

LC/MS
(液体クロマトグラフ質量分析計)
操作手順書

Orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific)

横浜国立大学 機器分析評価センター

作成日	2026年 4月 2日	
手順書 No.	MS – Exploris240-2β	
作成	承認	

目次

1. LC/MS の概要.....	- 3 -
2. HPLC の準備 (Direct Control)	- 8 -
3. MS の準備① イオンソースの着脱とプローブ交換	- 18 -
4. MS の準備② マスキャリブレーション (Orbitrap Tune)	- 24 -
5. シーケンスによる測定 (Sequence Setup)	- 33 -
6. HPLC メソッドの作成と編集 (Instrument Setup)	- 38 -
7. HPLC の終了操作.....	- 45 -

【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。

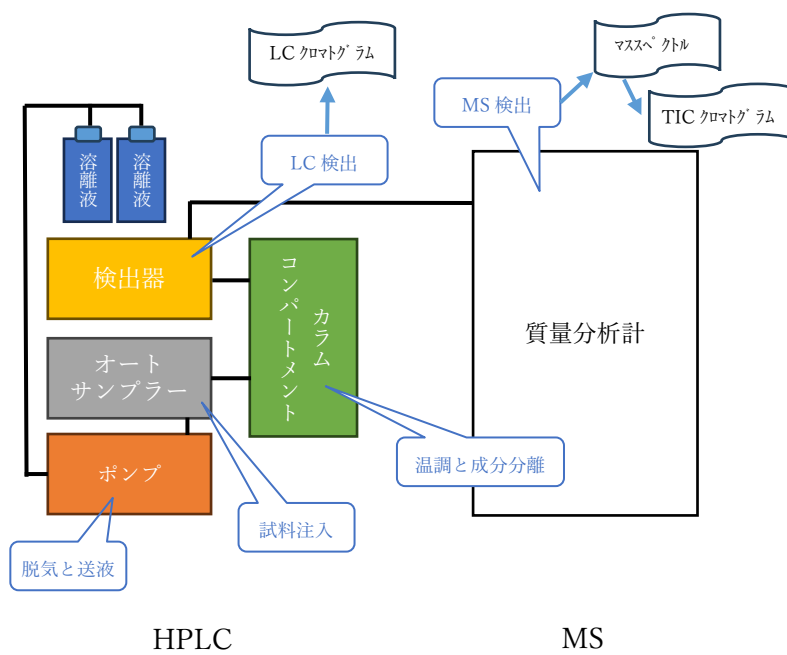
- 本マニュアルの**印刷およびダウンロード**につきましては、当該設備の利用者および利用予定者に限り認めます。**オンライン上での閲覧**についての制限はございません。
- 登録から抹消された利用者は、印刷またはダウンロードしたファイルを破棄してください。
- 著作権および免責につきましては、こちらの URL (https://www.iac.ynu.ac.jp/site_policy) にて詳細が記載されています。

1. LC/MS の概要

A. HPLC の概要と装置構成

LC/MS は、液体クロマトグラフィ (LC) によって溶液試料の成分を分離し、マスペクトロメトリー (MS) で検出する手法である。MS の略語は手法に対して使う用語であるが、装置のことを言うこともある。また、一定の速度で高圧注入できる LC 法を特に高速液体クロマトグラフィ (HPLC: High Performance Liquid Chromatography) といい、LC/MS では必須技術である。HPLC の装置は水溶性溶媒に向けた仕様と脂溶性溶媒に向けた仕様があるが、MS を使う場合は水溶性向きにカスタムされている。したがって、水、メタノール、アセトニトリル、2-プロパノールなどの水と混合しやすい溶離液が対象であり、それらにサンプルが溶解すれば測定できる。さらに、流路がバイオコンパチブル仕様となっており、生体関連試料についても不活性処理などがされ、相互作用が最小限になるように設計されている。

HPLC の基本装置構成は下図の通りであり、以下に各パーツについて個別に説明する。



- 基本仕様

HPLC は、流せる溶離液の流速や、使用できるカラムの粒子径と耐圧、配管やセルの耐圧などの条件に応じて複数の機種がある。まず、旧来型の HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) と UHPLC (Ultra High Performance Liquid

Chromatograph) で区別されることがある。HPLC は粒子径が小さいカラムを使うほど背圧が大きくなり、耐圧性能が求められるようになる。旧来型の HPLC の仕様では粒子径 3~5 μm で耐圧が 30~60MPa なのに対し、UHPLC は粒子径 2 μm 以下で耐圧も 100MPa を超える性能がある。粒子径が小さいと分離性能（理論段数）が向上するため、相対的にカラムの長さを短くすることができて、高速分析が可能となる。また、高速分析にすると、時間だけでなく溶離液の消費を抑える効果もある。設置している Vanquish Flex は、103MPa までの耐圧が保証されているため、2 μm 程度の粒子径のカラムが使用できる。

- 溶離液とポンプ

標準的な HPLC では、複数の溶離液をポンプで送り出し、混合して流せるような仕様になっている。最近の装置では、ポンプ 1 基で複数の溶離液を扱えるタイプが多くなっている。また、混合比を自在に変更できるグラジエント溶出が可能な機能を備えている。他には、流路で気泡が発生して不具合を生じないように脱気装置が接続されており、事前に溶離液を超音波洗浄機で脱気する操作が不要になっている場合もある。

- オートサンプラー

標準的な HPLC では、サンプル溶液をバイアル瓶などに入れて自動で注入できるオートサンプラーが備わっていることが多い。オプションパーツに交換することで、マイクロプレートによる多検体測定も使用できることがある。自動注入により定量分析の再現性も高くなるため、利便性以外に性能の向上も期待できる。温調機能があれば、溶媒の蒸発を抑制したり、不安定なサンプルの劣化を防ぐこともできる。

- カラムコンパートメント（カラムオープンともいう）

成分を分離するための円筒をカラムと言い、カラムにはシリカゲルを基材とした充填剤が詰まっている。分離を安定させるには温度が重要であり、カラムコンパートメントは、これらのカラムを収納して温調する機能を持つ。また、カラムや流路を切り替えるバルブが付いている場合もある。

- 検出器

ポンプで一定の流速で送り出されてくるため、検出器を通すことで流れてきた成分の信号を検出すると、時間経過に対する強度でプロットすることができる。このようにして得られたチャートを クロマトグラム という。カラムで保持しにくい成分から検出されることから、この時間を保持時間（Retention Time）という。

HPLC の検出器でもっとも代表的なのは、紫外可視分光光度検出器（UV 検出器）

である。ランプ光源から発生する紫外線等の電磁波を一つの波長に絞り、フローセルに照射することで、リアルタイムに流れてきた成分の電磁波の吸収を見ることが出来る検出器である。成分が設定した波長に吸収を持てば、クロマトグラムにピークとして検出される。このほかにもいくつか検出器があるが、本装置に備え付けられている2種類を以下に紹介する。

◆ PDA（またはDAD）検出器（フォトダイオードアレイ検出器）

UV 検出器はある範囲の1波長を選択して検出するが、PDA（フォトダイオードアレイ検出器）は複数の波長を同時に測定することができる検出器である。多波長検出の他に、全波長を連続的にスペクトルとして取り込むこともできるため、「保持時間×波長×強度（クロマトグラム×スペクトル）」の3次元データを得ることができる。単波長で重なってしまうクロマトグラムも分離できることがある。一方、UV 検出器と同じ欠点として、溶媒の吸収と重なるような短い波長領域しか吸収を持たない成分には適用しにくい。

◆ CAD 検出器（荷電粒子検出器）

（作成中・・・）。

B. MS の概要と装置構成

[質量分析計法]

質量分析法（MS）は・・・

- (1) 測定したい成分分子をイオン化（電子を放出もしくは獲得）
- (2) 真空チャンバーに送り込む（正負イオンと中性分子の分離も伴う）
- (3) 質量分離装置でイオン質量に応じて分離
- (4) 検出器に当たったときの電流値などで信号を検出

という一連の機構でデータを取得する方法である。得られるデータをマススペクトルといい、その横軸はイオンの質量を電荷数で割った無次元量として、「 m/z 」という数値が得られる。 m/z は、「m over z」と読み、数字が100であれば「 $m/z100$ 」のように表記する。多くの低分子化合物は電荷数が1になるので、実質的にイオン化された分子の質量を表している。また、電子は原子よりも遥かに軽いので、電荷数+1もしくは-1を与えるような電子1個の増減は、小数点以下の m/z にしか影響しない。よって、 m/z は分子に含まれる原子の質量、すなわち分子量を反映した数字が得られると言える。ただし、マススペクトルでは同位体質量の区別もされるため、厳密には分子量ではなく、同位体で分かれた複数ピークの同位体パターンとして m/z に表れる。

[MSにおけるクロマトグラム]

最近の質量分析計は、1枚のマスペクトルの取込みレートも高速化しており、HPLCの検出器と同等か、それ以上で取り込める場合もある。HPLCで分離した成分を一定間隔で測定していき、それらを何枚も重ね合わせてみると、[保持時間] × [m/z] × [信号強度 (電流値など)] の3次元のスペクトルが得られることになる。さらに、すべての m/z のピーク強度の合計を求めて1つの値にまとめると、[保持時間] × [全イオンピーク強度] の2次元スペクトルになる。これを TIC (Total Ion Current) クロマトグラムといい、HPLCで強度のみがアウトプットされる検出器と同様のクロマトグラムが得られるようになる。したがって、LC/MSでは、このような TIC クロマトグラムと、各点のマスペクトルが同時に得られる手法であると言える。

[マスペクトルの正負]

MSでは、引き込むイオンを電極によって選択できるため、目的成分が正イオン (Positive) と負イオン (Negative) のどちらになりやすいかでマスペクトルの取得モードを選択することができる。最近では電源を切らずに測定中に瞬時に正負を切り替えができる装置も多くなっている。イオン化の手法によっても異なるが、付加反応や脱離反応を伴う場合は、酸性化合物が脱離反応によって負イオンになり、中性または塩基性化合物が付加反応により正イオンになりやすい傾向がある。また、イオン性の化合物は正負イオンに解離し、それぞれのモードで片方のイオンだけが検出されることが多い。十分な強度で検出するには適切なモード選択をする必要がある。

[イオン化後の質量]

MSは分子の構造解析や同定に用いるため、理想的には分子量が直接判明するのが望ましい。しかしながら、分子はイオン化されるときにラジカル反応や、解離・付加反応などの化学反応を伴うことがあるため、必ずしも分子そのものの質量とピーク位置は一致しない。分子量が100の成分でも、 m/z 100にピークが検出されるとは限らず、使用したイオン化法や分子構造を反映した結果が得られる。たとえば、LC/MSの正イオンの測定では「プロトン付加分子 ($M+H^+$)」になることが多く、 m/z 101に検出されるようになる。その他について詳しくはここでは説明しないので、成書などを参考にさせていただきたい。

[LC/MSのイオン化法]

先に説明したように、イオン化は反応を伴うため、使用するイオン化法によって目的成分の検出や解析ができるかどうか重要となる。基本的にLC/MSはソフトイオン化法と呼ばれる手法であり、イオンの解離反応は起こりにくく、正イオンであればイオンの付加反応 ($M+H^+$ 、 $M+Na^+$ など)、負イオンであればプロトンの脱離反応 ($M-H^-$) によりイオン化することが多い。一般的なLC/MSのイオン化法は、エレクトロスプレー

イオン化 (ESI) と、大気圧化学イオン化 (APCI) が使用できる。

- ESI は LC などから流れてきた溶液を電圧がかかった細いスプレーニードルで噴霧することで、帯電エアロゾルを生成し、化合物をイオン化する方法である。ESI は液中の電離状態を反映しやすいことから極性の高い成分の検出に向けた手法である。
- 一方、APCI はスプレーニードルで噴霧した先に針電極を設置する点が異なっており、液滴が通過する際にコロナ放電により溶媒蒸気がイオン化し、それとの化学反応により溶質成分をイオン化する手法である。H₃O⁺ などの活性の高い反応イオンとの化学反応を用いることから、水中で電離していない化合物に対しても有効であり、中極性の成分が検出しやすくなる。

ESI または APCI で検出可能なのは中極性までであり、検出できない成分は GC/MS や MALDI/MS を使用する必要がある。

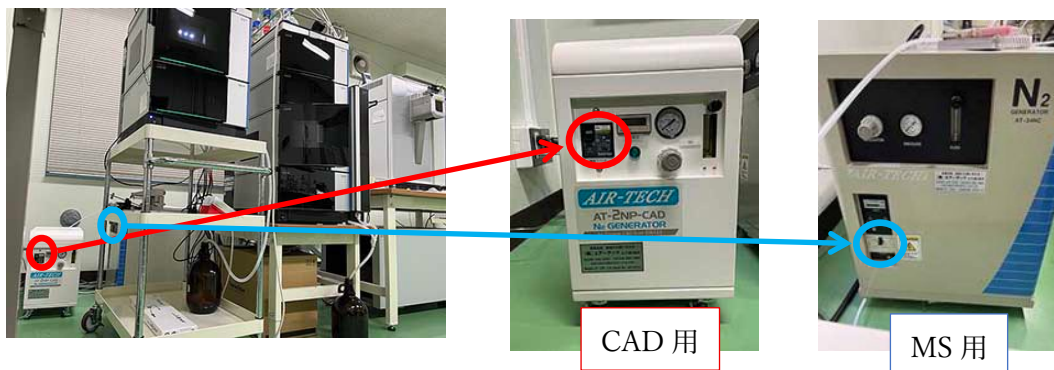
(ここに写真)

(ここに写真)

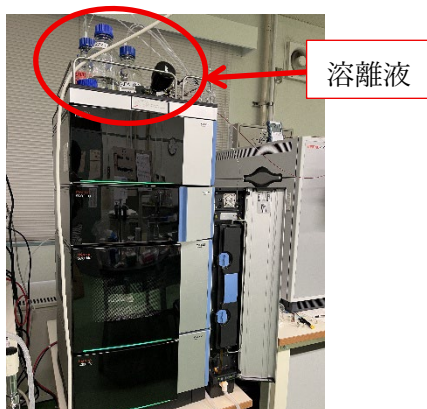
(以下、作成中・・・)

2. HPLC の準備 (Direct Control)

- 2.1. 窒素発生装置(MS用とCAD用の2台)のブレーカースイッチを上げてONにする。
CADは検出器単体で使わない場合でもHPLCを使うときは起動する必要がある。



- 2.2. 使用したい溶離液の残量を確認する。たとえば200 μ L/minであれば、288mL/day消費するので、十分な量を用意する。



【標準の溶離液】

- A H₂O (超純水)
- B アセトニトリル (CH₃CN)
- C メタノール (CH₃OH)

LC/MS で使用できるバッファー

LC/MS を使用する HPLC は、リン酸やナトリウムなどの不揮発性のバッファーを使用してはならない。アンモニア水は耐塩基性カラムが必要なので注意。以下のバッファー以外を使用するときは、必ず担当者に相談すること。また、高濃度を使用するときも相談する。

- ギ酸 (Formic acid) HCOOH pKa 3.75 (通常 0.01~0.1%)
- 酢酸 (Acetic acid) CH₃COOH pKa 4.76 (通常 0.05~0.5%)
- アンモニア水 (Ammonia water) NH₃(aq) pKa 9.25
- ギ酸か酢酸のアンモニウム塩 (通常 2~10mM)

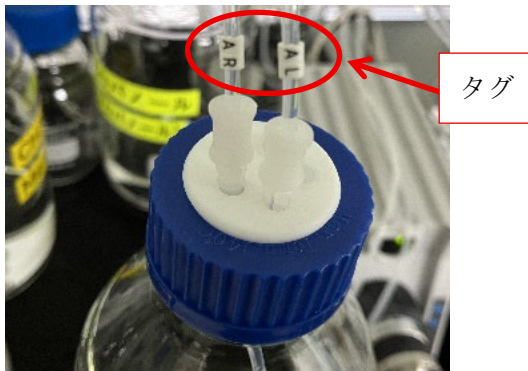
溶離液にバッファーを使用する場合

基本的にバッファーを使用後は、バッファーを入れていない溶離液に交換して洗浄しておくことが望ましい。ABC の 3 ラインが使用できるため、たとえば交換せずに使用するには以下のような方法がある。

逆相カラムの場合

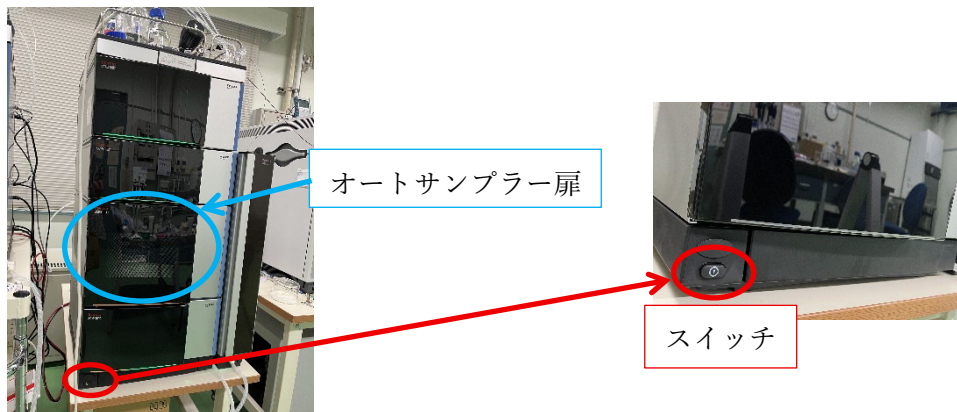
A 0.1%ギ酸水溶液、B アセトニトリル、C 0.1%ギ酸-アセトニトリル溶液
使用時は A と C を使い、カラム洗浄時は B 100%にする。洗浄後は A と C の瓶を交換し、カラムを取り外すか、またはパージ作業をすれば元に戻せる。

- 2.2.1. 水は劣化しやすいので、1 週間に 1 回以上は交換することを推奨する（基本的に使用のたびに交換する）。水は 208 号室の超純水製造装置から採水できる。配管は「A」（「AL」と「AR」）のタグが付いている 2 本のチューブを接続する。



- 2.2.2. 有機溶媒については、通常は B（BL と BR）がアセトニトリル、C（CL と CR）がメタノールになっている。別の溶離液に交換したい場合は入れ替える。
- 2.2.3. 10%メタノールはニードルウォッシュ液なので必須である。足りなくなっていたら管理者に相談する。

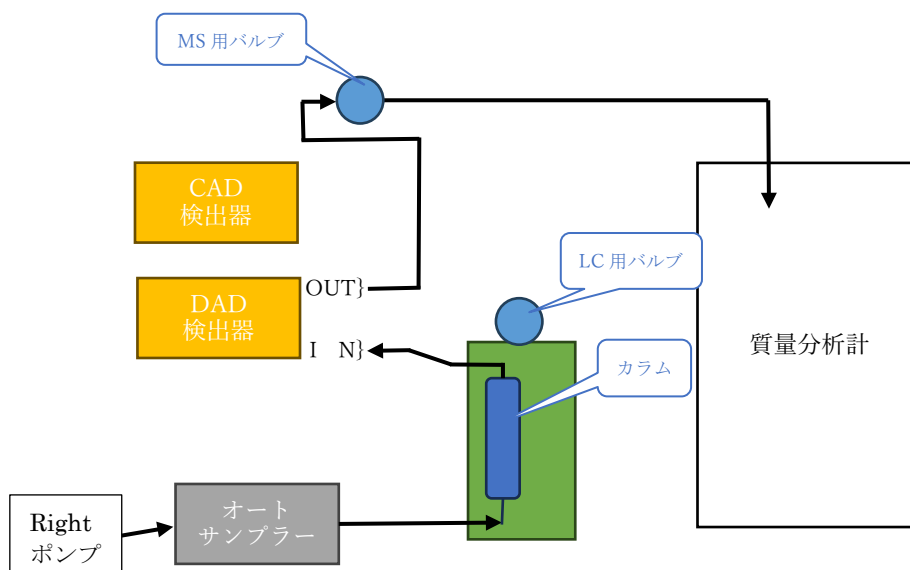
- 2.3. HPLC 本体の LED が消灯していたら電源が切れているので、左下にあるスイッチを押して電源を入れる。しばらくイニシャライズが自動で始動する。このとき、後々の操作で必要になるので、オートサンプラーの開いている扉を閉めておく。



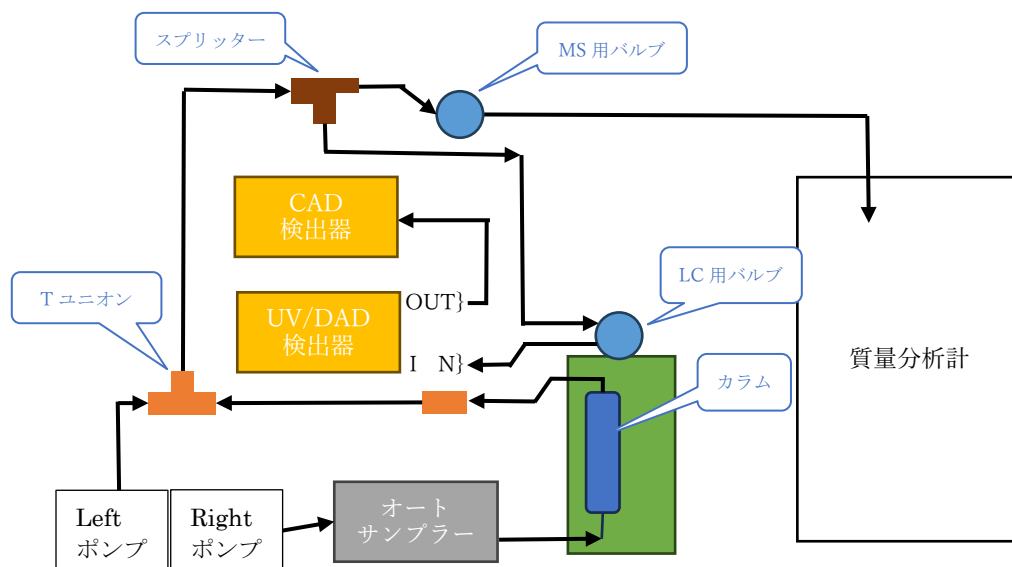
- 2.4. カラムと検出器の配管の接続を確認する。長期間装置を使用していなかった場合は、カラムを接続する前に付属のユニオンを接続して洗浄し、その後にカラムをつなぐとよい。

MS からオートサンプラーまで、どのような流路に切り替えられているか、必ず確認すること。それによって使用するメソッドが変わる。わからない場合は担当者に相談すること。

(A) CAD 検出器を使用しない配管図 (ノーマルモード)



(B) CAD 検出器を使用する配管図 (逆グラジエントモード)



(A)→(B)に変更する場合

まず、①UV/DAD{IN}、②UV/DAD{OUT}、③MS用バルブ に接続していたコネクタを外し、それぞれ(B)用の配管で使っている封止用ユニオンでふさぐ。その後、以下の配管を接続する。◎の側にコネクタがある。

- | | |
|--------------------|---------------------|
| ➤ カラム {OUT} | → ◎Inv (逆グラ) ユニオン |
| ➤ Inv (逆グラ)、スプリッター | → ◎MS用バルブ |
| ➤ LC用バルブ | → ◎UV/DAD {IN} |
| ➤ ◎UV/DAD {OUT} | → CAD 【このみ、PEEK製配管】 |

(B)→(A)に変更する場合

まず、①UV/DAD{IN}、③MS用バルブ に接続していたコネクタを外し、それぞれ(A)用の配管で使っている封止用ユニオンでふさぐ。


次に、②UV/DAD{OUT} に接続していた PEEK 配管をクリップに引っ掛けておく (ユニオンは必要ない)。

その後、以下の配管を接続する。◎の側にコネクタがある。

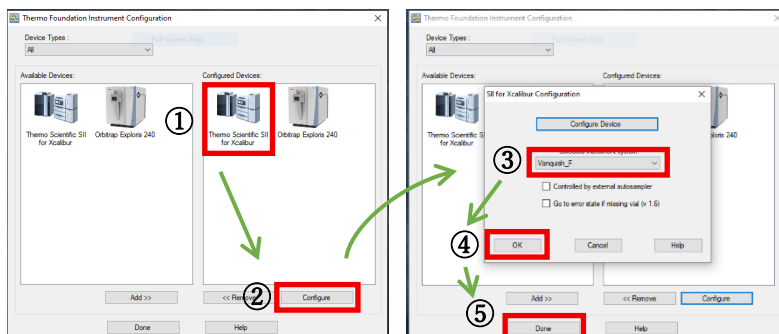
- | | |
|-----------------|----------------|
| ➤ カラム {OUT} | → ◎UV/DAD {IN} |
| ➤ ◎UV/DAD {OUT} | → ◎MS用バルブ |


後で配管図を入れる

- 2.5. 制御用パソコン（左のパソコン）が起動していなかったら起動する。ユーザー名は「Thermo」、パスワードは「Manager1!」と入力する。

- 2.6. 初期設定を読み込むときは、Instrument Configuration  を起動する。右側の Configured Devices から SII を選択して、Configure をクリックする。Select Instrument System をプルダウンメニューから Vanquish_F を選び、Done をクリックする。読み込みまでしばらく待つ。

明らかに Vanquish F を事前に使ったとわかる場合は、この手順は省略してよい。

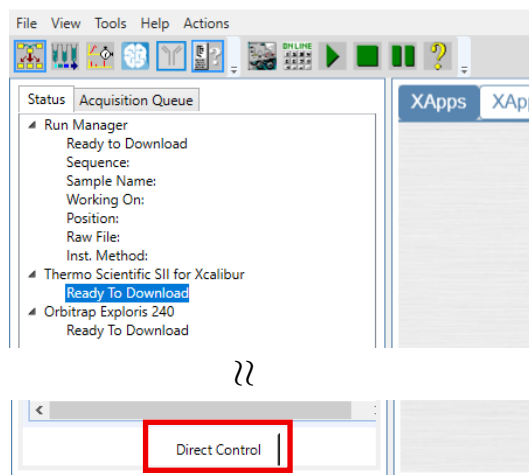




- 2.7. Xcalibur  を起動する。起動には時間がかかるので、しばらく待つ。

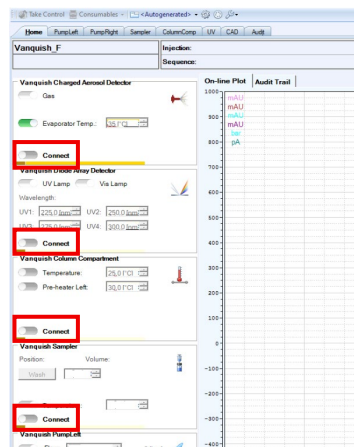
- 2.8. 左にある Status ウィンドウから、Thermo Scientific SII for Xcalibur の Ready to Download をクリックする。読み込みに少し時間がかかる。




- 2.9. 下にある Direct Control のボタンをクリックする。




- 2.10. ウィンドウが新しく開き、左のパネルに接続できるユニットのリストがあるので、すべてのユニットを  **Connect** →  **Connect** に切り替える。使用しないユニットも Connect しないと正常に起動しない場合があるので、すべて切り替える。



一番下のポンプ (Left, Right) は、
ひとつ起動すると両方 Connect になる

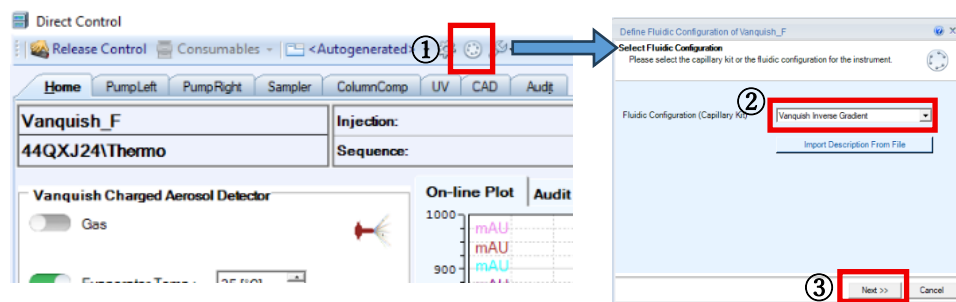
2.11. Vanquish Charged Aerosol Detector (CAD) パネルから、Gas を ON  にする。Gas を On にしないと、後々の操作でエラーになる。

2.12. Vanquish Diode Array Detector (DAD) パネルで、使用するランプ (UV Lamp、Via Lamp) を ON  にする。使用しないランプは消耗するので点灯しなくてよい。

ポンプは Left と Right があり、逆グラジエントの流路に用いるのが Left、カラムコンパートメントに流す (通常の測定をする) のが Right となっている。逆グラジエントを使用するかしないかは設定が必要なので、以下の通り設定する。

2.13. Define Fluidic Configuration アイコンをクリックして、設定画面を開く。

逆グラジエントを使用するときは (A) 「Vanquish Inverse Gradient」、使用しないときは (B) 「Vanquish Single LC」を選び、Next とする。



(A) 使用するを選んだとき

Inverse Gradient Pump を Left、Analytical Pump を Right に設定

⇒ Next

Column Parameters の Length (長さ) と Inner Diameter (内径) を入力

⇒ Finish

(B) 使用しないを選んだとき

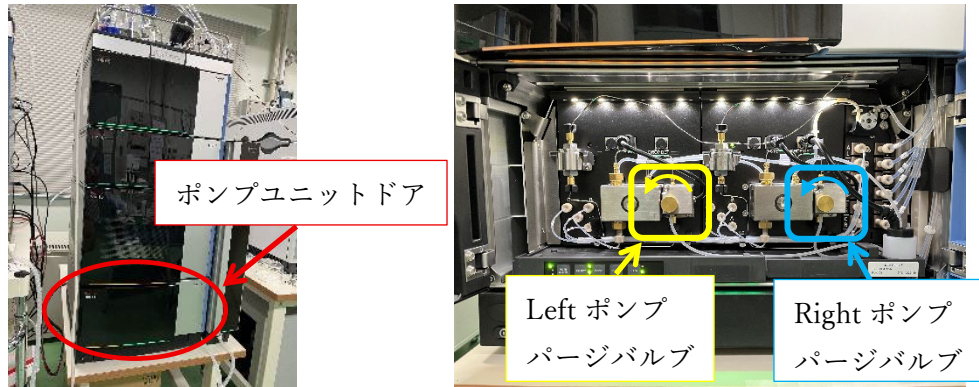
Analytical Pump を Right に設定

⇒ Finish

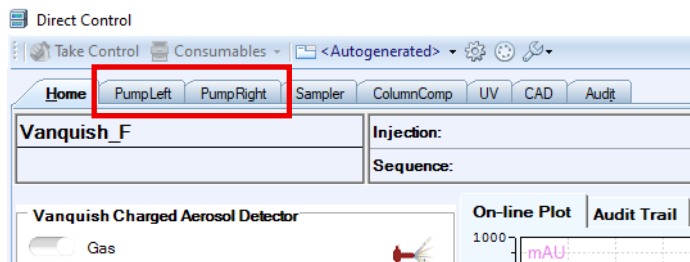
2.14. (A) 使用するの場合は Left と Right、(B) 使用しないの場合は Right ポンプについて、以下の通りページ作業を行う。

=====パージ操作=====

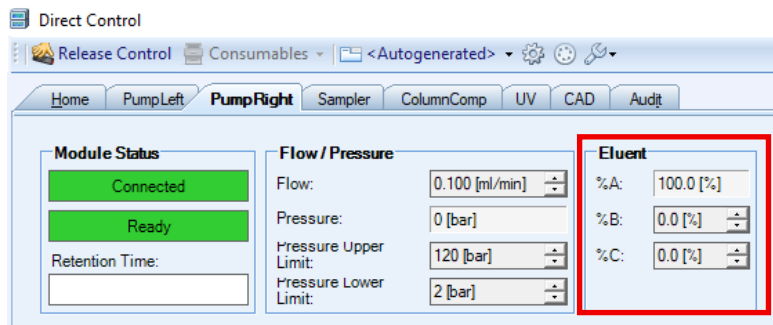
2.14.1. ポンプユニットのドアパネルを開き、パージしたいポンプ (Left または Right) のパージバルブを反時計回りに回して開ける。バルブはノブがゆるゆるになって抵抗がなくなるくらいまで開ければよい。



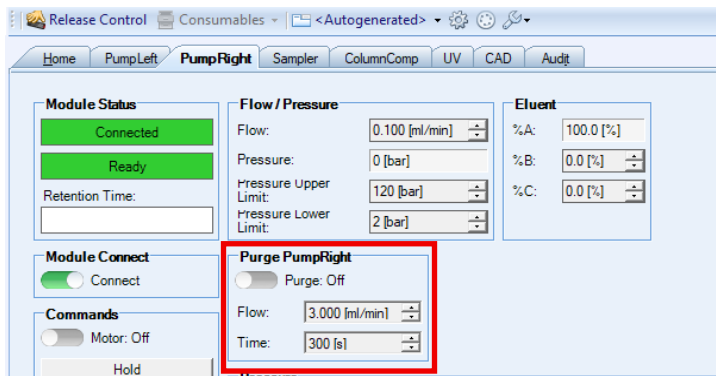
2.14.2. ソフトウェアの Pump Left (逆グラ)、または Pump Right (カラム) のタブを開く。



2.14.3. Eluent の設定の B および C をパージしたい溶離液に設定する。たとえば A を 100% にするなら、B と C を 0% に設定すると自動計算される。



2.14.4. Purge Off から On に変更する。初期設定は 300s であるが、溶離液によって必要時間は異なるので、適宜変更してもよい (初期設定でも問題はない)。



2.14.5. 終わると自動的にパージが停止する。

2.14.6. ほかの溶離液も行うときは、Eluent の比率を変えて同様の操作を繰り返す。

2.14.7. Pump Left と Pump Right の二つを使うときは、同様にポンプタブを切り替えて同様の操作を繰り返す。

2.14.8. すべてのパージが終わったら、忘れずにパージバルブを閉める。

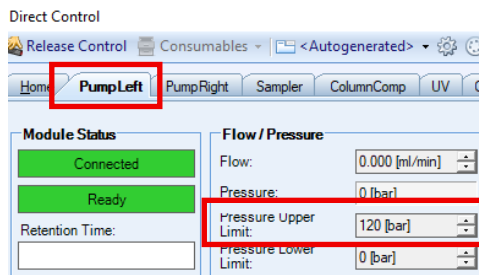
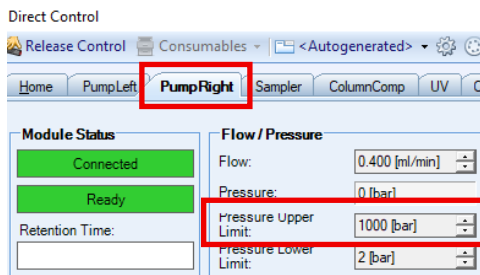
2.15. 溶離液 (A~C) を洗浄に適した比率に設定する。

=====

2.16. カラムを接続している場合 (A) と、接続していない場合 (B) では、かかる負圧が違うので、ポンプの設定を変更する必要がある。

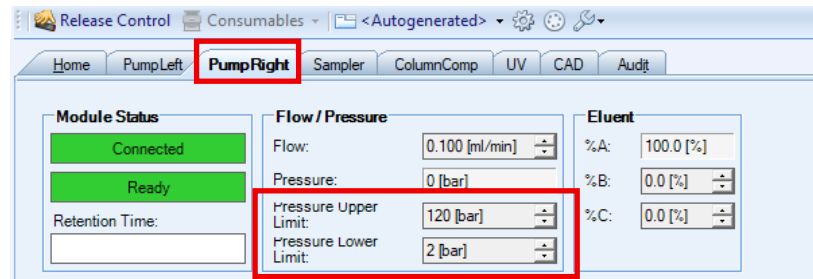
(A) カラムを接続したとき

- ✓ Pump Right のタブを開き、Pressure Upper Limit を カラムの耐圧上限 または 1000bar に設定 (低い方に設定)。
- ✓ Pump Left のタブを開き、Pressure Upper Limit を 120bar に設定。
- ✓ Right と Left の Pressure Lower Limit は必要に応じて設定 (液漏れ検知のために 2bar くらいにするとよい)



(B) カラムを接続しない（ユニオンのみ）とき

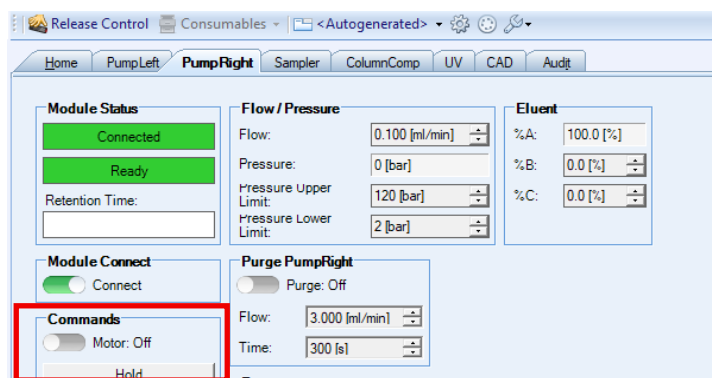
- ✓ Pump Right のタブを開き、Pressure Upper Limit を 120bar に設定。
- ✓ Pressure Lower Limit は必要に応じて設定（液漏れ検知のために 2bar くらいにすることがあるが、カラムを接続していない場合は漏れにくいので不要な場合もある）



2.17. カラムを使っているときは、内径に応じて流量を設定するとよい。カラムを使っていないときは、MS で検出しやすい適度な流量に設定する（たとえば 0.2~1mL/min）。

[注意] 最大流速は 2mL/min であるが、実際は耐圧条件で使用できないことがある。
新しい仕様のカラムを使用するときは、必ず担当者に相談して調整を依頼すること。

2.18. Motor Off のところを On に変えると送液が開始する。圧力の上昇が適切か、配管から漏れがないか、などを確認する。カラムや配管が詰まっていたりすると通常より圧力が上がり、漏れがあると下がる。また、溶媒の比率を極端に変えた時も圧力が上がりやすい。



3. MS の準備① イオンソースの着脱とプローブ交換

本章の作業手順は、「**(A-2) イオンソースの着脱とプローブ交換**」の利用資格の内容に該当する。担当者の立ち合いなく利用するには、各利用者が利用資格試験に合格する必要があるので注意すること。

以下、イオンソースについて説明するが、入れ替え作業となるため、以下のようにキャリブレーション用のプローブを準備するときをメインにして説明する。他の交換を行うときも、同様の手順で対応すること。

交換前) イオンソースが OptaMax NG ion source、Sweep Cap あり
プローブが HESI probe

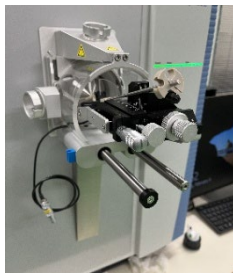
↓

交換後) イオンソースは変更なし、Sweep Cap なし
プローブが ESI calibration probe

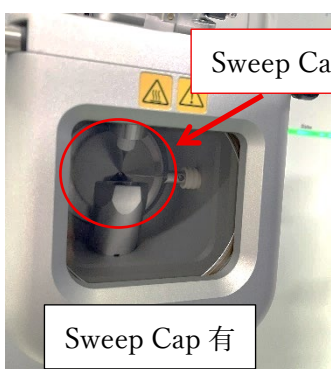
3.1. 以下の写真のように、どのイオンソースが取り付けられているか確認する。また、OptaMax NG ion source の場合は、窓を覗いて Sweep Cap の着脱状態を確認する。



OptaMax NG ion source

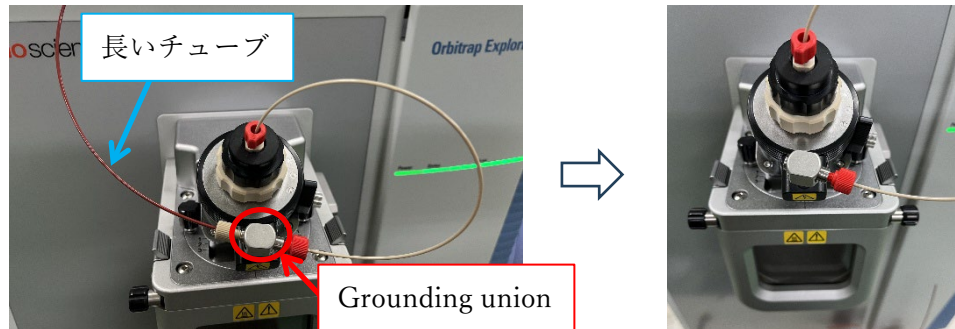


Nanospray Flex NG ion source



=====イオンソース OptaMax NG ion sourceの取り外し方=====

3.1.1. Grounding union の両端にチューブが接続してあったら長いチューブの方のチューブフィッティングを回し緩めて外しておく。



3.1.2. 固定レバー2 か所を下に下げて、イオンソースを両手でしっかり持ち、落とさないように引き抜く。イオンソースはそれなりの重さがあるので、不安定な脚立などに置くことは避け、テーブルなどのしっかりした台に置いておく。



3.1.3. Sweep cap を外すときは、次のように行う。Sweep cap は熱くなっているので、耐熱手袋をするか、キムタオルなどで挟んでつかむようにする！ 右上と左上にイモネジがついているので、専用のドライバーで軽く緩め、手前に引きぬくと外れる。Sweep cap は専用のシャーレに保管する。イモネジはつけたままで外さなくてよい。



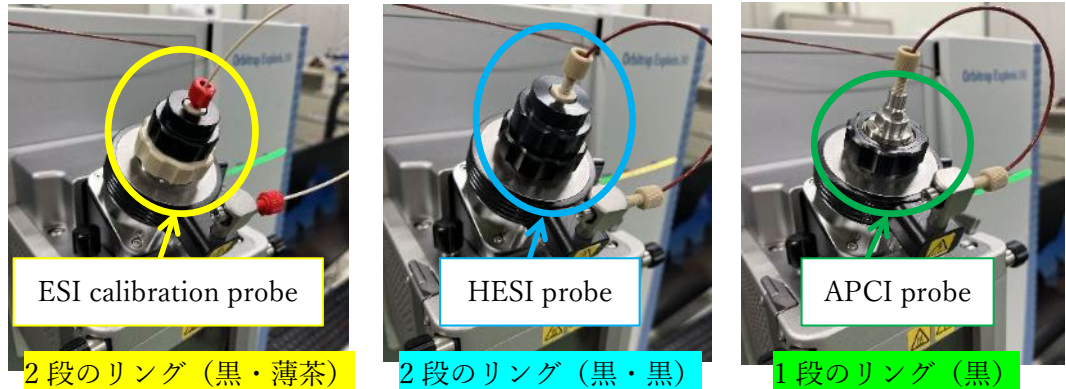
3.1.4. イオンソースを元に戻すときは、本体にしっかり押し付けながら、固定レバーを上げて固定する。

=====

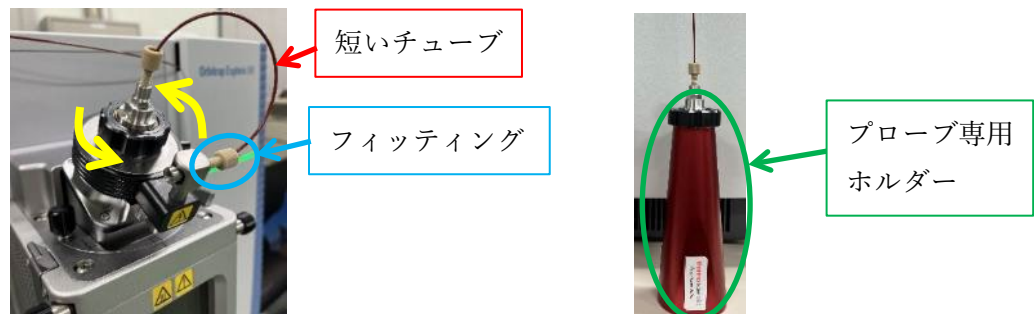
==== イオンソース Nanospray Flex NG ion source の取り外し方 =====

===== OptaMax NG ion source のプローブ交換 =====

3.2. イオンソース OptaMax NG ion source に取り付けられているプローブは以下の写真のように3種類あるので、必要に応じて交換する。

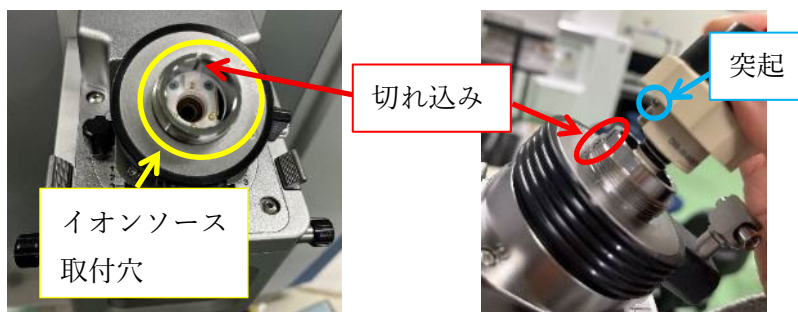


3.2.1. 短い方のチューブを接続しているフィッティングを外す。
次にリング部分を手で回して緩め、プローブを引き抜く。このとき、事前に交換するプローブホルダーを用意し、ねじ締めを緩めてすぐに外せるようにしておくといよい。引き抜いたプローブは、取り付けたいプローブの専用のホルダーに入れ替えておく。



※ プローブの先端は非常に精密に作られているため、何かに軽く当たっただけで破損してしまうことがある。絶対に触れないようにすること。

- 3.2.2. 取り付けたいプローブは、ニードルの先端に注意しながら、イオンソースの取付穴に真っ直ぐ挿入する。奥まで入れたら切れ込みと突起部分を合わせる。奥まで入れたら、リング部分をしっかり回して固定する。



- 3.2.3. プローブを接続するチューブとフィッティングは、専用の組み合わせで用いるのでそれぞれ用意する。

ESI calibration probe

ベージュ色の PEEK チューブ (1/16"-.0025 ID) と赤色のフィッティング

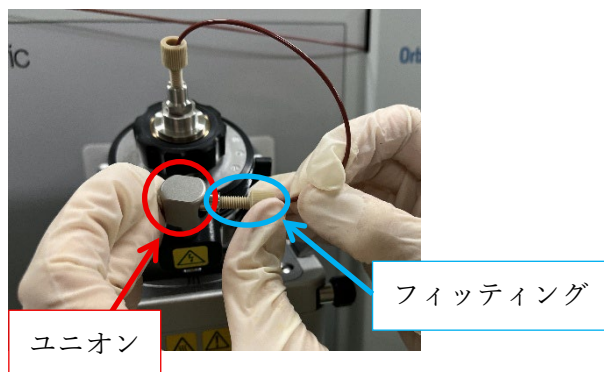
HESI probe と APCI probe

赤色の PEEK チューブ (1/16"-.005 ID) とベージュ色のフィッティング

黒色の PEEK チューブ (1/16"-.004 ID) とベージュ色のフィッティング

※ 細いチューブは背圧が高くなるので、HESI と APCI については、通常なら赤色チューブを用いる。

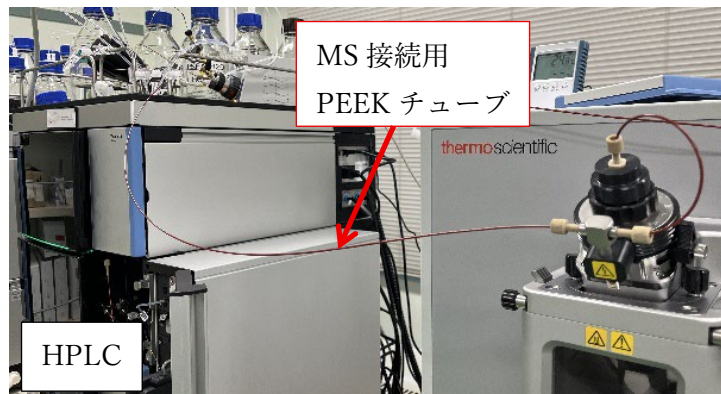
- 3.2.4. チューブを Grounding union に専用のフィッティングを使って接続する。このとき、ユニオンを反対側から指で押さえ、チューブをユニオンに押し付けるようにしてフィッティングを締めるようにする。ユニオンとチューブは左右どちらから取り付けてもいいが、プローブとユニオンは右側から接続すると取り付けやすい。ユニオンが外れてしまったら、位置を真ん中に来るように直しておく。



- 3.3. APCI プローブに交換したときは、イオンソースの右側にある APCI HV の切り替えノブを回し ON に変更する。それ以外のプローブの場合は OFF にする。



- 3.4. HESI または APCI プローブを使用するときは、HPLC から MS 接続用の PEEK チューブをプローブに取り付ける。また、マスキャリブレーションをする場合は次の章を参照する。



4. MS の準備② マスキャリブレーション (Orbitrap Tune)

本章の作業手順は、「(A-2) マスキャリブレーション」の利用資格の内容に該当する。担当者の立ち合いなく利用するには、各利用者が利用資格試験に合格する必要があるので注意すること。

Orbitrap 質量分析計は、毎日 1 回のキャリブレーションを行うことがメーカーから推奨されている。キャリブレーションは標準試料で質量を校正する手順であり、マススペクトルの横軸に相当する m/z を実測のデータを使って補正する。

実際の作業では、標準のキャリブレーションの場合、専用の試薬をシリンジポンプで注入しながら測定して校正を行う。また、Orbitrap には EASY-IC という機能が搭載されており、機能を ON にすると装置内部に設置しているキャリブレーション用の試薬を流すことで 1 点校正を行うことができる。この場合は試薬注入の必要がないため、イオン源の交換などは不要となる。

キャリブレーションを行うかどうかは、利用者側で判断してよい。キャリブレーションを行うと、実測値と理論値との差である質量確度 (Mass accuracy) が小さくなり、元素組成の候補をより狭い範囲で絞り込むことができる。Orbitrap 質量分析計の仕様では以下の通りである。

二乗平均平方根：RMS error (質量確度・質量精度を含む値)

- ◇ 内部標準法 (EASY-IC を使った場合) < 1ppm (24 時間)
- ◇ 外部標準法 (EASY-IC を使わない場合) < 3ppm (24 時間)

内部標準法は、外部標準法による校正を 24 時間以内に行った場合の仕様であり、長時間経過した場合はその限りではないことがある。

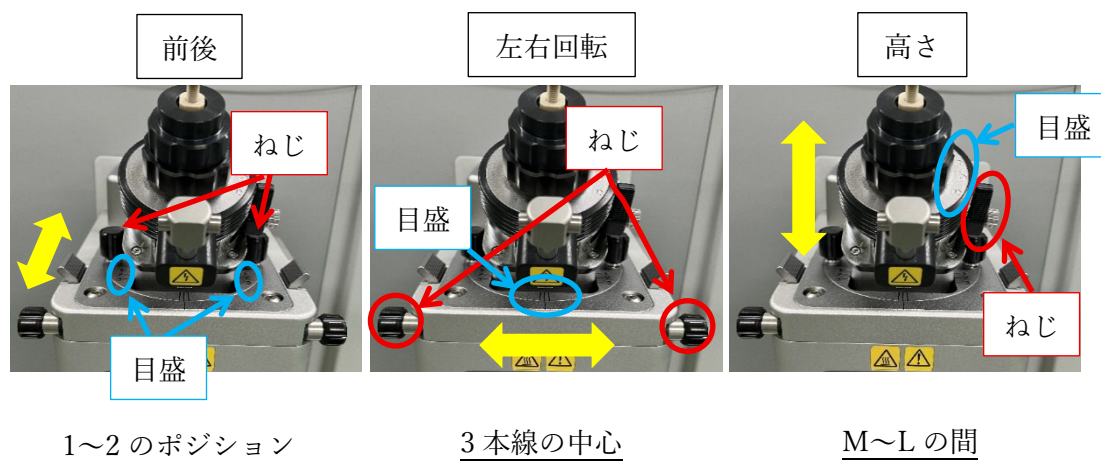
以下のような測定ではキャリブレーションが重要となる。

- ✓ 精密質量によって分子式の候補を検索する場合
- ✓ 多成分の測定で保持時間が重なりやすいサンプルのノンターゲット分析
- ✓ MS/MS によるフラグメントイオンの差から、構造推定する場合

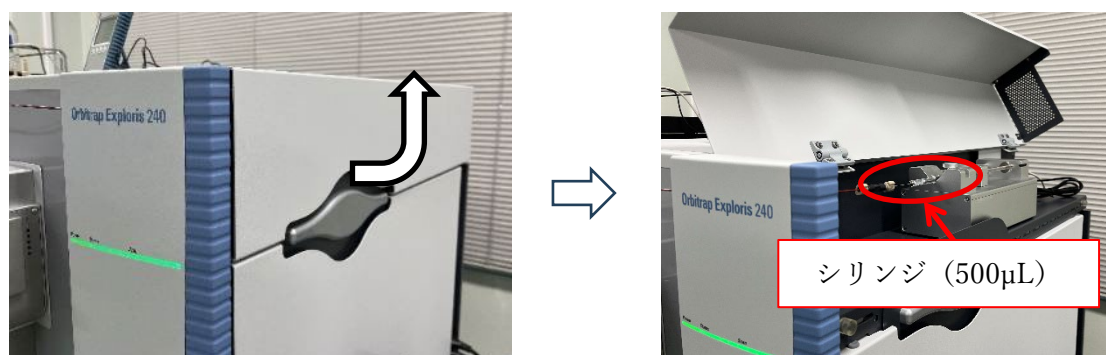
- 4.1. 前章の手順にしたがって、イオンソースが **OptaMax NG ion source** が取り付けられてあり、かつ **Sweep Cap が外してある**かを確認する。また、イオンソースに **ESI calibration probe** が取り付けられているか確認する。



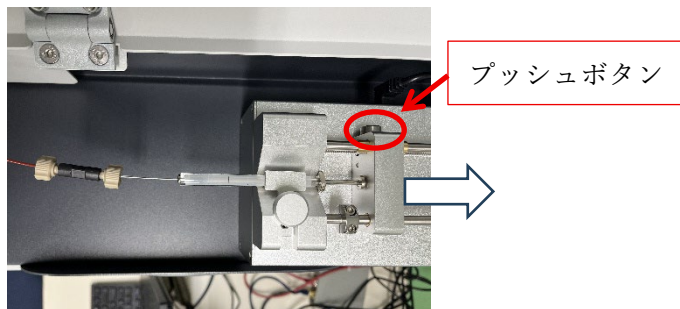
- 4.2. イオンソースのポジション位置を確認する。目盛を見てそれぞれのねじで調整する。



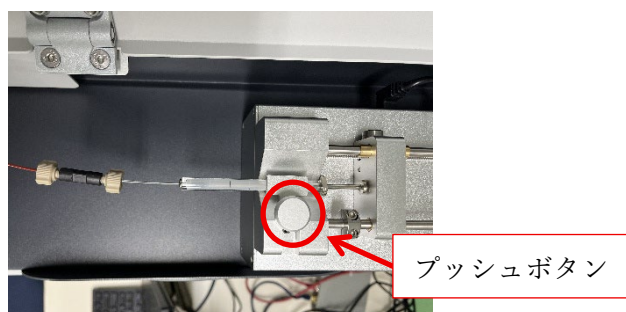
- 4.3. MS 本体の右上のカバーを上を開けて、シリンジポンプを用意する。標準試薬の液量が $100 \mu\text{L}$ 以下に減っていたら以下の手順で補充する。



4.3.1. シリンジポンプのプッシュボタンを押すと板が動かせるので後ろにスライドさせておく。

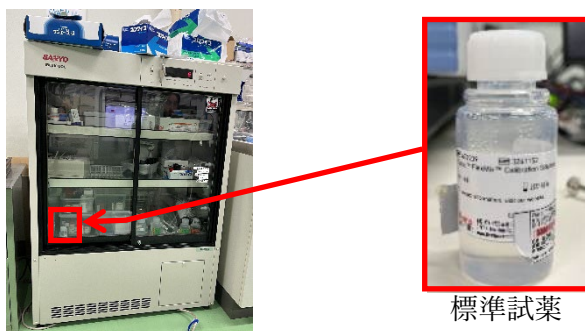


4.3.2. シリンジを固定している突起のフックを上引っ張り、シリンジを取り外す。

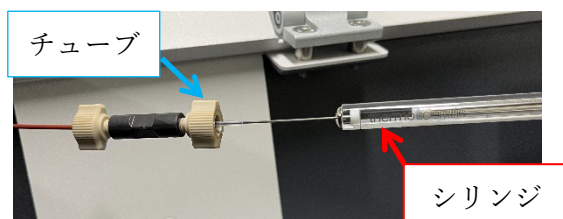


4.3.3. シリンジの先端につながっているチューブを引っ張って外す。

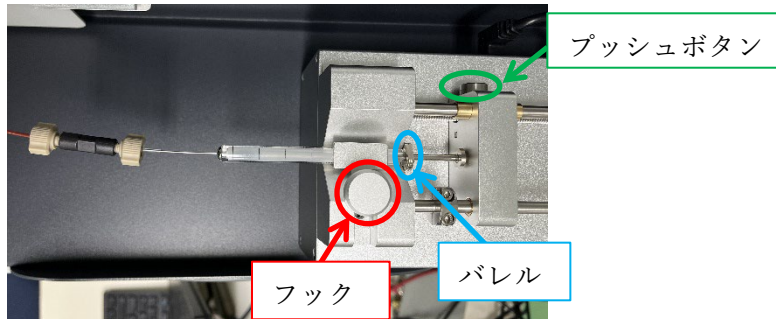
4.3.4. 冷蔵庫の左下の場所に標準試薬があるので取り出し、200~300 μ L くらいまで採液する。このとき、空気が入ったらシリンジの先端を上に向けた状態でゆっくり押し出し、空気を抜いておく。垂れた液はキムワイプなどでふき取る。



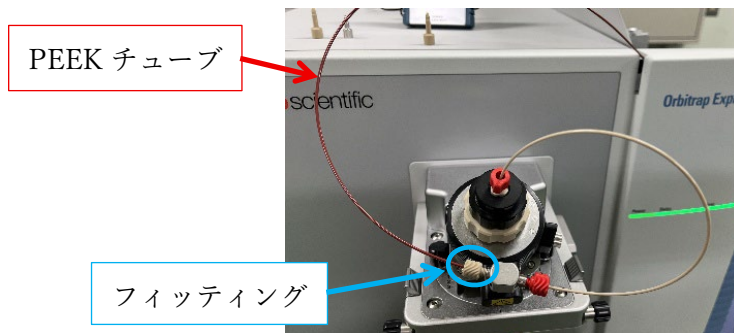
4.3.5. チューブをシリンジの先端に差し込み、軽く当たったところから更に奥までしっかり押し込む。シリンジを押してチューブの先端から漏れなく液が出てくることを確認する。



- 4.3.6. シリンジポンプのフックで台座にシリンジを固定し、バレルの出っ張り部分を手前に押し当てておく。次にプッシュボタンを押して押さえ板をプランジャーの端までぎりぎり近づけておく。



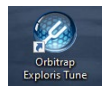
- 4.4. シリンジポンプの準備ができたなら、赤い PEEK チューブをページのフィッティングを使って、ユニオンに取り付ける。



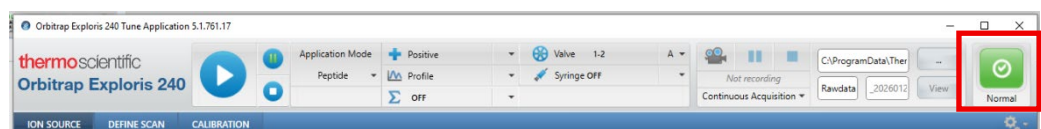
- 4.5. 制御用パソコン（左のパソコン）が起動していなかったら起動する。ユーザー名は「Thermo」、パスワードは「Manager1!」と入力する。

※ 制御用 PC をシャットダウンすると、ソフトウェアの通信に 10 分程度かかることがある。基本的に制御 PC の電源は入れたままにすること。

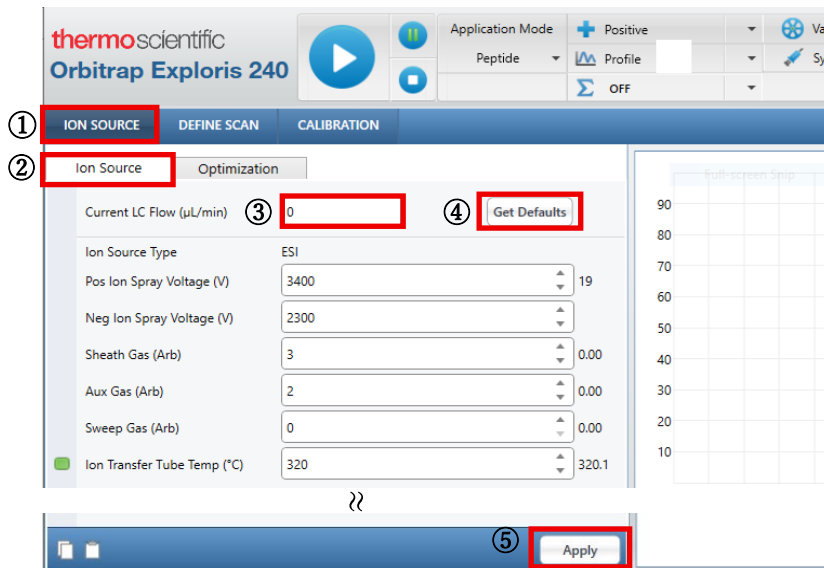
- 4.6. パソコンのデスクトップにあるショートカットから Orbitrap Exploris Tune を起動する。Xcalibur を先に立ち上げていたときは、アプリリストから起動することもできる。



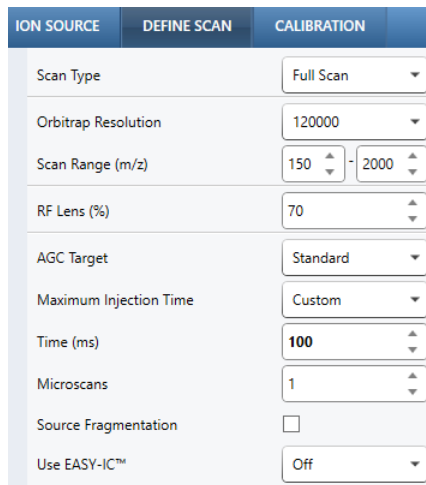
- 4.7. 右上のアイコンが Normal になっていることを確認する。PC 起動直後は 10 分程度待つ必要がある。



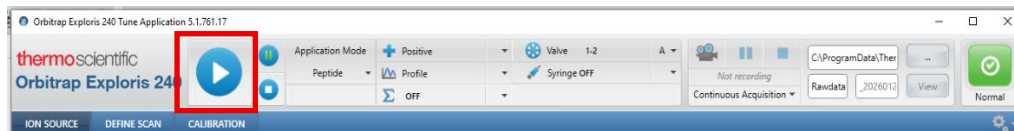
4.8. ION SOURCE の Ion source を開き、Current LC flow を 5 μ L/min に設定して GetDefault ボタンをクリックした後、下の Apply ボタンをクリックする。



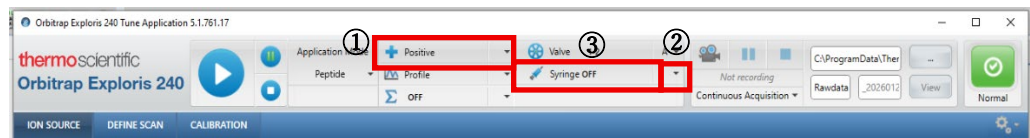
4.9. DEFINE SCAN を以下の設定にする。



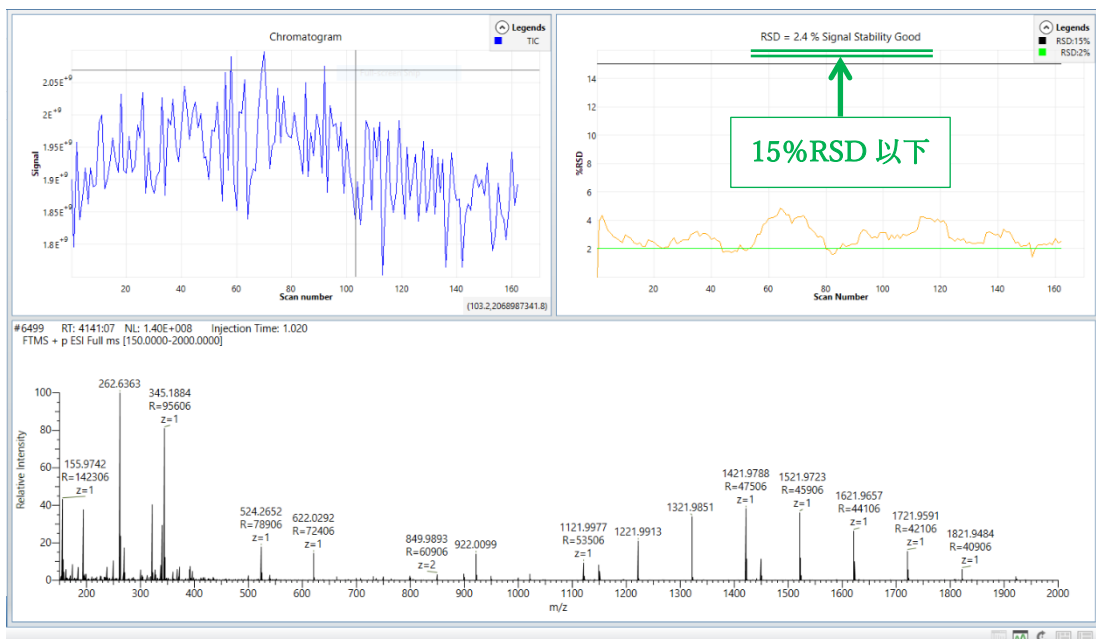
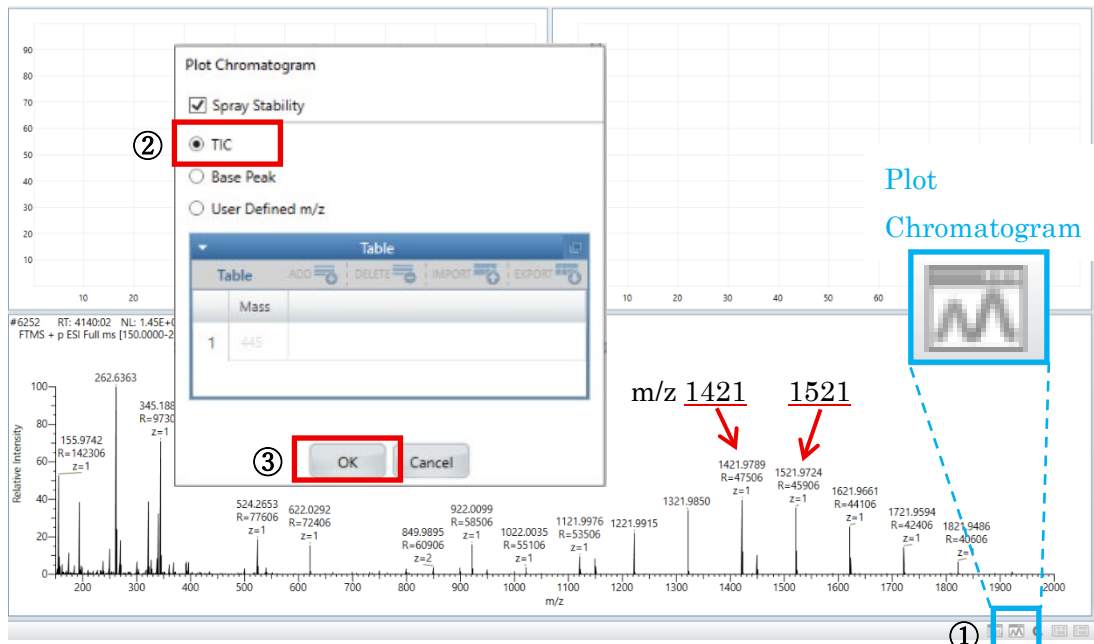
4.10. スタートボタンをクリックする。



- 4.11. ①を Positive に設定する。Syringe OFF の右にある② ▼をクリックして Flow rate を $5\mu\text{L}/\text{min}$ 、Volume を $500\mu\text{L}$ にする。その後、③ Syringe を ON に変える。



- 4.12. モニタ画面のマススペクトルに m/z 1421, 1521...の一連のピークが検出されたら、Plot Chromatogram 画面を出し、TIC を選んで OK とする、RSD モニタのピークが 15%RSD 以下になるまで待つ。



4.13. CALIBRATION を開いて、Mode を Calibrate に変更する。Polarity を Positive、Type を Mass にする。設定したら枠の右下の Start ボタンをクリックする。



4.14. キャリブレーション結果の PDF が表示されたら、Result 欄がすべて Passed になっていることを確認する。Failed になったら条件を再確認し、再実行する。

Calibration Report

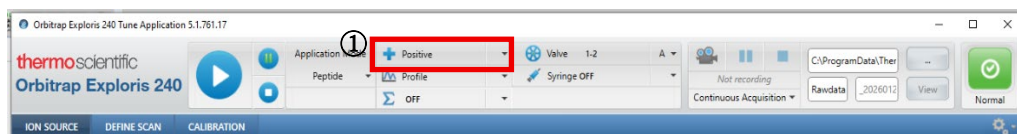
thermo scientific

Date & Time: Thursday, January 29, 2026 02:08:26 PM
 Instrument Model: Orbitrap Exploris 240
 Instrument Serial: P911432C
 Software Version: 5.1.761.17

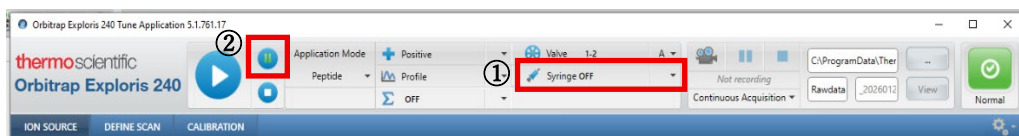
Name	Result	Value	Range	Comment
Mass Calibration Summary	Passed			
Mass Calibration Summary				
Name	Result	Value	Range	Comment
[2026-01-29 14:08] Signal Stability Evaluation (pos)	Passed	-	-	good signal stability: 8.5% RSD!
[2026-01-29 14:08] Fine Mass Calibration	Passed	-	-	External rms deviation = 0.49 ppm (without lock mass), acceptance limit = 3.00 ppm Internal rms deviation = 0.18 ppm (with lock mass @/z 322.04812), acceptance limit = 3.00 ppm
[2026-01-29 14:08] Spectral Mass Accuracy Calibration Run Function	Passed	-	-	
[2026-01-29 14:08] Spectral Mass Accuracy Calibration	Passed	-	-	
Type				Calibration

Overall %SD of TIC: 8.5 % is in spec. Value does not exceed 15 %

4.15. 負イオンモードのキャリブレーションもする場合は、①を Negative に変更する。瞬時に切り替わるので、スキャンやシリンジを停止する必要はない。正イオンと同様に、CALIBRATION を開いて、Polarity を Negative に変更し、Start ボタンをクリックする。負イオンモードの PDF が新しいファイルで表示されるので、Passed になっていることを確認する。



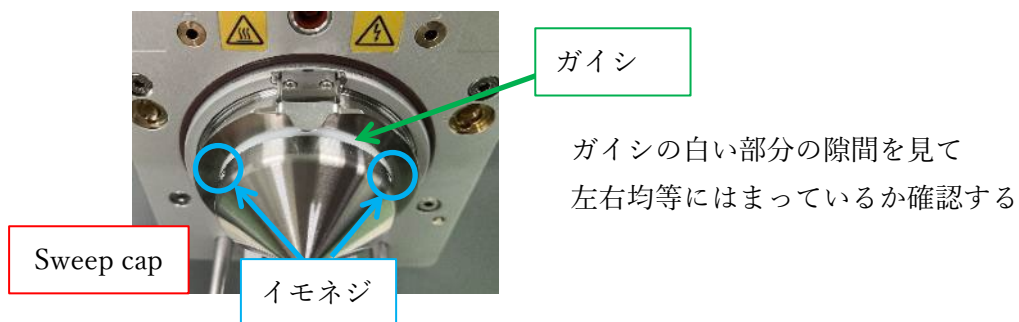
- 4.16. キャリブレーションがすべて終わったら、①Syringe を OFF にして、②Standby に変更する。



- 4.17. シリンジポンプにつながっているチューブをプローブから取り外す。

注意！ Standby にしないと感電するので注意。

- 4.18. イオンソースを取り外し、取り外していた Sweep Cap を元に戻す。イモネジを専用のドライバーで固定する。その後、イオンソースを元に戻す。

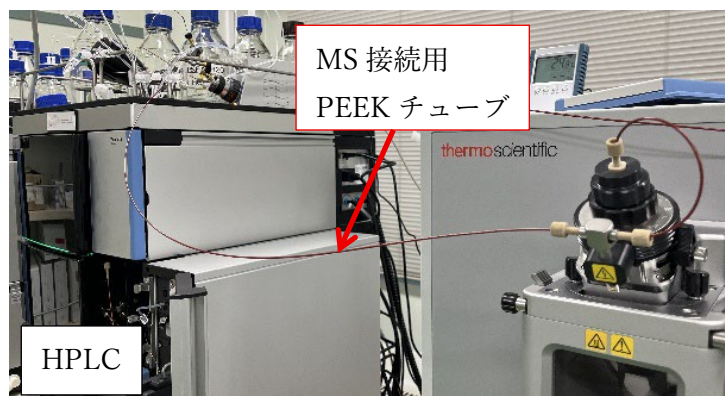


- 4.19. プローブを H-ESI もしくは APCI に交換する（チューブをユニオンから外す）。

- 4.20. APCI プロブに交換したときは、イオンソースの右側にある APCI HV の切り替えノブを回し ON に変更する。それ以外のプローブは OFF にする。



4.21. HPLC から MS 接続用の PEEK チューブをプローブに取り付ける。



5. シーケンスによる測定 (Sequence Setup)

- 5.1. オートサンプラーが稼働中でないことを確認し、ドアを開ける (マグネットで着脱する仕組み)。サンプルラックを確認し、適合しないものがセットされていたら交換する。

庫内の写真

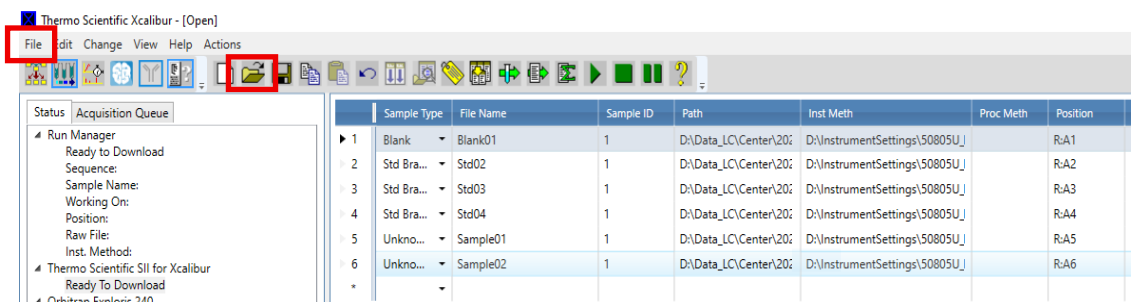
- 5.2. サンプルをホルダにセットする。このとき、サンプルとホルダ番号を後で参照するので覚えておくこと。

※ 注意！ オートサンプラーは、サンプル容器に針を刺して注入する仕組みである。バイアル瓶の場合、ゴム製のセプタムが付いた専用のキャップを使用すること。キャップを外してセットすることもできるが、溶媒が蒸発すると濃度が変わってしまうので注意する。一方、マイクロプレートを使用する場合は、プラスチックのカバーは使用できない。封をするときは HPLC 専用のシーリングフィルムを使用する。



- 5.3. Xcalibur の Sequence Setup をシングルクリックで起動する。ツールアイコンの左から 2 番目をクリックしても開ける。

- 5.4. 事前に登録してあるシーケンスがあれば、File の Open、もしくは Open アイコンから読み込む。



一方、シーケンスを新規で作成する場合は、新規作成メニューから一括登録する方法と、画面を開いたときの初期（空欄）から一行ずつ入力する方法がある。一括登録はサンプル数が少なければ使わないので、基本的に空欄の状態から各項目について直接入力してよい。

便利機能として、一括で入力したい場合は、適用させたいセルやカラム（列）を選択して Fill Down のアイコンをクリックすると、自動的に先頭行の内容がコピーされる。バイアル番号などは末尾の番号が連番に補正される。

入力したいカラムが消えている場合や、不要なカラムを消したい場合は、カラムアレンジメントのアイコンをクリックして、Available（非表示）と Displayed（表示）のメニューから変えたいカラムを選んで変更する。

✓ Sample Type

Unkown： 定量したいサンプルや未知サンプルなどの測定対象

Blank： 動作確認用のブランクサンプル

Std： 定量分析を行う場合の標準試料

✓ File Name

データとして保存されるファイル名を入力する。F2 キーを 2 回押すとテキストボックスを開いて編集できる。

※ 使用してよい記号は、アンダーバー _ のみとなっている。それ以外の記号を使うと不具合を生じることがある。

※ ファイル名は同名で重複しても問題ないが、自動的に上書きされないようにタイムスタンプが追記される

✓ Sample ID

定量分析を行う場合の識別番号として使用する。必要ない場合は「1」としておく。

✓ Path

ファイルの保存先フォルダを指定する。枠をダブルクリックするとフォルダを指定するエクスプローラー画面が表示される。基本的に Windows の操作と同じであり、新しいフォルダを作ることもできる。

ファイルの保存先は、必ず D ドライブの Data フォルダに指定すること。

- ✓ Inst Meth (Instrument Method)
事前に Instrument Setup で作成してあるメソッドファイルを読み込む。メソッドファイルの作成方法は次章で説明がある。
- ✓ Proc Meth (Process Method)
データ処理のメソッドを作成してある場合は読み込む。データ処理を手動で行う場合は空欄でよい。
- ✓ Position
オートサンプラーのホルダ番号を入力する。

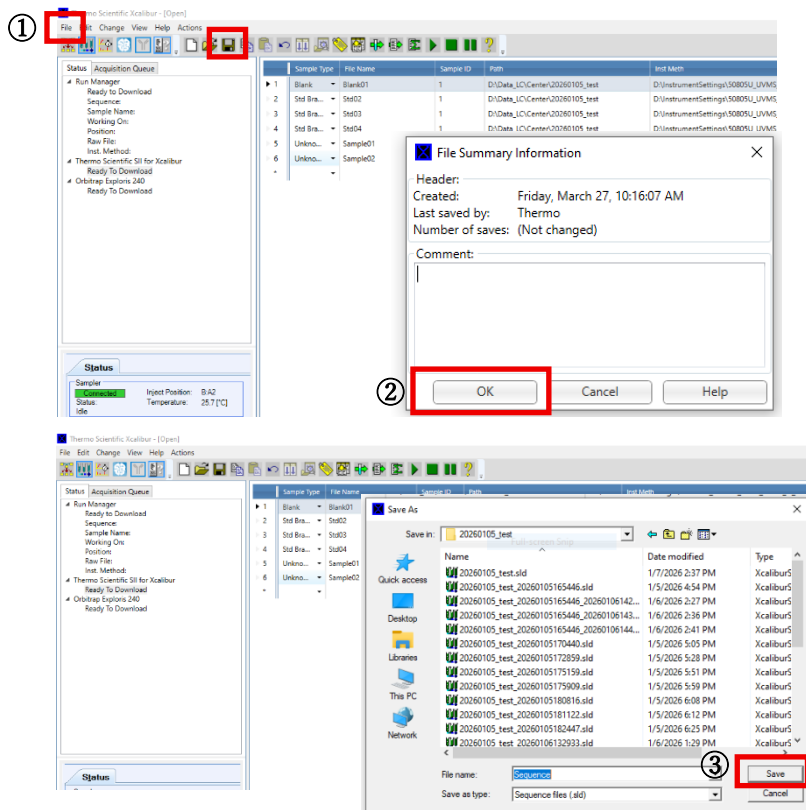
1.5mm バイアル用のラックは、「R:A1」のような書式で記載する。

R=Red、B=Blue、Y=Yellow、G=Green のラック

A1 はラックに記載してある記号で、縦が A~F、横が 1~9 番

- 5.5. シーケンスに名前を付けて保存しておく。ウィンドウが開くのでコメントが必要であれば入力できる（空欄でもよい）。

注意！ 別のファイルから読み込みをしている場合、意図せず親ファイルを上書きしてしまうことがある。必ずフォルダを指定して保存しておくこと。



5.6. 行を選んで Run This Sample をするか、もしくは**複数行を選択して** Run Sequence のアイコンをクリックする。いずれも Run Sequence の画面が出る。

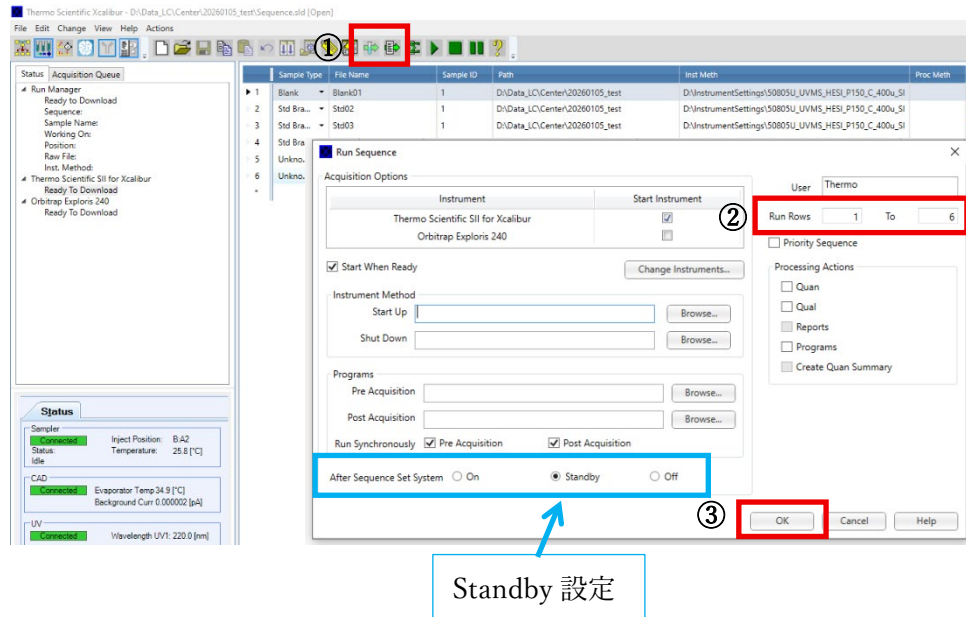
※ 適切な選択をしなかった場合は、Run Rows の欄に走らせるシーケンス番号を入力することで修正できる。

5.7. After Sequence Setup には、測定終了後の状態を On または Standby を選んで設定する。**Off に設定すると MS に不具合を生じることがあるので絶対に設定しないこと。**

On の場合： 動作確認などの手順で、すぐに次の作業をしたい場合は On にしておくといよい。HPLC は溶離液の比率が測定前に戻り送液を続け、検出器や温度もそのままとなる。MS をスキャンし続けている状態では装置が汚染されやすいので、そのまま放置はしないこと。メソッドのバルブ切替で送液をカットする設定にしてあり、測定中よりは汚染が防がれているので、短時間であれば問題ない。

Standby の場合： 測定終了後に HPLC が Smart Standby の設定に、MS が Standby の設定に自動的に変わる。標準設定であれば HPLC は溶離液の比率が測定前に戻り、流量が 0.05mL/min に減る。UV-Vis ランプは消灯する（再点灯に時間がかかる）。

5.8. 確認したら OK する。



5.9. Realtime Plot View を開くと、UV と CAD の検出器のリアルタイムモニタが出る。MS は Orbitrap Tune の画面を開くとみることができる。測定がすべて終わるまで待つ。

※ 測定中に容量の小さい一時ファイルができることがあるが、それらはデータ取り込み中であり、開くことはできない（データはメモリに入っていて、ディスクに書き込まれていない）。Freestyle などのアプリケーションソフトによるデータの閲覧は、測定が終わってしばらくしてファイル容量が増えてから行うこと。


5.10. 測定が終了すると、Status が になる。

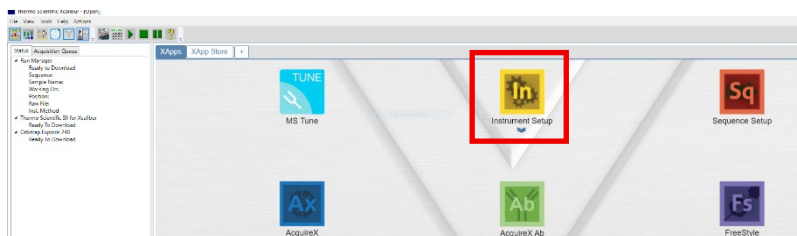
5.11. 全ての測定が終わったら、オートサンプラーのドアを開けてサンプルを回収する。

※ シーケンス測定中はドアを開けるとエラーになってしまうので注意。

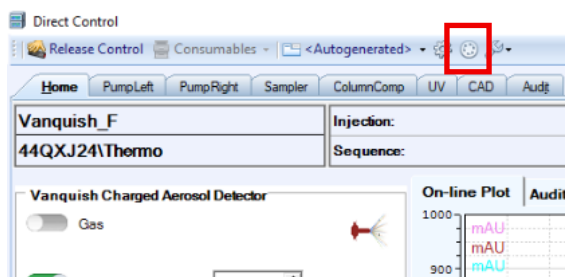
6. HPLC メソッドの作成と編集 (Instrument Setup)

本章の作業手順は、「(C-1) 測定メソッドの作成と編集」の利用資格の内容に該当する。担当者の立ち合いなく利用するには、各利用者が利用資格試験に合格する必要があるので注意すること。

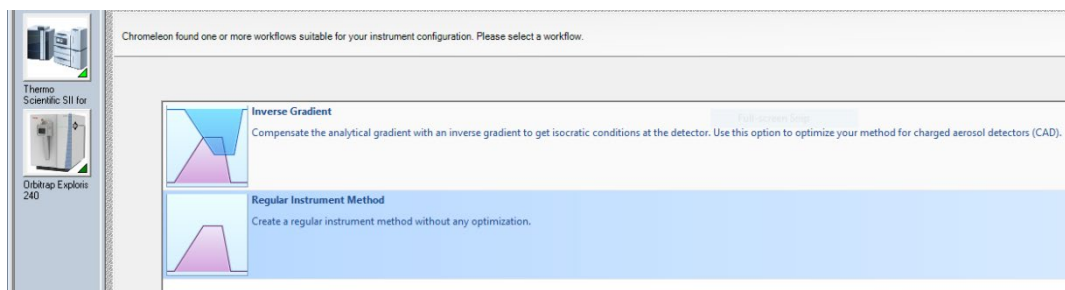
- 6.1. Xcalibur  の画面に戻り、XApps パネルから Instrument Setup をシングルクリックで起動する。クリックしてからしばらく待つ。



- 6.2. Direct Control の Define Fluidic Configuration で逆グラジエントを設定したときは、ここでメニューが出るのでどちらのモードにするか選択する。設定していない場合は表示されない。

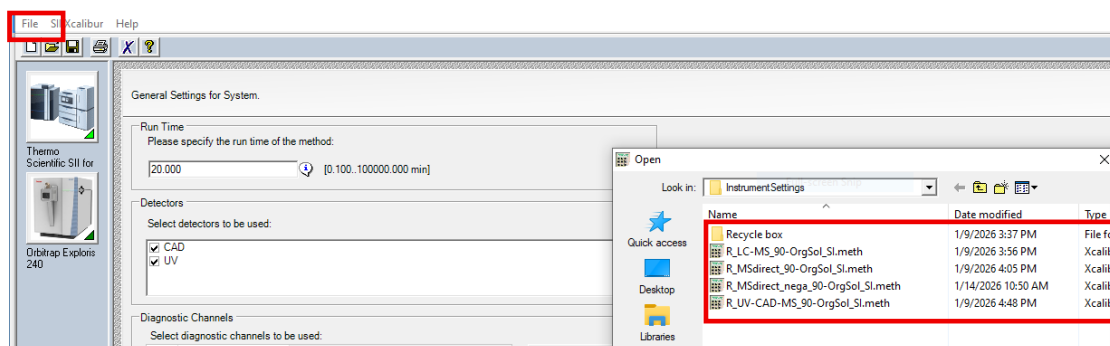


Define Fluidic Configuration



逆グラジエントモードを選択すると、左サイドメニューに専用のオプション機能が追加される。メソッドを読み込んだだけではモードが変わらないので、モードを変えたい場合は Instrument Setup を再起動する必要がある。

- 6.3. FileメニューのOpenから、測定したいセットアップ構成を読み込む。どのファイルを使用するかは、使用するモードや条件によるので、管理者に確認すること。



例) SunShellC18_UVCADMS_HESI_P150_C30

- ✓ カラム品番
- ✓ UV, CAD, MS : 使用する検出器
- ✓ HESI, APCI : MSで使用するイオン化法
- ✓ P150, N100 など : Pが正イオン、Nが負イオン。数字は質量範囲の最小
- ✓ A, B, C : 使用する溶離液 (A~C) と比率

- 6.4. 必要に応じてメソッド設定を変える。

6.4.1. Pump Left と Right

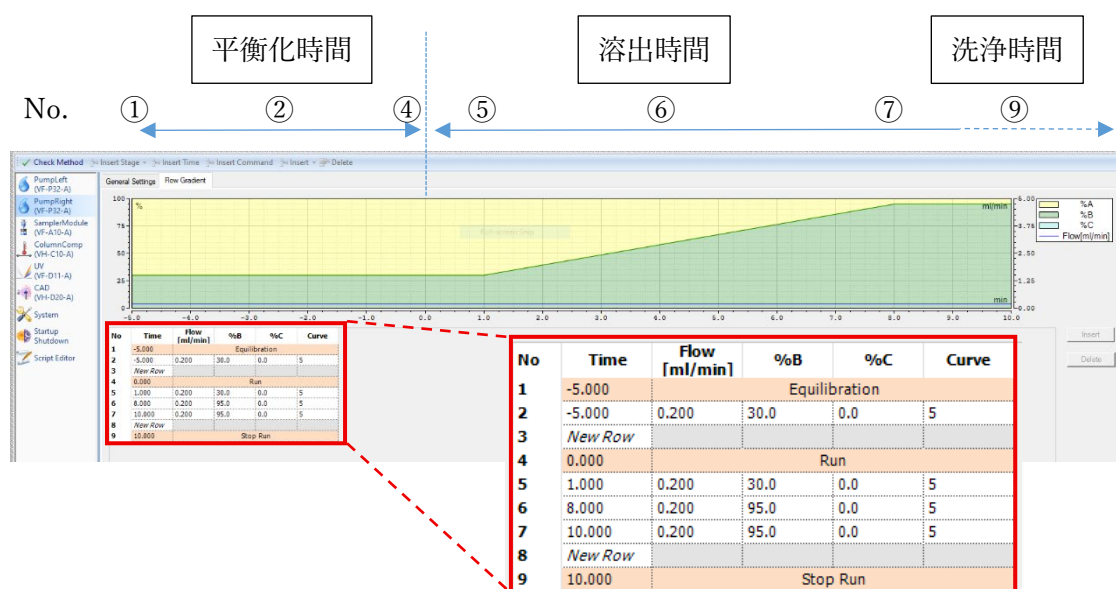
ポンプの設定により、A~C までの 3 種類の溶離液の混合比を変更することができる。C18 などの逆相系のカラムは、A 液 (水系) の割合が多いと溶出が遅くなる。適切な比率はサンプルの極性によって大きく異なり、A 液を 100~0% の範囲で使用できるカラムもある。

一方、HILIC などの順相系カラムは、A 液の割合が多いと溶出が速くなるので、逆相とは比率が逆になっている。概ね A 液が 5~40% の範囲で使用する人が多い。

逆相カラムや HILIC カラムについては、メーカーやモデルによって仕様が異なることがある。たとえば、A 液 (水) 100% 付近の条件で使用すると溶出が異常な速さになってしまい、使用できないことがある。必ずメーカーの指示やマニュアルにしたがって設定すること。

溶出方法については、溶離液の比率が一定のイソクラティック溶出と、時間とともに比率を変更するグラジエント溶出の設定ができる。イソクラティック溶出は設定がシンプルというメリットがあるが、測定時間が長くなりやすく、溶媒の消費量が多くなる。また、極性の違う成分の同時測定が難しく、溶出時間が遅い成分のピーク幅が広くなりやすいというデメリットもある。グラジエント溶出はそれらを改善するが、平衡化時間を十分にとらないとピークの保持時間が不安定になることがあるので、設定が大事になる。未知試料の測定や精製の前処理をしていない試料では、どのようなピークが検出されるかわからないので、グラジエント溶出が向いている。

- ✓ Pump Left は逆グラジエントモードで使用するが、事前にモード変更をしておくとも自動計算されるため、使用する必要はない。基本的な溶出条件の設定はどちらも Pump Right の方で行う。



- ✓ 測定前に平衡化時間を入れるときは、Equilibration の設定を加える。一般的なグラジエント溶出では、「Equilibration~Run」までの Time を **マイナス** に設定し、0 分からの「Run~」の溶出時間（測定時間）と「~Stop Run」までの洗浄時間の条件をそれぞれ設定する。時間は上から順に設定する必要があります、どこかで時間が逆転するとエラーになるので注意。
- ✓ イソクラティック溶出の場合、最後に溶出される成分の目標時間を基準にして適切な割合を設定する。また、グラジエント溶出をする場合は、見たい成分がすぐに溶出されない割合に設定し、時間とともに A 液を少なくして次第に速く溶出するように設定する。

上図は逆相系グラジエント溶出の例で、0～1分まで [A 70% B 30%] で流し、1～8分にかけて [A 70% B 30%] から [A 5% B 95%] まで坂道状に混合していく設定になる。

- ✓ グラジエント溶出の場合、途中にステップを設けて見たい範囲の成分だけをゆっくり溶出させる方法もある。ステップの途中で条件の追記が必要であれば、行を選択し Insert ボタンをクリックして追記する。また、不要な行は Delete ボタンで削除できる
- ✓ 平衡化時間や洗浄時間は、溶離液の総流量がカラム体積の 3～10 倍以上になるように設定する。推奨値は使用するカラムの種類によっても異なるため、使用マニュアルなどを確認すると良い。たとえば、内径 2.1mm I.D.、長さ 50mm のカラムを使用し、0.2mL/min の流速で体積の 5 倍流したい場合、以下のようになる。

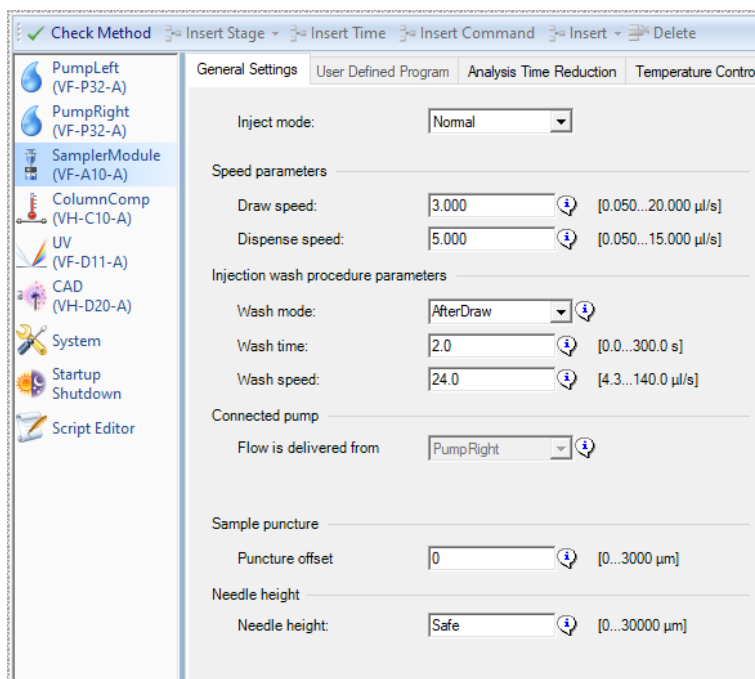
$$\left(\frac{2.1}{2} \right)^2 * 3.14 * 50 / 1000 * 5 / 0.2 \approx 8.7 \text{ 分}$$

内径を変更した別のカラムに入れ替える場合、以下のような相対比にしたがって条件を設定すると、同じメソッドを転用できるようになる。理論段数や感度は内径が細かいほどよくなるが、理論段数を下げずに注入できるサンプル量は減るので、概ね断面積の比に応じた注入量にすると良い。また、流れてきた液を最適な感度で検出するには検出器側のセル容量や応答速度などに依存するため、そちらの仕様に合わせる必要もある。

表. 一般的な条件での内径と流量の比較

カラム内径 (mm)	断面積 (mm ²)	標準的な 溶離液流量 (mL/min)	長さ 100mm のカラム	
			体積 (mL)	体積 1 倍量 送液の必要時間 (min)
4.7	16.62	1.0	1.66	1.77
3.0	7.07	0.4	0.71	1.73
2.1	3.46	0.2	0.35	1.77
1.5	1.77	0.1	0.18	1.66

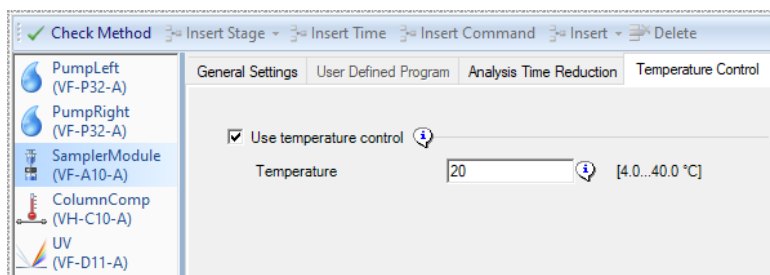
6.4.2. Sampler Module の General setting



- ✓ バイアル瓶にセプタムを使用するとき、穴あきタイプでないものを使うときは、Puncture offset を変更する。

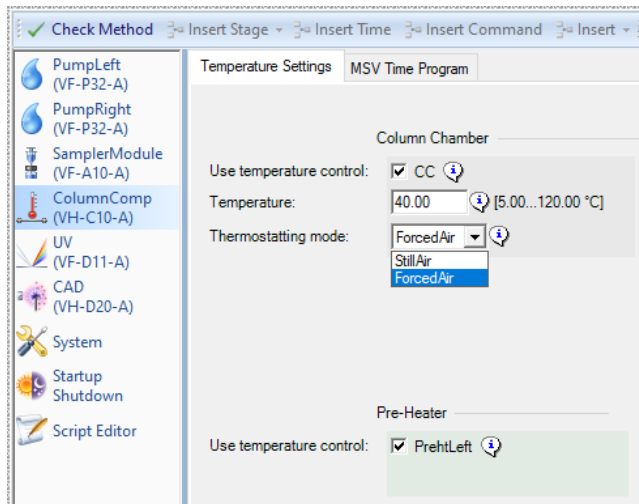
6.4.3. Sampler Module の Temperature Control

サンプルが不安定なものや、揮発性しやすい溶媒を使うときなどは、サンプルをセットするオートサンプラーの庫内を冷やすことができる



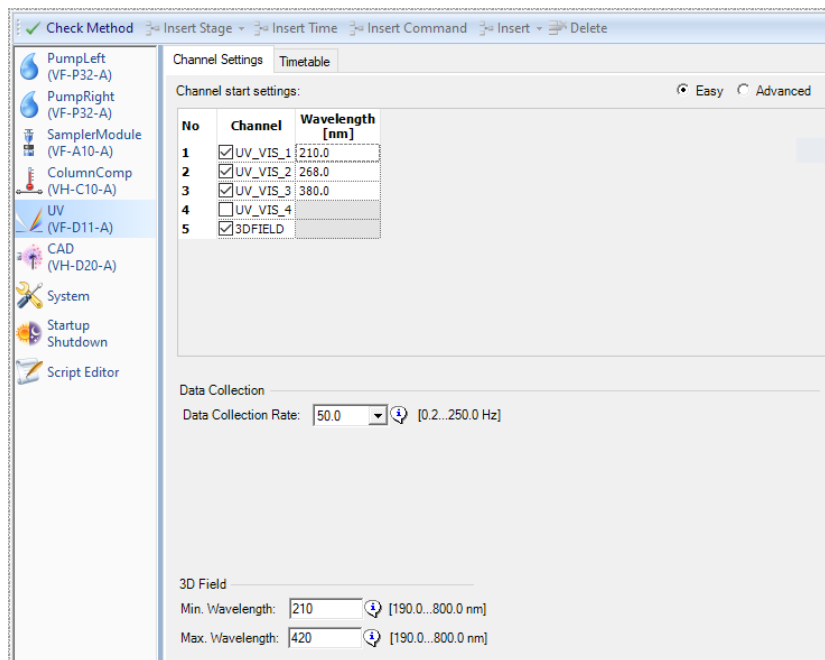
- ✓ Use temperature control にチェックを入れ、4～40℃までの温度を設定する。露点温度以下に冷却すると結露しやすいので、必ずセプタム付きバイアル瓶のキャップをすること。マイクロプレートの場合は、専用の揮発防止フィルムなどを貼るとよい。

6.4.4. Column Comp. の Temperature Setting



- ✓ Temperature は、カラム分離に適した温度を入力する。一般的な逆相カラムでは 30～40°Cにすることが多い。上限温度はカラムによって決まっているので、超えないように注意する。
- ✓ サンプル温度とカラム温度が異なるとき、急に温度が変わると分離が悪くなることもある。Pre-Heaterを入れておくと温度を整えてからカラムに導入されるようになる。

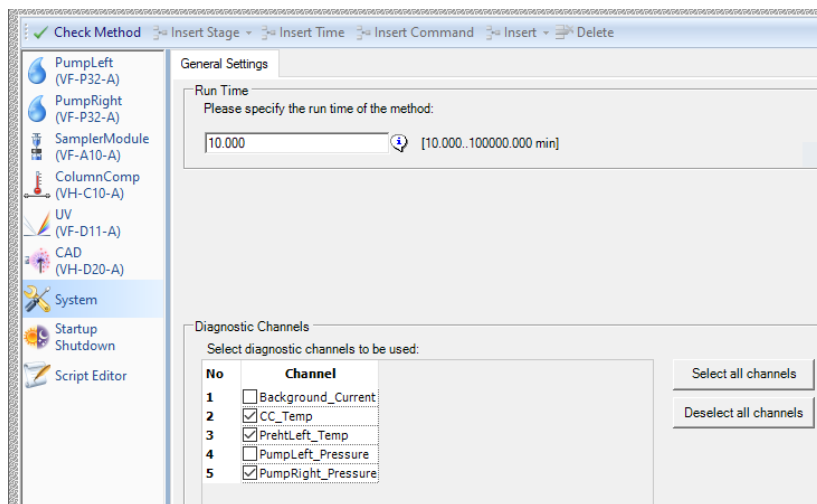
6.4.5. UV の設定 Channel start setting で波長（4 つまで）と 3D Field モードの計 5 チャンネルまで設定できる。たとえば、簡単に 1 波長を設定するには、Easy モードに切り替えて No1 のチェックを入れ、波長を入力すればよい。



6.4.6. CAD の設定

スクショ追加

6.4.7. System の Run time ポンプや検出器などの装置全体における 1 回の測定にかかる時間を入力する。

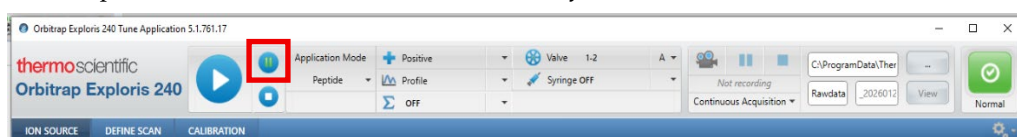


(以下、作成中・・・)

7. HPLC の終了操作

HPLC は、UV ランプなどが消耗品のため、長期間使用しない場合は電源を切ってよい（目安は 1 週間）。一方、MS は真空に引いているため、常時 ON となっているため、終了せずスタンバイにしておくこと。MS と制御 PC は常に通信をしているため、PC も電源を落とさずにそのままにしておく。

7.1. Orbitrap Tune を開き、下図のように Standby の設定になっていることを確認する。

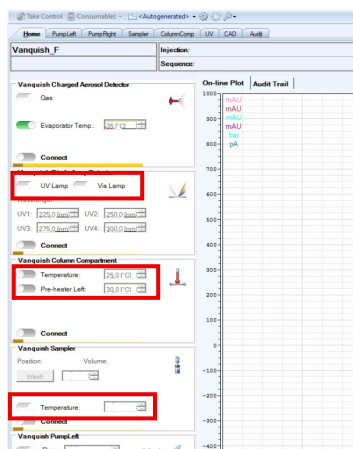


7.2. Xcalibur から Direct Control を開く。

カラムや流路を洗浄するときは、Pump 設定から洗浄に適した Eluent の比率に変更し、Flow（もしくは Motor）を ON にする。また、長期保管用にバッファを抜いたり、溶離液を入れ替えたりする場合は、カラムメーカーのマニュアルを見ながら適切な方法で置換する。

※ 溶離液の瓶を交換したり、元に戻したりする必要がある場合は、一度 Flow を OFF にして瓶を交換し、パージ作業を行うこと。

7.3. Direct Control のサイドパネルを開き、CAD 以外の設定を OFF にする。



- ✓ Vanquish Diode Array Detector (DAD) パネルで、2 種のランプを OFF
- ✓ Vanquish Column Compartment パネルで、Temperature と Pre-heater を OFF

- ✓ Vanquish Sampler パネルで、Temperature を OFF
- ✓ Vanquish PumpLeft と PumpRight の Flow を OFF

7.4. カラムを外したい場合は、カラムコンパートメントの扉を開き、交換用のユニオンと入れ替えておく。

※ カラムを保管するときは、必ず両端にキャップをしておくこと。

7.5. オートサンプラーのドアを開け、忘れずにサンプルを回収する。

7.6. CAD 検出器に送液していたときは、Flow を OFF にしてから 30 分以上、そのまま待ち、装置を乾燥させる。配管がつながっていない場合は待ち時間は不要。

※ 検出器が濡れたまま Gas を停止すると故障の原因となる。十分に注意すること。

7.7. Direct Control のサイドパネルを開き、CAD の設定を OFF にする。

- ✓ Vanquish Charged Aerosol Detector (CAD) パネルで、Gas と Temp を OFF

7.8. HPLC を通電させたままスタンバイにしておく場合は、このままでよい。電源を落とすときはスイッチを切る(各ユニットの Connect は切っても切らなくてもどちらでもよい)。

7.9. 窒素発生装置 (MS 用と CAD 用の 2 台) のブレーカースイッチを下げ OFF にする。

7.10. 使用記録簿に氏名や利用時間などを記入する。