときは、ここで装置側の溶媒置換を行う。溶媒置換をするときは、溶媒の入れ替えをした後に、モジュール設定画面を開き、**ページ操作**を行っておく。次に **マニュアル設定** で流量と圧力上限を設定した後、ポンプ  を稼働する。このとき、**必ず圧力上限を 5MPa 以下に変更すること**。洗浄が終わったらポンプを止める。

イソプロパノールなどの粘性のある溶媒を使用したときや、バッファー等を添加した溶媒の場合は、カラムを外した後に、別途記載のバッファー抜き作業を行う（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。

14. D-2000 Elite を閉じる（データ収集モニタが動作中であれば、30 秒程度かかる）。
15. LC のパソコンをシャットダウンする。
16. LC のポンプ A、ポンプ B、UV 検出器、カラムオープン、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。
17. 使用記録をノートに記載する。

【バッファを抜く作業】

バッファやイオン対試薬は、高濃度のイオン性試料を入れているのに相当するため、サンプル測定に使用する正負イオンとは逆のイオンモードにおいて、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ふことがあるので、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）。
- D) 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。

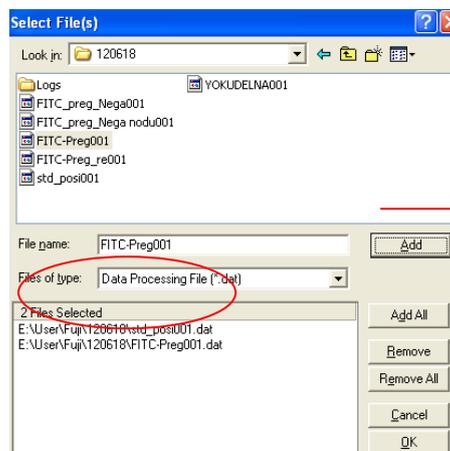
2. Data Processing のアイコン  をダブルクリックする。

※ 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。



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。



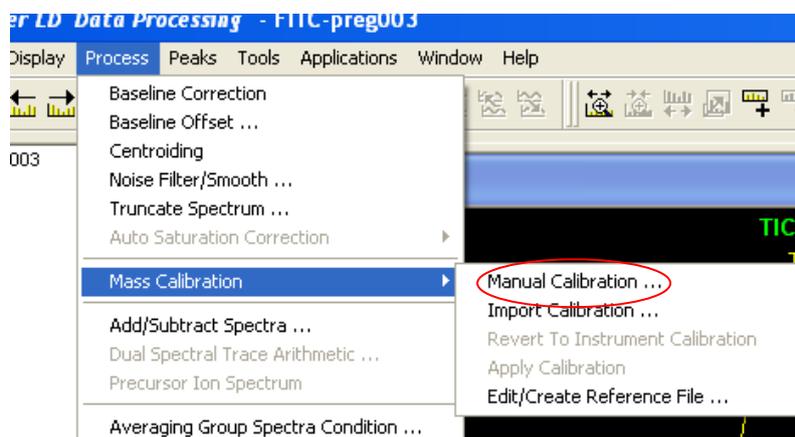
同一画面内のスペクトルの横軸を同調させる。

5. キャリブレーション

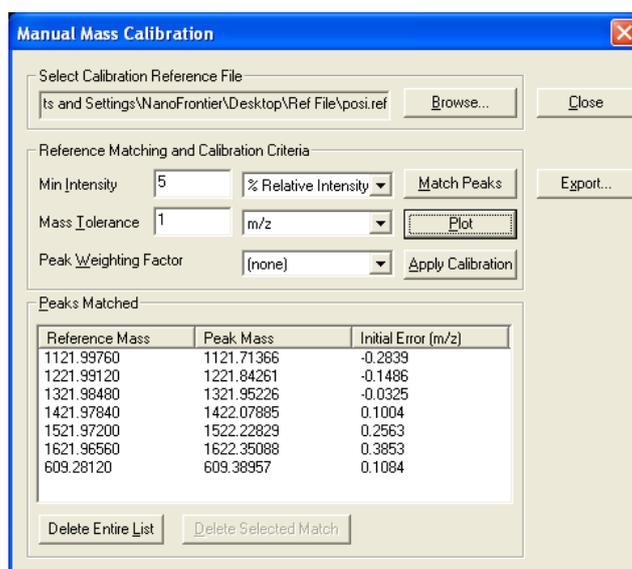
LC オートサンプラーから標準試料を注入した場合は、以下の手順でスペクトルを校正する。

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。



- 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⁺: [Tetrabutylammonium]⁺)

609.2812([Reserpine] + H⁺)

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⁺)

821.3960([Glycyrrhizin] - H⁺)

ウルトラマーク : 1100-1200 付近に 5 本

- 5-v **Match Peaks** をクリックする。
- 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2~3点をとった場合

- a) **Apply Calibration** 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。

【精密質量測定の実施（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。

3. **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** をクリックする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 しか計算されないため、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。