

MALDI/MS

(マトリックス支援レーザー脱離イオン化 質量分析計) 操作手順書

JMS-S3000 Spiral TOF (JEOL)

横浜国立大学 機器分析評価センター

作成日	2026年 5月 1日	
手順書 No.	MS - S3000-1β	
作成	承認	

目次

1. MALDI/MS の概要.....	- 3 -
2. MALDI/MS の試料調製.....	- 9 -
3. MALDI/MS の準備（起動とターゲットプレートの挿入）.....	- 15 -
4. MALDI/MS の測定.....	- 19 -
5. 終了操作.....	- 44 -

【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. MALDI/MS の概要

A. MALDI/MS の概要

[質量分析法]

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。

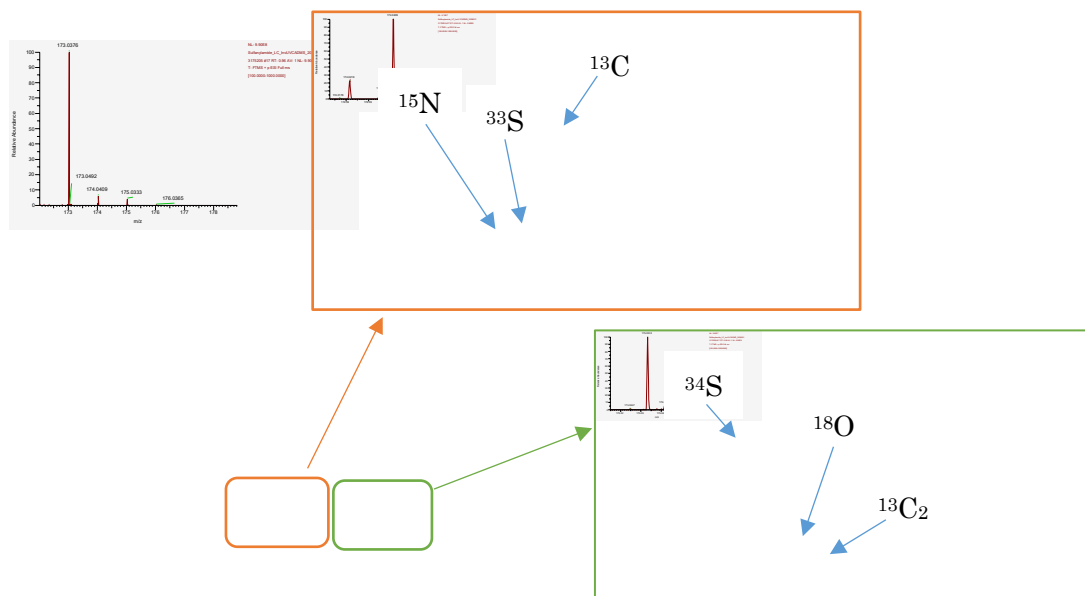
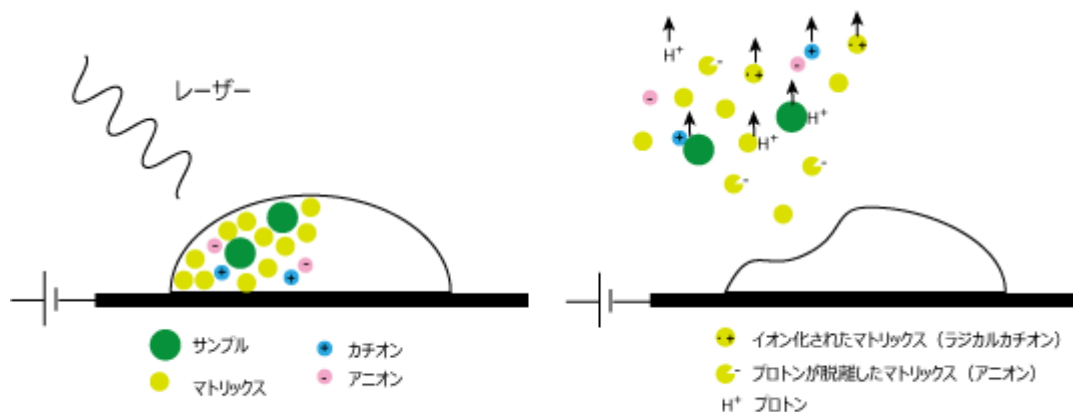


図 1 質量分解能 240,000 (FWHM) で測定したスルファニルアミド ($C_6H_8N_2O_2S$:分子量 172.20) のプロトン付加分子のマススペクトル

[MALDI/MS とは]

MALDI は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization）の略であり、レーザーを吸収しやすいマトリックス試薬に混ぜたサンプルを使ってイオン化する手法である。マトリックスとサンプルの混合物（混晶）を堆積させたプレートを真空チャンバーに入れておき、そこにパルスレーザー照射による急加熱でマトリックスやサンプルを気相中に放出させる。レーザー照射時の光反応などに起因して、気相中でイオンや電子の交換反応や付加反応が起こり、マトリックスやサンプルがイオン化される。サンプルプレートには逆の電圧をかけておくことで、生成した正イオンまたは負イオンを加速させて検出器に送る仕組みとなっている。マトリックス試薬で間接的に気化させていることから、巨大分子でも壊れずに検出されやすい特長がある。



MALDI/MS は、高速のパルスレーザーを照射してイオン化を行うため、得られるマススペクトルも大きなデータ容量で取り込む必要がある。そのため、装置本体の高速デジタルタイザーでいくらかの枚数のスペクトルをまとめ、コンピューターの方に転送する仕組みになっている。JMS-S3000 では、1つのデータセットを「トレース」といい、それを1点のマススペクトルデータとして扱い、さらに100回程度の積算を重ねることで感度の良いマススペクトルを得るようにしている。MALDI ではレーザーを照射するスポットによって感度が変わることがあり、また同じスポットで測定し続けるとマトリックスが飛び切ってしまうと検出されなくなる。トレースの取込みではスポットを動かしながら測定することも重要となっている。

[イオン化]

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、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 1000 の成分でも、 m/z 1000 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、MALDI/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 1001 に検出されるようになる。

[MALDI/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 MALDI/MS はソフトイオン化法と呼ばれる手法であり、分子そのものを壊してしまうような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、分子構造を維持したままイオン化することが多い。

MALDI/MS では、引き込むイオンをプレート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スペクトルの取得モードを選択することができる。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。Na イオンはガラス瓶などから溶媒に溶出してくる場合があり、親和性の高い化合物であればカチオン化剤として添加しなくても意図せず付加する場合もある。また、イオン性の化合物であれば、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。

イオン	分析種	主なイオン
正イオン (中性・塩基性)	極性～中極性	$[M+H]^+$ $[M+Na]^+$ $[2M+H]^+$
	～無極性	M^+ $[M+Ag]^+$
	イオン性	C^+ $[C_n+A_{n-1}]^+$
負イオン (酸性)	極性～	$[M-H]^-$ $[2M-H]^-$
	中極性～無極性	M^- (生成しにくい)
	イオン性	A^- $[A_n+C_{n-1}]^-$

また、MALDI では ESI や APCI などのイオン化と比べると、1 価イオンになりやすい傾向があり、 m/z がイオンの質量(m)と一致するので、帰属がわかりやすいというメリットがある。一方、タンパク質などの巨大分子や、電荷を帯びやすい化合物では、2 価以上のイオンになることもある。マススペクトルの横軸は「 m/z 」であり、電荷数で割った数値となるため、2 価イオンであれば実際の質量の半分になる。解析が難しくなるほどの多価イオンができてしまった場合は、デコンボリューションというソフトウェアの機能により元の質量を計算することができる。

やや特殊な事例としては、300~400nm (YAG 3 倍波なら 355nm) のレーザーを用いるため、光イオン化によって試料が直接イオン化されると、気相中の電荷交換反応によって正または負のラジカルイオンが生成することもある。この場合はマトリックスと混合しなくてもイオン化する可能性があり、そのような測定法を単にレーザー脱離イオン化 (LDI) と区別する場合もある (後述)。化合物によって異なることから、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。

MALDI/MS の場合、マトリックスの相性も問題になる。基本的に酸性マトリックスなどのプロトン性マトリックスは、負イオン測定で強いバックグラウンドが出てしまうことがあり、目的成分の検出の妨げになりやすい。その場合は塩基性のマトリックスを使用することで改善することがある。また、正イオン測定でカチオン化剤を添加するときは、プロトン付加分子の生成が抑制される狙いから、非プロトン性マトリックスが有効となることがある。

[MALDI/MS のマトリックスとその他の手法]

- ✓ 使用するマトリックスは、固体や液体も含めて様々な種類が開発されている。詳しい詳細は後ほど紹介する。基本的にパルスレーザー (YAG レーザー 3 倍波 : 355nm など) に吸収を持つ試薬であり、正イオン測定においてプロトン付加を促進するために酸性寄りの化合物を使うことが多い。合成高分子などでは、非プロトン性マトリックスを使った方が良い場合もあり、対応するサンプルの種類に応じて使い分けると良い結果が得られる。
- ✓ サンプル自体がレーザーの吸収を持つ場合は、マトリックス無しでも気化するためそのまま検出できることがある。この手法は、マトリックスを使用しないので「LDI」という。溶液化できるサンプルではマトリックスを使えばいいが、溶媒に溶けなかったり、構造変化したりするサンプルで有用となる。粉末サンプルを直接プレートに塗り付けて測定する。
- ✓ マトリックスを使用しない MALDI 以外の手法もある。代表的なものの一つとして、表面に多孔体の特殊加工をした専用プレートを使う方法があり、サンプル溶液を塗布することでマトリックスフリーの測定ができる。

B. MALDI/MS の装置

[レーザー]

- ✓ JMS-S3000 のパルスレーザーは、250Hz が最大となっていて、高速で積算することができる。実際は1枚1枚を見るのではなく、デジタイザーで積算したデータを一定間隔でアウトプットし、リアルタイムでソフトウェアに表示して確認できるような仕様になっている。
- ✓ 高速パルスレーザーを用いると、レーザーを照射しながらスポットを自動で動かして連続で測定することで、スペクトルのピークの違いから画像化（イメージング）ができる。これを、イメージングマススペクトロメトリー（IMS）という。マスイメージング（MSI）ということもある。数 10 μ m オーダーの微小領域を観測することもできるが、それには専用のマトリックス噴霧器が必要となる。また、掃引や画像化に専用のソフトウェアが必要になるため、本学では対応していない。

[質量分離部]

- ✓ 現在のところ市場にあるほとんどの MALDI/MS は、質量分離部に飛行時間型(TOF)を用いている。レーザーの照射で生成したイオンを加速し、フライトチューブ内で直線飛行させることで、(1)式のように運動エネルギーと速度の関係から質量と飛行時間の二乗が比例することにより、質量分離できる仕組みである。

$$t = L \sqrt{\frac{m}{z} \times \frac{1}{2eV}} \quad \dots (1)$$

本学の JMS-S3000 は Spiral TOF という機構を備えており、直線ではなく、らせん状に周回させることにより飛行距離を長くすることができて、質量分解能を高くできる特長がある。質量分解能が高いと小数点以下の精密質量が正確に測定できることから、元素組成解析や、マスディフェクト値（小数点以下の質量を使った値）などを利用するときには Spiral モードが有用である。

- ✓ JMS-S3000 には、Linear TOF（通常の TOF）のオプションがある。飛行距離が長いとイオン間の衝突などにより生成したイオンが分解したり、電荷を失ってイオンレンズの収束ができずに検出できなくなることがある。分子量が大きいほど Spiral モードでは強度が弱くなり、分子量が 10,000 以上にもなると急激に強度が下がるので Linear が必須となる。また、不安定な構造の分子では 10,000 以下でも厳しいことがある。Linear TOF では、直線飛行で検出するため、そのような検出しにくい

分子でも測定することができる。

- ✓ JMS-S3000 には、TOF-TOF (Spiral TOF と TOF の組み合わせ) オプションがある。狭い質量範囲のプリカーサーイオンを選択し、コリジョンセル内で衝突エネルギーを与えることで生成したプロダクトイオンを測定する方法を MS/MS といい、TOF-TOF モードで測定できる。

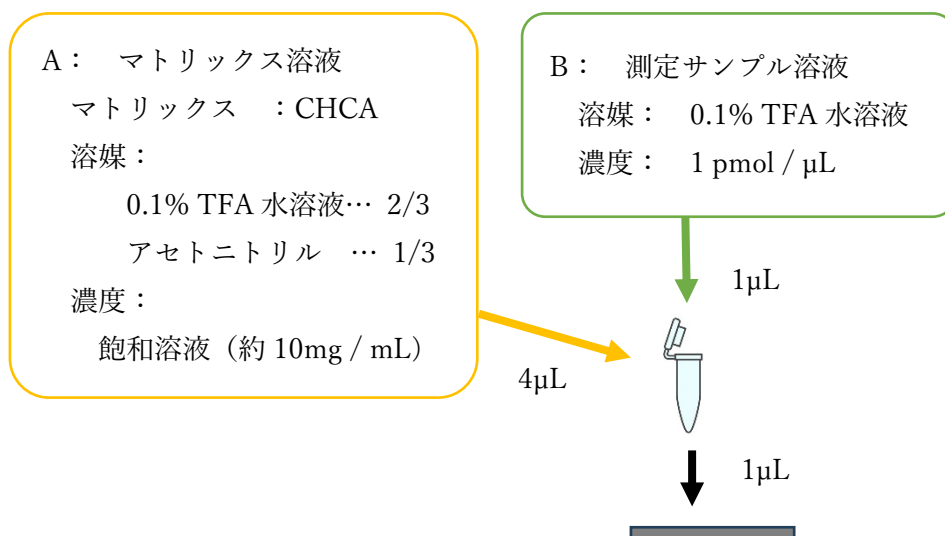
(ここに写真)

(以下、作成中・・・)

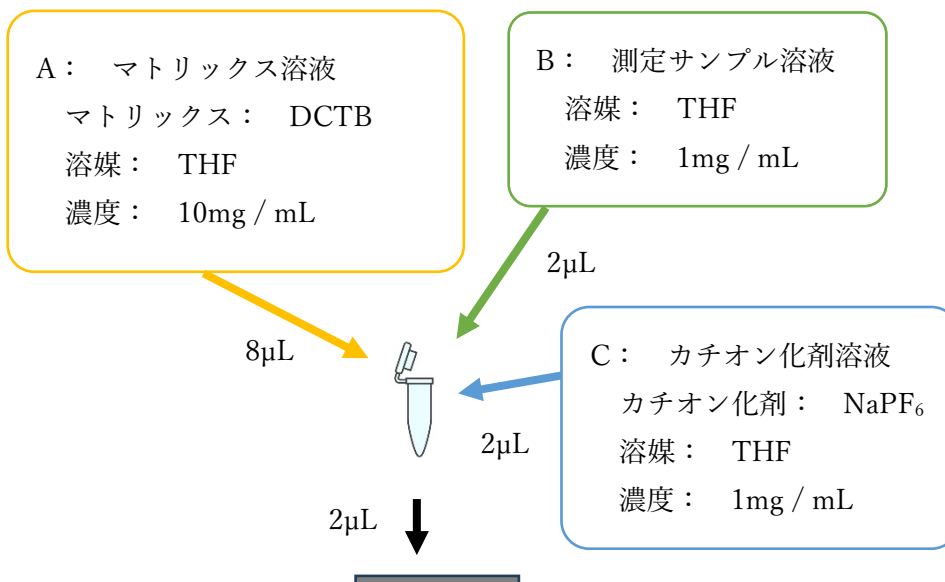
2. MALDI/MS の試料調製

MALDI/MS では、マトリックス試薬と測定サンプルを混合して専用のプレートに塗布し、混晶を作る必要がある。一例として、以下のようなサンプリング法がある。

ペプチドの例



合成高分子の例



2.1. サンプル調製をするときは、コンタミを防ぐためにクリーンベンチを用いるとよいので、送風させておく。

※ クリーンベンチ内は衣服などからホコリが落ちないように注意すること。

2.2. マイクロチューブなどの容器と、ターゲットプレートを用意する。

マイクロチューブ： マトリックスやサンプルの母液を作るときは、容量 1.5mL が扱いやすい。溶液を混合するときは少量を扱うので、0.5mL のチューブが扱いやすい。コーティング無しのスタンダードタイプか、もしくは MALDI/MS での使用が可能と明記されているチューブを用いること。

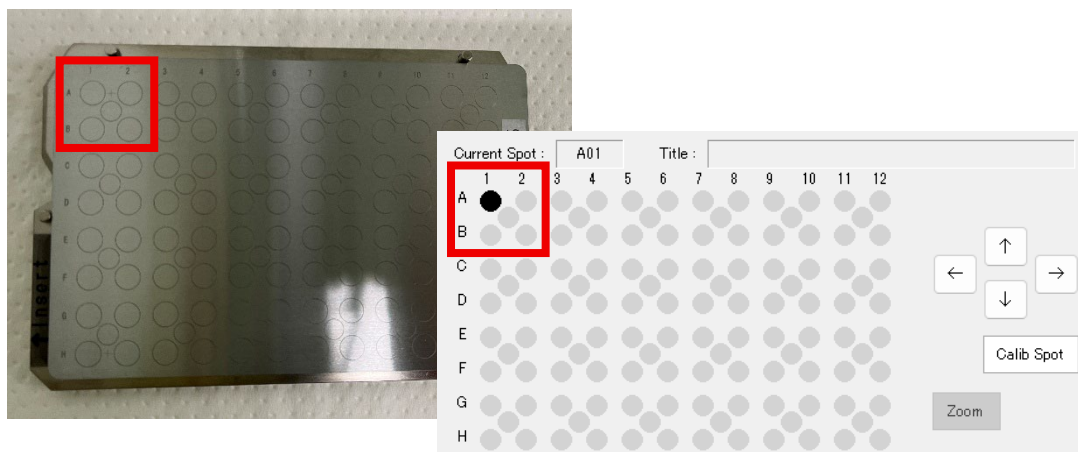
※ 有機溶剤の場合、プラスチック製品の使用には注意する。ポリプロピレンなどの材質は MALDI/MS で検出できないので、短時間であれば問題ないが、しばらく置くと可塑剤などが溶出してくるので長期保管や濃縮には向かない。合成高分子を膨潤させて溶かす場合はガラス容器を用いるとよい。

ターゲットプレート： サンプルに応じていくつかの種類があるので、適切なプレートを選択する。

384 Spot Stainless Steel Type I (001)： ペプチド・タンパク向き

96 Spot Stainless Steel Type II (111)： 合成高分子向き

96 Spot のプレート



四角枠のように A1,A2,B1,B2 の 4 つのサンプルスポットが 1 グループとなっていて、それらの中心に標準試薬をスポットする仕様になっている。

※ 水溶液は滴下したときに広がりにくいので、384 スポットの小さいスポットサイズで、鏡面加工の Type I が良い。一方、有機溶媒は滴下したときに広がりやすく、96 スポットでヘアライン仕上げの Type II が良い。合成高分子は濃度が濃くなりやすいため、スポット径が大きい方が扱いやすい。どちらを使うか迷ったときは、使用しやすいプレートを選んでよい。

2.3. マトリックス溶液 (A) を用意する。

マトリックス試薬： マトリックスの種類によるが、概ね 10mg/mL の濃度になるように秤量する。液量は 100~1000 μ L くらいでよいので 1~10mg を秤量する。

溶媒： マトリックスと測定サンプルのどちらにも適合した溶媒（溶ける溶媒）を用いる。正イオンで測定する場合、トリフルオロ酢酸（概ね 0.1%水溶液）を添加するとプロトン付加分子になりやすくなり、検出感度が上がる場合がある。

2.4. 同様に測定サンプル (B) として、キャリブレーション用の標準試薬の溶液と、測定対象サンプルの溶液をそれぞれ用意する。

標準試薬： ペプチドやタンパクなどの場合、冷凍庫に保管している専用の標準溶液を用いることができる。解凍して使用する。

それらが扱いにくいマトリックスや溶液の場合、冷蔵庫に用意しているポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール (PPG)、ポリスチレン (PS) などを用いる。それぞれ平均分子量が異なる試薬が用意されているので、測定対象の分子量に合わせた試薬を用いる。分子量に応じて、1~10mg/mL くらいの濃度になるように調整する。

測定対象サンプル： ペプチドやタンパクなどは 10 fmol/ μ L~10 pmol/ μ L、脂溶性のサンプルは 100 fmol~100 pmol/ μ L (nmol/mL) くらいになるように秤量する。極性の高いサンプルは出やすく、低いサンプルは出にくいので、サンプルに応じて調製する。サンプルが少ないときは、液量が最小で数 μ L くらいでも測定できる。

溶媒： 必ずしもマトリックスと同じ溶媒を使用する必要はないが、適合する溶媒を用いる必要がある。

※ 測定サンプルの濃度基準はモル数であるので、分子量に応じて重量を増やす必要がある。また、混合物であれば当然ながら秤量する重量も多くする必要がある。

合成高分子の場合、分子量分布を持つため分子量が 1000 程度で多分散度が低いサンプルであれば、1~10mg/mL くらい必要になることが多い。

- 2.5. 必要に応じてカチオン化剤 (C) を用意する。正イオン測定において、プロトン付加分子として検出できないようなサンプルに添加する。

カチオン化剤： 概ね 1~5 mg/mL になるように秤量する。ポリエステルやポリエーテルは Na (ナトリウム)、ポリスチレンや芳香族化合物は Ag (銀) を用いる。特殊なサンプルでは K や Cu を使うこともある。

溶媒： マトリックスに適合する溶媒を用いるが、カチオン化剤も溶ける必要がある。溶解性はカウンターアニオンの選択で調整できる。水溶液系では NaCl や AgNO₃、有機溶剤系では NaPF₆ や AgPF₆ を用いる。

※ 基本的に使用するカチオンは同位体の種類が少ない方が扱いやすい。Na の同位体は ²³Na のみであるので、検出できるのであれば測定しやすい。Ag は ¹⁰⁷Ag と ¹⁰⁹Ag の二つの同位体がほぼ 1:1 となるので、同位体パターンから付加したか否かが判別できる。付加したカチオンがわからなくなった場合にも使用できる。

- 2.6. 冒頭で紹介した参考例のように、マイクロピペットで指定量の溶液をチューブに混合し、プレートに滴下する。スポット位置は以下のようにする。

外部標準法の場合

⇒ 標準試薬はグループの中心の 1 か所

測定対象サンプルはグループの外側の 4 か所のどこかにスポット

内部標準法の場合

⇒ 標準試薬と測定対象サンプルを混ぜて、グループの外側の 4 か所のどこかにスポット

※ 有機溶剤は揮発しやすいので、水溶液に比べて液量を 2 倍くらいに増やすと扱いやすい。

※ 混合比は一例であり、それを変更すると溶液の再調製をしなくても感度を調整することができる。レーザーの応答が弱い (レーザー強度を強くしないと出ない) ときは、マトリックスの比率を上げるとよい。

※ 溶液を混合する方法は、チューブに各溶液を混合してからプレートにアプライする方法と、プレート上で混合する手法がある。また、事前にマトリックス溶液を

広くプレートに塗り付けておいて、その上からアプライするダブルレイヤー法などもある（マトリックスの割合が少なくなりやすい巨大分子に有効）。

- ※ グループ内のスポット位置は、必ずしも中心が標準試薬でなくてもよいが、中心にした方が精密質量の誤差は小さくなりやすい。
- ※ 内部標準法で測定する場合、上記のように溶液で混ぜる方法の他に、プレート上で二つのスポットを繋げたり混ぜ合わせたりする方法もある。

2.7. クリーンベンチ内でスポットを乾燥させる。

- ※ 乾燥の速度によって結晶化の度合いがかわり、検出感度に影響することがある。乾かないときは、窒素ガスやドライヤーなどで強制乾燥させると良い場合もある。

===MALDI でよく使用されるマトリックス===

名称	溶媒	主な対象	カチオン化剤
CHCA	水-アセトニトリル	ペプチド 汎用（水溶性試料）	
SA	水-アセトニトリル	タンパク、ペプチド、 糖タンパク	
2,5-DHB (DHBA)	水-アセトニトリル 水溶性有機溶剤	汎用（水溶性試料） 糖類、糖ペプチド PEG などの水溶性高分子	NaCl、KCl
DIT	THF クロロホルムなど	汎用（脂溶性試料） PPG、PS など	NaTFA、 AgTFA
DCTB	THF クロロホルムなど	汎用（脂溶性試料） PPG、PS など	NaTFA、 AgTFA
IAA	アセトニトリル メタノール	PMMA、PS など 核酸	AgTFA、AgNO ₃
3-HPA		核酸	
1,5-DAN		脂質、糖脂質など	
9-NA		フラーレンなど	
5-CSA		シリコンオイルなど	
3-AQ			

CHCA: α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CAS RN® : 28166-41-8)

SA: Sinapinic Acid (CAS RN® :

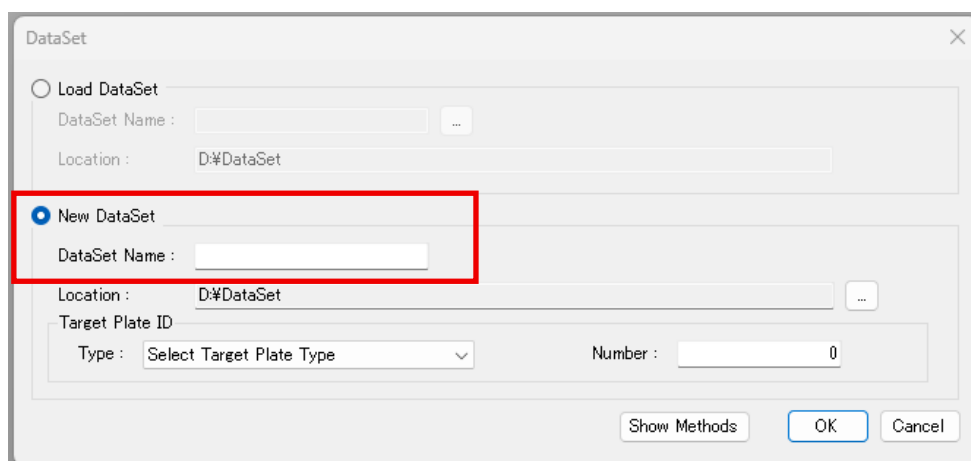
3. MALDI/MS の準備（起動とターゲットプレートの挿入）



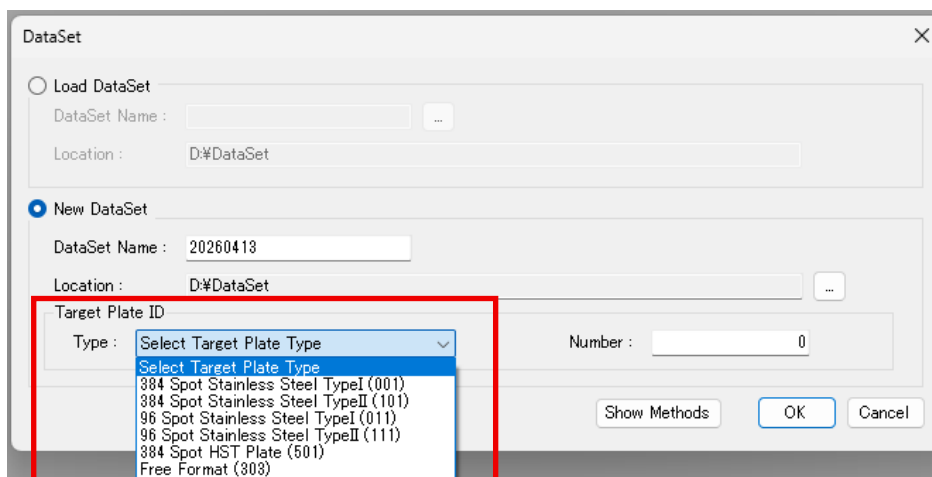
3.1. msTornado Control を起動する。

3.1.1. DataSet ダイアログが表示されるので、New DataSet を選び、DataSet Name を入力する。

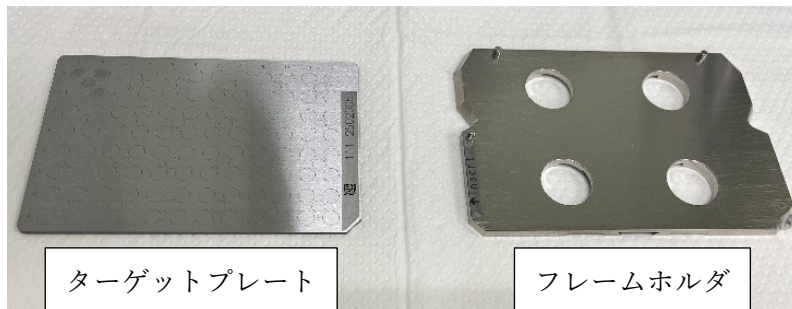
※ DataSet Name に格納されるのは、プレート 1 枚ごとに、その日に測定したいサンプルのすべてのデータが入ったものとなる。個々のサンプル名は、後でエクスポートして出力するので、ここでは日付や利用者名などを付けておくと無難である。



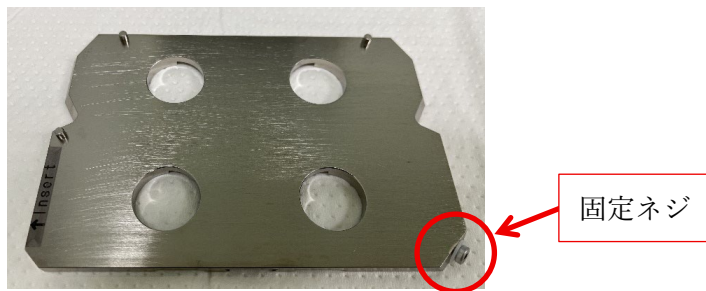
3.1.2. Target Plate ID で用意したプレート名を選ぶ。末尾の（ ）内の ID 番号で区別するとわかりやすい。



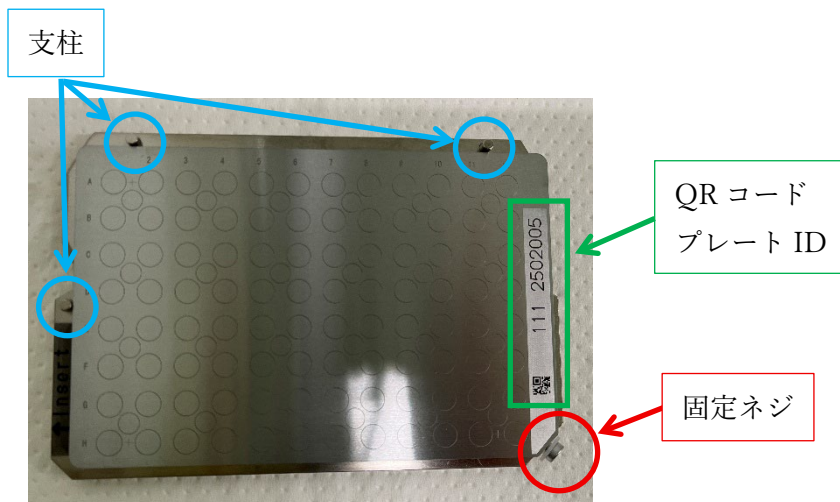
3.2. サンプルを滴下した後のターゲットプレートと、専用のフレームホルダを準備する。



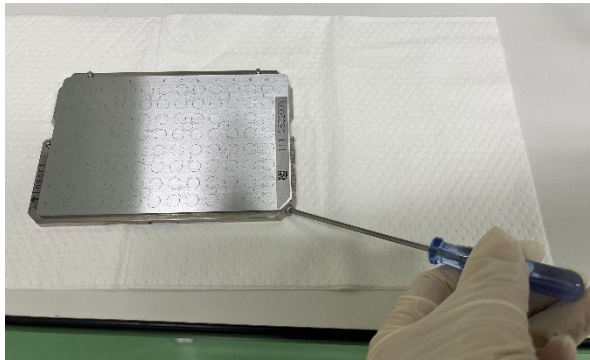
3.2.1. ホルダの角の1か所に付いている固定ネジを付属の六角レンチを使用して緩める。



3.2.2. 写真のように「QRコード/プレートID」が「固定ネジ」の近くになるようにプレートを載せ、3本の支柱に押し当てるように設置する。

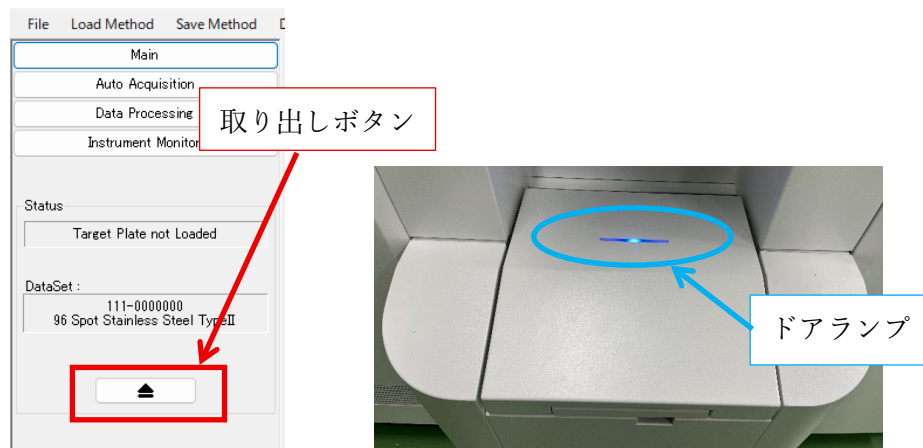


3.2.3. 六角レンチで固定ネジを締めて、プレートが取れないように固定する。

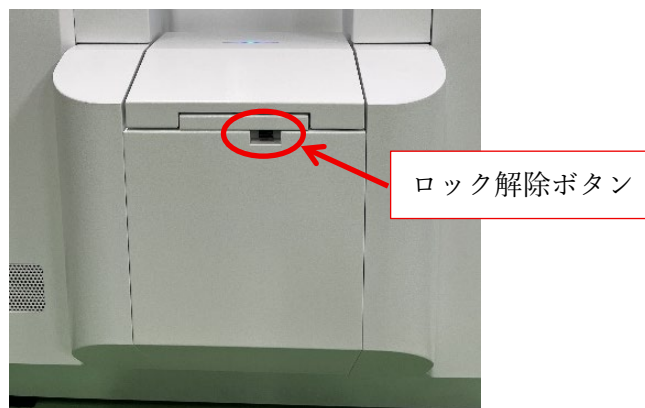


3.3. 以下の手順でプレートを導入する。

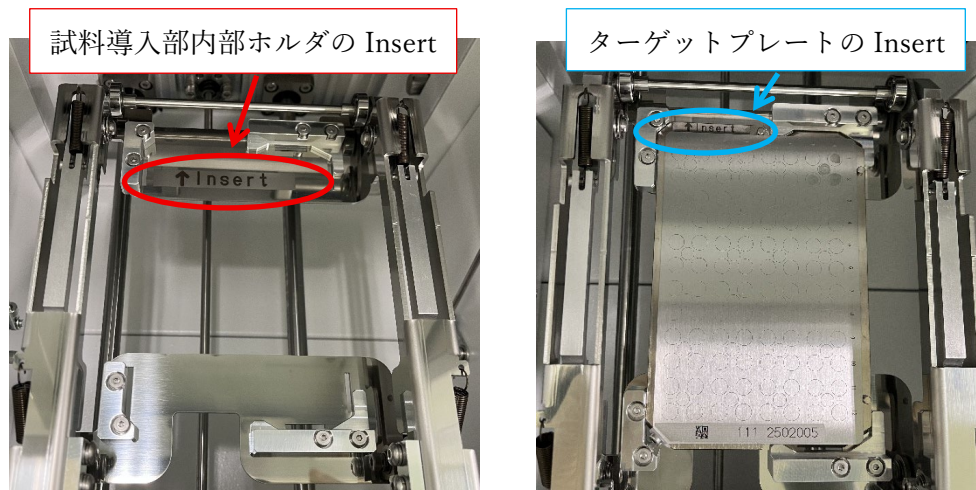
3.3.1. msTornado Control の **Main** 画面にある取り出しボタンをクリックする。本体のプレート導入部のドアランプが点灯するのを待つ。



3.3.2. プレート導入部の手前にあるロック解除ボタンを押すと、ドアが浮き上がるので引き上げる（跳ね上げドアになっている）。

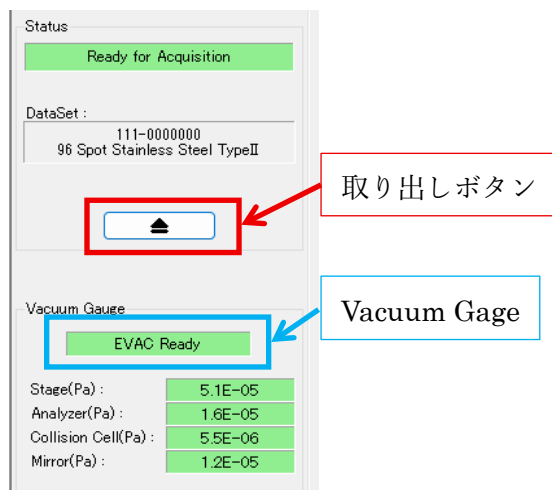


3.3.3. 試料導入部内部のホルダに書いてある Insert の文字と、ターゲットプレートに書いてある Insert の文字が重なる向きにして、矢印方向（奥側）に押し当てるようにして設置する。



3.3.4. プレート導入部のドアを下げて閉める。

3.3.5. 取り出しボタンを再びクリックし、真空中に引かれるのを待つ。真空が十分になると、Vacuum Gauge が EVAC Ready（緑）に変わる。



3.3.6. Set Loaded Target Plate ID ボタンをクリックし、プレート ID (QR) を認証する。

4. MALDI/MS の測定

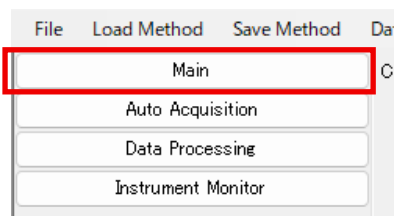
本装置は、質量校正（マスキャリブレーション）の手順の違いにより、以下のような手順の組み合わせがある。基本的に共通部分を含めて手順の流れで説明するが、不要な項目は飛ばして、必要な項目を参照すること。

- | | |
|-----------------|---------------------------|
| A. 外部標準法 | [測定モード] Spiral または Linear |
| B. 内部標準法 | [測定モード] Spiral |
| C. フラグメントイオンの校正 | [測定モード] TOF-TOF |

===測定前の準備===

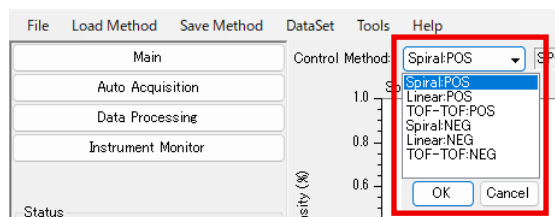
4.1. 以下の手順で測定前の条件設定を行う。

4.1.1. msTornado Control の画面を見て、左上のメニューから **Main** パネルを表示する。



4.1.2. Control Method の▼をクリックし、測定したいモードを選択する。

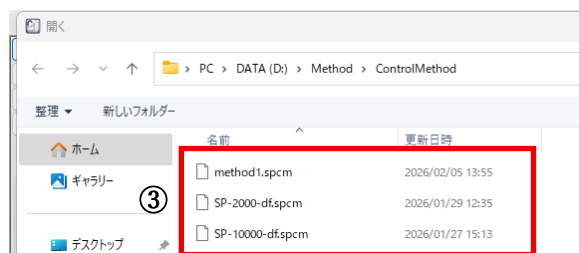
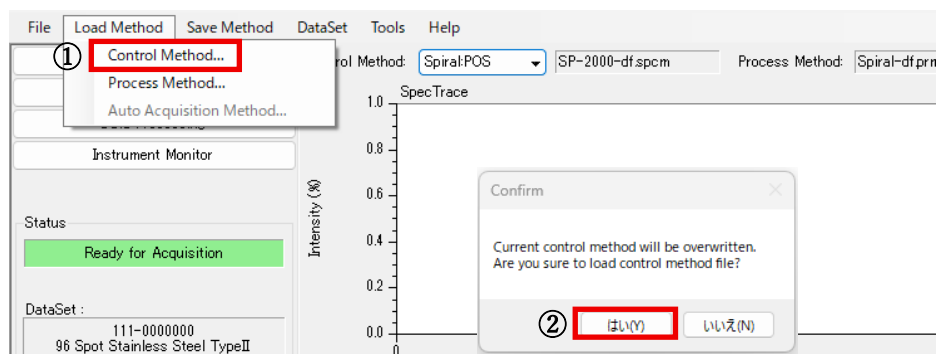
- ✓ Spiral : 高分解能モード / Linear : 低分解能モード
/ TOF-TOF : MS/MS 測定モード
- ✓ POS : 正イオン (Positive Ion) / NEG : 負イオン (Negative Ion)



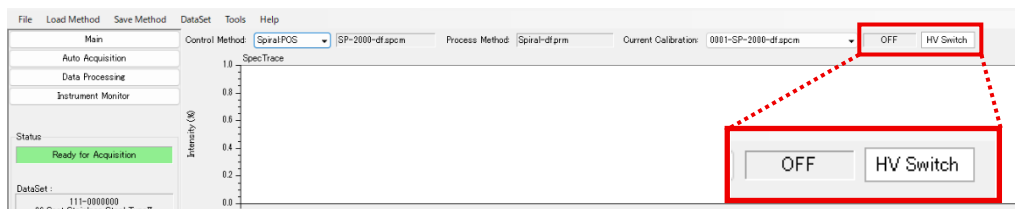
- ※ Spiral の高分解能モードは、マススペクトルの横軸の分解能が高くなり、ピークの分離が良くなる。小数点以下の質量を正確に測定したい場合はこちらを選択する。一方、Linear の低分解能モードは、分子量が大きすぎて飛行中に壊れてしまい、検出できないようなサンプルに向いている。概ね分子量が1万以上になるとSpiral では検出感度が急激に下がる傾向がある。
- ※ TOF-TOF モードは、測定したいイオン（プリカーサーイオン）を狭い質量範囲で取り出し、チャンバー内で導入ガスなどと衝突させることでイオンをばらばらにして、生成したイオン（プロダクトイオン）を検出する方法である。構造解析やデータベース検索などで用いる。
- ※ 正イオン（POS）は中性や塩基性のサンプルで検出されやすいのに対して、負イオン（NEG）は酸性のサンプルが検出されやすい。正イオンではNaやAgなどの金属イオンをサンプルに混ぜることで検出しやすくすることもできる（詳細はサンプリングの章を参照）。

4.1.3. Load Method メニューの Control Method を選ぶ。Confirm の確認事項を「はい」として、測定したいメソッドファイルを読む。

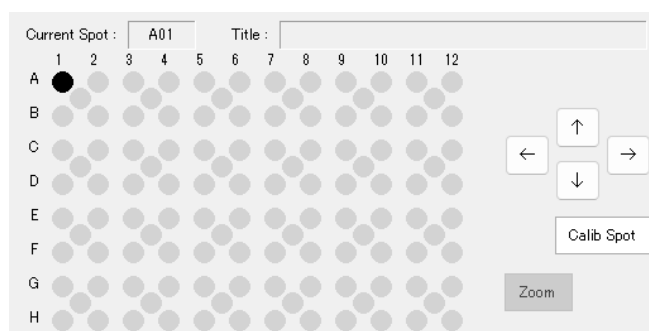
- ✓ Spiral モード： SP-2000-df/SP-10000-df
 （数字は質量の設定であり、測定対象のうち最も大きいものを基準に選ぶ）



4.1.4. **HV Switch** をクリックして、OFF から ON に変更する。



4.1.5. 右下のサンプルプレートの画面から、サンプルを載せたスポット位置をクリックする。通常であれば標準試薬のスポットを測定条件の調整に用いる。

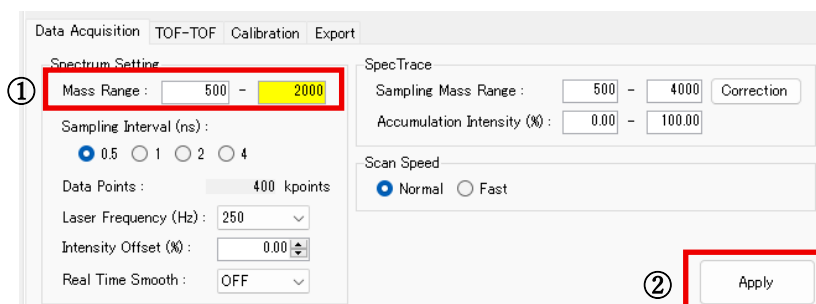


※ 384 spot と 96 spot のプレートがあるが、間違っていれば必ずここで修正する。

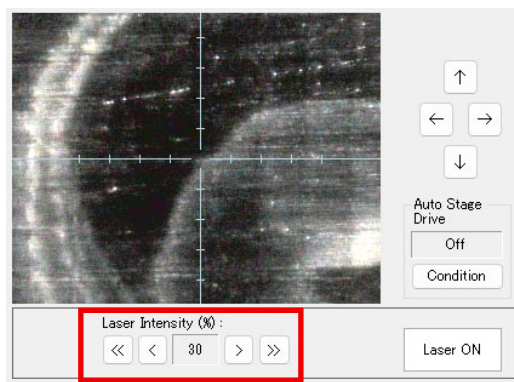
4.1.6. Data Acquisition タブを開き、Mass Range (m/z) に測定質量の範囲を入力する。

- ✓ Spiral モードの最大： m/z 4~30,000
- ✓ Linear モードの最大範囲： m/z 4~500,000

※ 最大範囲にするとファイルサイズが大きくなって扱いにくいので、見たい範囲を適度に取り。低質量側はマトリックスのピークが強くなるので、解析の邪魔になるときはカットするとよい。



4.1.7. レーザーの条件がわからないときは、Laser Intensity を 30%程度に設定しておく。
経験がある場合は適度な強さに設定する。

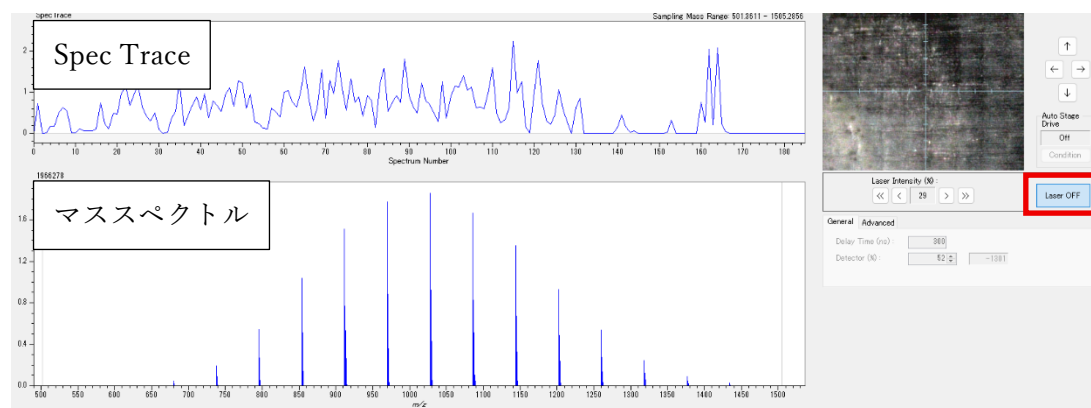


===測定条件の調整===

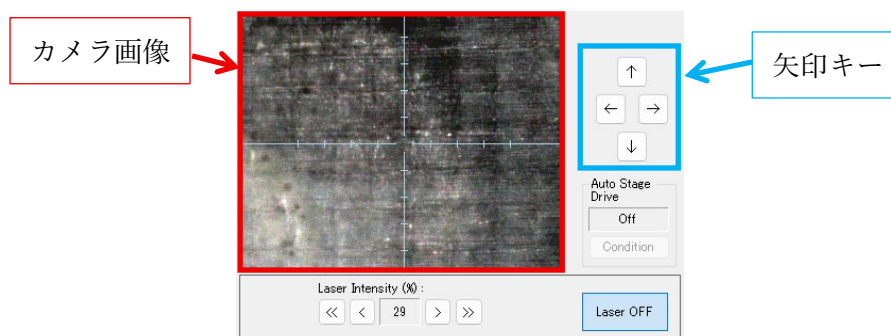
4.2. 以下の手順で測定を行いながら、条件の調整を行う。

4.2.1. **Laser ON** をクリックすると、ボタンが OFF になって照射が開始される。画面の上段の Spec Trace (リアルタイム追跡モニタ) と下段の積算したマススペクトルの画面を見て、以下の調整をする。

※ マススペクトルの拡大をしたいときは、マウスの左クリックで範囲指定して離すと拡大される。元に戻すときは左をダブルクリックする。



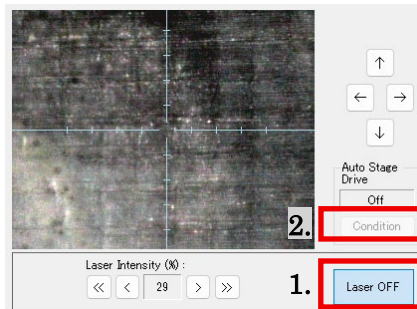
4.2.2. サンプルスポットのカメラ画像で目標の場所をクリックすると照射位置が移るので、信号がよく出る大まかなスポット位置を探す。検出される場所が見つかったら、矢印キーをクリックして、小刻みにスポットを動かして積算し、マススペクトルの状態を見る。



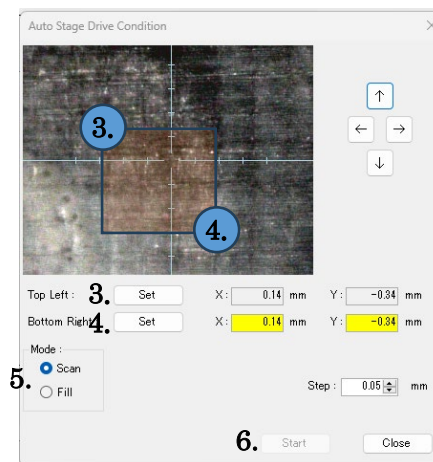
【Auto Stage Drive の使い方】

この機能を使用すると、スポットを自動的に動かして測定することができる。以下のような手順で設定する。

1. 照射中の場合は、**Laser OFF**にする。
2. Auto Stage Drive の **Condition** ボタンが
アクティブになるのでクリックする。



3. カメラ画像で照射したい左上の位置を
クリックしてスポットを移動し、Top
Left の **Set** ボタンをクリックする。
4. 同様に、カメラ画像の右下の位置をクリ
ックして、Bottom Right の **Set** ボタンを
クリックする。
適切な設定をすると黄色表示が消える。



5. 範囲内で稼働させるモードを Scan / Fill
から選択する。

Scan: 左右にスキャンしながら、指定距離だけ少しずつ下がっていくモード。

Fill: 指定時間ごとに指定距離だけスポットを動かす、すべて掃引していくモード。

6. **Start** をクリックすると、レーザーの照射が始まり、測定が開始する。
7. 止めるときは、**Laser OFF** ボタンをクリックする。

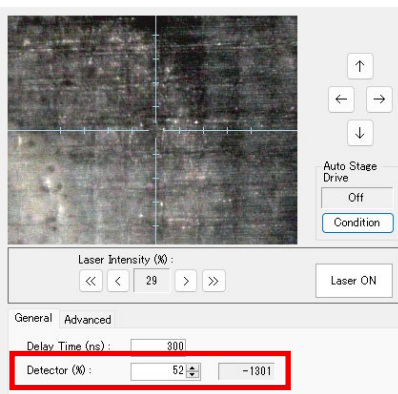
4.2.3. 信号が出ない場合は、Laser Intensity の数字を少しずつ上げていく（数%ずつくらい）。それでも出ないときは、スポット位置が悪いことがあるので確認する。

※ **Laser Intensity** は上げすぎに注意する。揮発性があるマトリックスを使っている場合は、上げすぎるとマトリックスがすぐに蒸発してしまい、感度を上げにくくなる。また、Spiralモードのような高分解能では、マススペクトルのピークが歪み、テーリングなどを起こすこともある。きれいなデータを取りたいときは、マススペクトルのピーク1本を拡大し、左右が対称になっているかチェックするとよい。

※ 使用するマトリックスと溶媒の組み合わせによっては、サンプルが偏ってムラができることがある。結晶性が良いマトリックスはスポットごとに変わるがあるので、Fill モードで自動測定した方がいいことがある。また、偏りが生じやすいマトリックスでは、スポットの明るいところと暗いところをどちらも照射してみて、良い方を選択する。また、スポットの中心部で出ないときは、外周をなぞってみると出ることもある（サンプルの結晶化が速い場合）。

4.2.4. ピーク強度の大きさとベースラインのノイズとのバランスが悪いときは、Detector の数値 (Gain) を調整する。

※ Detector Gain も上げすぎに注意する。マススペクトルのピークとベースラインの境界を見て、ノイズが広がっているときは少し下げる。一方、レーザーの調整だけではピーク強度が全体的に小さく、安定しない場合は Detector Gain を上げるとよくなることもある。

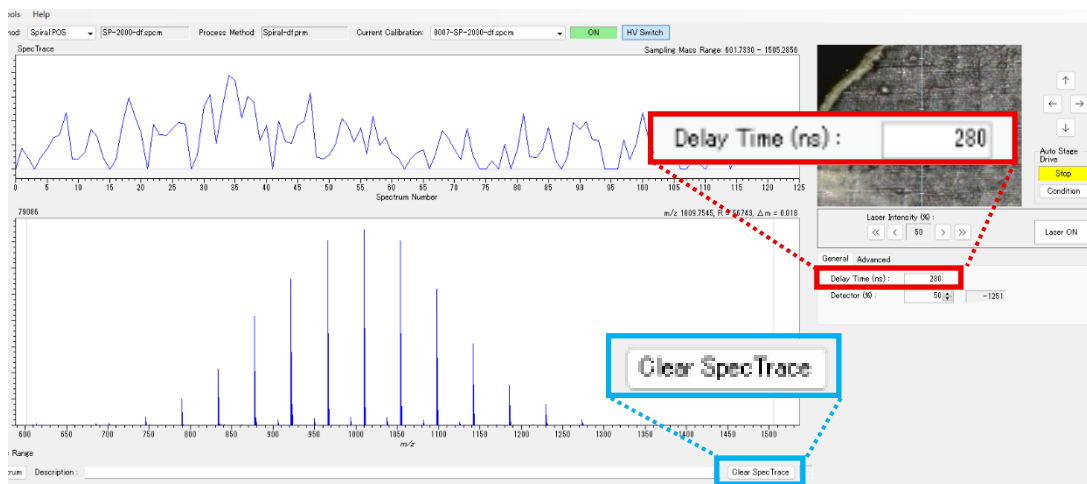


4.2.5. 信号が出るようになったら、**Laser OFF** をクリックして一度止める。検出されたマススペクトルの主要ないくつかのピークを見て、目的ピークの強度が十分に出ているかを確認する。強度が弱い場合は、下記の※の説明の通りに Delay Time を変更する。**Clear Spec trace** ボタンをクリックしてデータをクリアした後、**Laser ON** で再測定し、良好な強度になるように調整する。

※ Delay Time と Gain は Laser OFF にしないと変更できない。Auto Stage Drive を使用しているときは Laser も変更できない。

※ Delay Time は短いと低質量側、長いと高質量側が強調される。質量範囲やサンプル条件によっても変わる。

※ 本測定のときは Delay Time を一つに決める必要があるので、標準試薬だけでなく、測定対象サンプルの質量にも合った条件にしておく。



===測定===

4.3. 前項の調整手順を繰り返し、適切な条件が決まったら、以下の手順で本測定を行う。

※ 標準試薬のスポットと、測定対象サンプルのスポットは、同じ Delay time にして変更しないこと。また、Spectrum Setting (Mass Range など) も変更しないこと。Laser や Detector の強度は、検出条件が悪ければ変更してもよい。

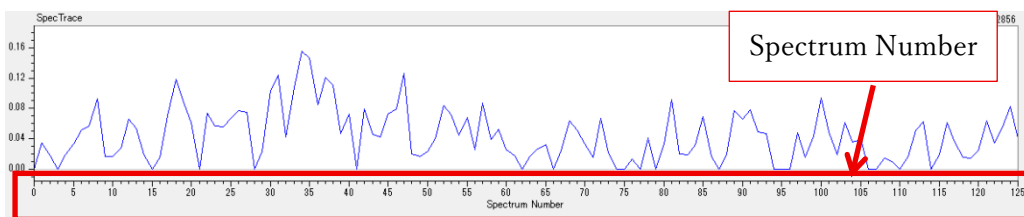
※ 標準試薬がある場合は、そちらを先に測定すると手順としてはスムーズに進行する。ただし、データを保存してあれば、後で再キャリブレーションすることはできる (後述)。

4.3.1. Clear Spec trace ボタンをクリックして、一度データをクリアする。

4.3.2. Laser ON をクリックしてマニュアルでステージ移動し続けるか、または Auto Stage Drive を使って測定する (標準試薬は Auto 推奨)。

4.3.3. Spec Trace の Spectrum Number は、50~100 程度になるまで積算する。止めたいところで Laser OFF をクリックする。

※ 強度が弱めのサンプルの場合、100 以上積算してもよい。最大は 2000。



4.3.4. Description にサンプル情報やコメントを入力し、Save Spectrum ボタンをクリックする。

※ データ名は Description に関係なく以下のルールで自動的に作成される。
[測定モード] - [スポット位置] - [測定モード] - [通し番号]
例) SP-A01-00-001

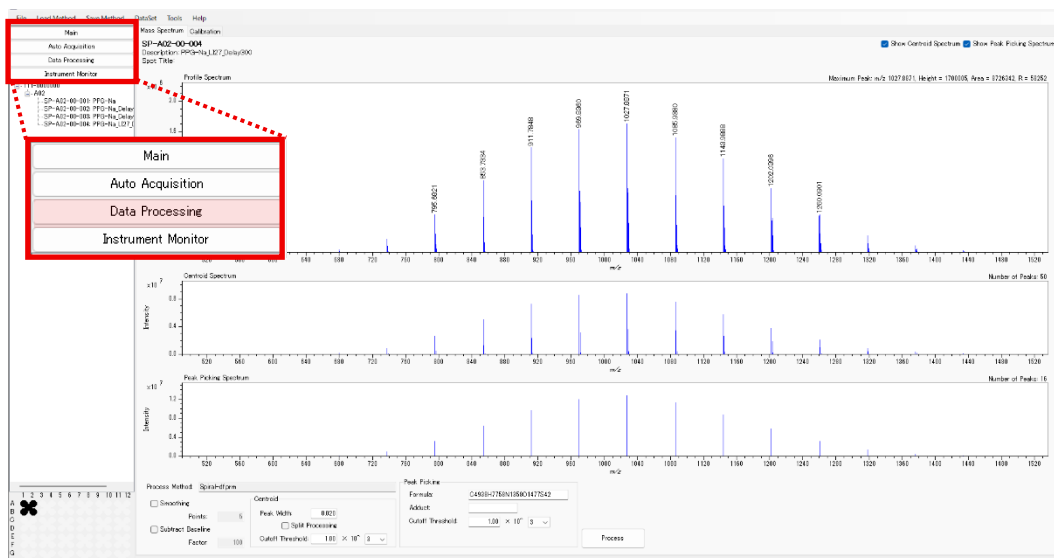
===外部標準法でのキャリブレーション===

4.4. 外部標準法を用いる場合、標準試薬を測定してデータを保存したら、以下の手順でキャリブレーションを行う。内部標準法や TOF-TOF モードでも使用することがあるので、その場合は必要に応じて対応すること。

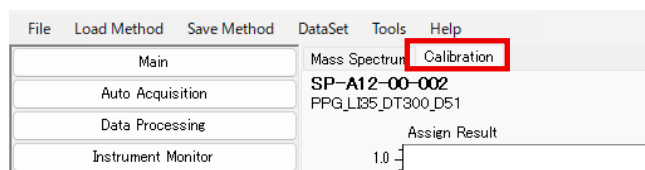
4.4.1. **Data Processing** ボタンで画面を切り替え、マススペクトルに問題がないか確認する。上段が Profile (マススペクトル)、中段が Bar (ピークの中心を求めバー表示に変換したもの) となっているので、Bar が Profile の分布を再現しているかチェックする。

※ Bar の再現性が悪いときは、ピーク検出の条件が悪いことがある。Process Method の Centroid 条件を見直し、良くなるように設定する。ピークの分解能が合っていないときは Peak Width を調整し、ピーク強度が小さくて検出できないときは Cutoff threshold を下げる。

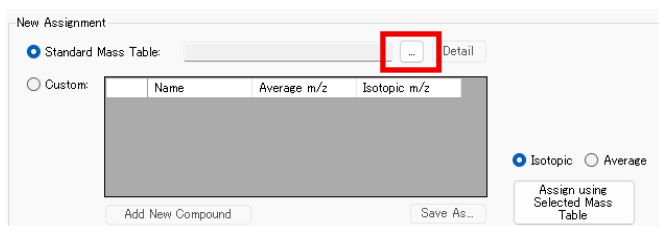
※ 複数測定した場合は、左枠のツリーから保存したスペクトルを選ぶことができる。



4.4.2. Calibration のタブに切り替える。



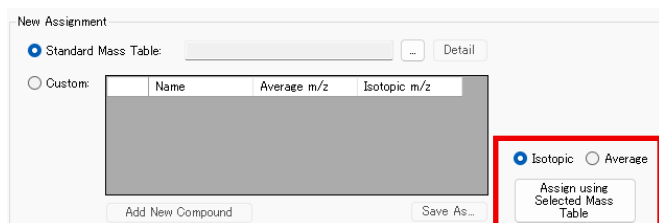
4.4.3. Standard Mass Table の ... をクリックし、標準サンプルの質量テーブルを読み込む。



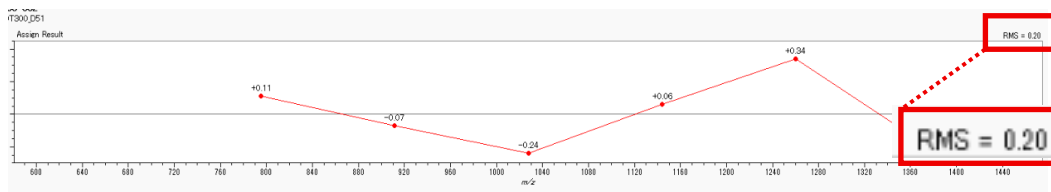
※ テーブルがない場合は担当者に相談する。キャリブレーションに使用しない質量が入っていても後で消去できるが、多すぎる場合は設定しておいた方がよい場合もある。

4.4.4. Spiral モードなら Isotopic を選択し、Assign using Selected Mass Table をクリックする。

※ Linear モードの場合は、シグナルの同位体ピークが分離しているか、していないかで選ぶ必要がある。Bar 表記で見たときに同位体が検出できていれば Isotopic、できていなければ Average にする。分子量が大きいほど Average でないと難しくなり、スムージングなどのピーク処理が必要な場合もある。



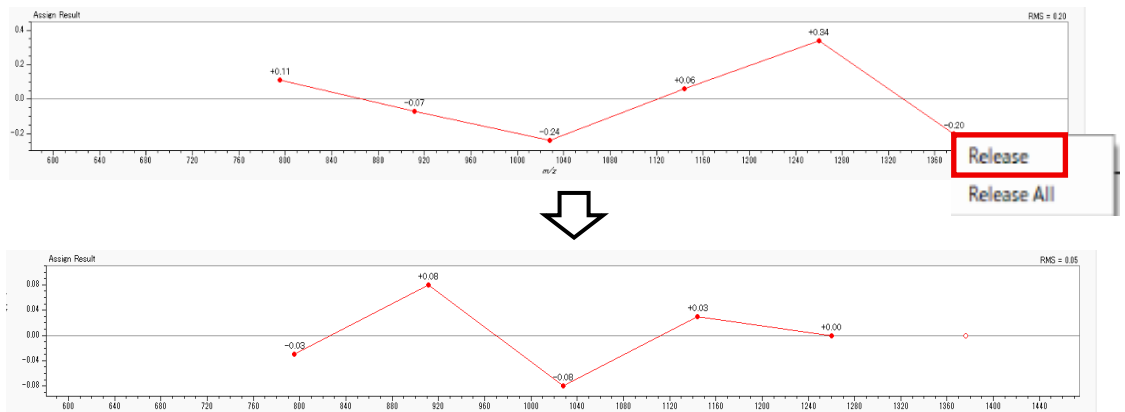
4.4.5. Assign Result の画面を見て、縦軸の Residual Error(ppm)が極端に悪いピークがないか確認する。右上の RMS が 2.0ppm 以下 (Spiral モードの場合) になっていることを確認する。



※ Linear モードで Isotopic にした場合、RMS 50ppm 以下。

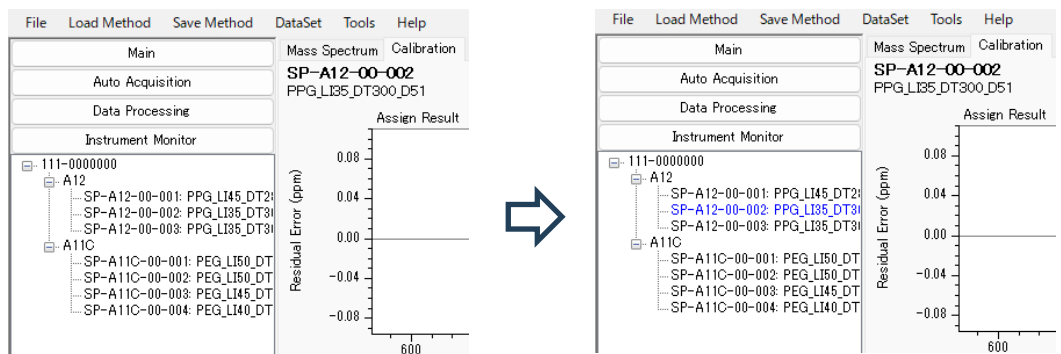
※ ピーク強度が不十分な場合、間違っってピーク検出している場合、使用しない質量

範囲のピークである場合などは、適用除外することができる。[Assign Result](#)の消したいポイントの●のところを右クリックし、Release を選択する。○になれば除外される。再設定するときは、同様に画面中段のマススペクトルのピークを右クリックして表示される質量から正しいものを選ぶ（ピークを拡大しておく）。



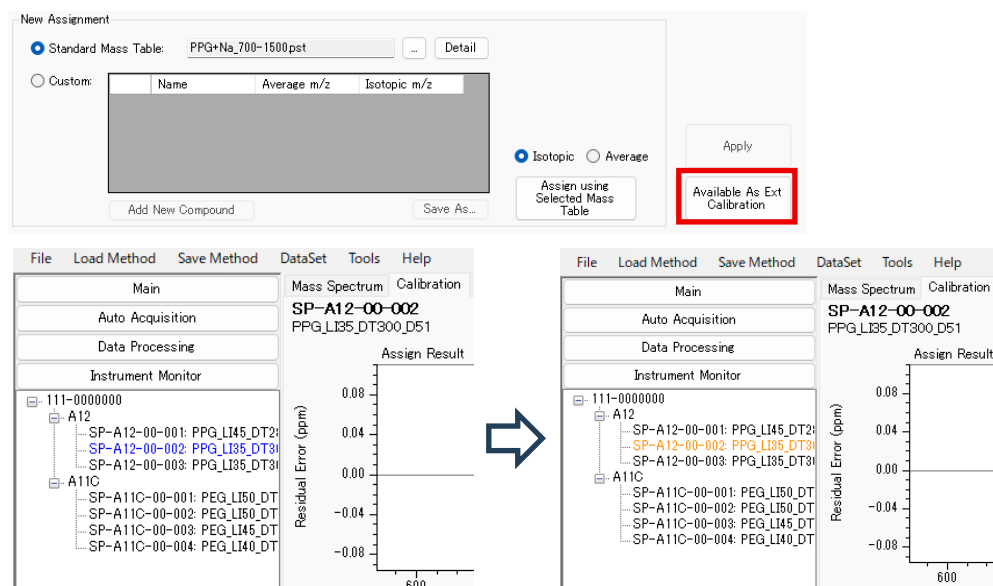
※ RMS 値は、4 点以上ないとゼロとなり、正確な表示にならないことがある。その場合は、Residual Error から各ピークの状態を判定する。

4.4.6. 確認が終わったら、[Apply](#) をクリックする。キャリブレーションに使ったデータ名が黒字から青字へと変更される。



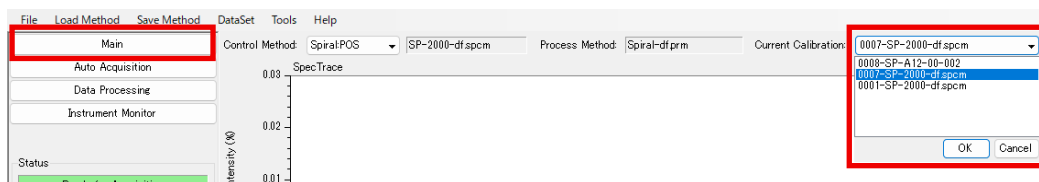
4.4.7. 上記の結果を外部標準として他のデータにも適用するには、**Available As Ext**

Calibrationをクリックする。データ名が青字から橙色に変わる。



4.4.8. 次の測定に反映させるには、**Main**画面に表示を戻し、**Current Calibration**の▼をクリックする。上記で適用したデータ名がリストに並んでいるはずなので、それを選択する。

※ この作業を行っていないとメソッドの初期設定を参照してしまうので、リアルタイム画面で m/z が少しずれたスペクトルになることがある。



設定を忘れてしまった場合や、測定後にもう一度やり直したいときは、データが保存されていれば再キャリブレーションの操作で修正することはできる。

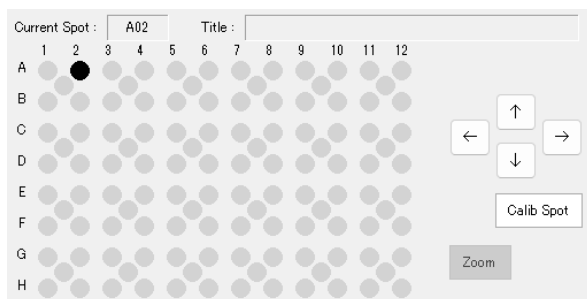
1. **Data Processing**の画面に切り替え、再キャリブレーションをしたい標準試薬の測定ファイルを開き、外部標準の操作を行って、**Available As Ext Calibration**まで実行する（既に実行済みの場合は省略できる）。
2. 適用したい測定対象サンプルのファイルを開き、スペクトル画面で右クリックして **Properties** を選択する。
3. 開いたウィンドウの Calibration のタブを開いて、再キャリブレーションを行ったデータ名を設定する。
4. スペクトルに結果が反映されたか確認する。以降は設定したデータ名の再キャリブレーションを行えば、対応してこのデータも変更されるようになる。

===外部標準法での測定対象サンプルの測定===

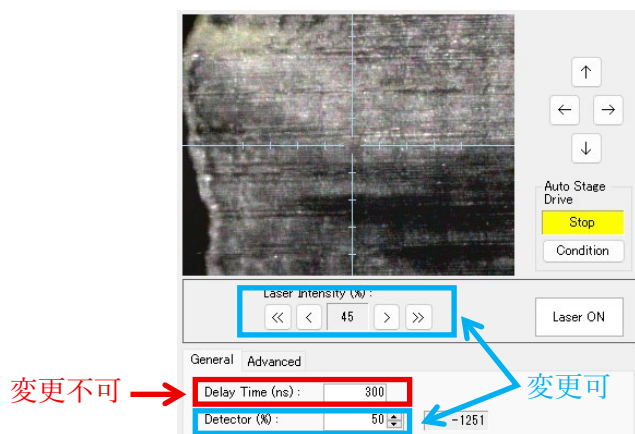
4.5. 外部標準法でキャリブレーションした場合や、省略してデフォルトのパラメータを使う場合は以下の手順で測定対象サンプルの測定を行う。

4.5.1. **Main** 画面を開いていなければ表示する。右下のプレート画面から測定対象サンプルをスポットした位置をクリックする。

※ サンプル調製の章でも説明しているが、基本的にキャリブレーションを適用するには同じグループ（5点）のスポットを使う必要がある。

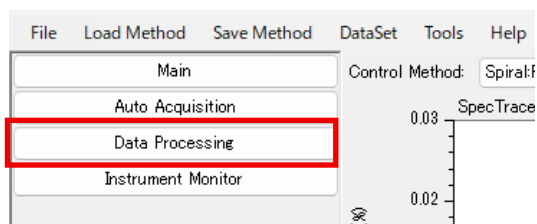


4.5.2. 標準試薬の測定と同様に、Laser Intensity や Detector Gain などの調整を行う。このとき、Delay Time などの変更不可のパラメータは変えないこと。

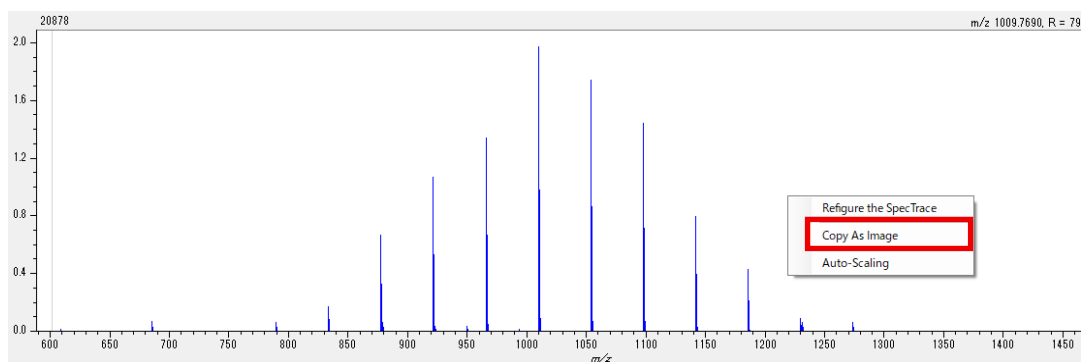


4.5.3. 「測定」の項で説明した手順にしたがって測定し、**Save Spectrum** でデータを保存する。

4.5.4. **Data Processing** の画面に切り替え、保存したマススペクトルを確認する。



4.5.5. スペクトルの画像をコピーして Word などに貼り付ける場合、スペクトル画面で右クリックして Copy As Image を選択する。

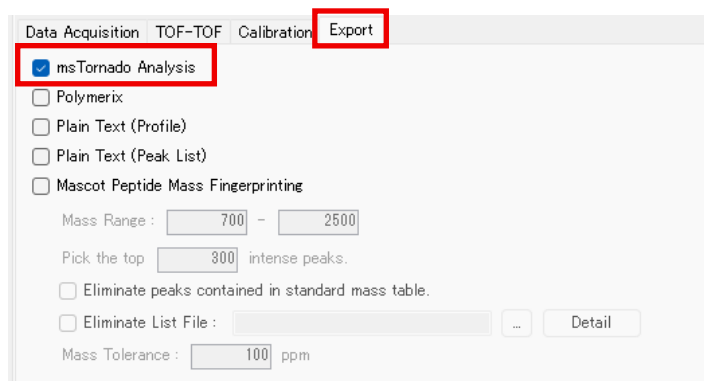


4.5.6. スペクトルを印刷（PDF 変換）するときには、右クリックの Print を選ぶ。

4.5.7. データを解析ソフトウェア（msTornado Analysis）で解析したい場合は、右クリックの Export → msTornado Analysis を選択する。他のソフトウェアで開く場合も同様。

※ Export をしないと他のソフトウェアでは開けないので注意。

※ 一括で Export する機能もある。DataSet メニューから、Export → Manual Batch Export を選択し、出力したいスポットとモードを選んで Export する。



===内部標準法での測定とキャリブレーション===

4.6. 内部標準法で測定する場合は、以下の手順で測定とキャリブレーションを行う。

4.6.1. 試料作製手順により、標準試薬と測定対象サンプルを同じスポットに混ぜたものを用いて測定を行う。

※ より正確な分析を行うために、標準試薬だけのスポットを用意しておき、外部標準法と併用してもよい（事前に測定しておく）。

4.6.2. **Main** 画面を開いていなければ表示する。左下のプレート画面からスポットした位置をクリックする。

4.6.3. 標準試薬と測定対象サンプルがバランス良く検出されるように、Laser Intensity や Detector Gain、Delay Time などの調整を行う。

※ ここでバランスが良くならない場合は、サンプル濃度を変えるか、スポットのやり直しなどをして調整しなす。

4.6.4. 「測定」の項で説明した手順にしたがって測定し、**Save Spectrum** でデータを保存する。

4.6.5. **Data Processing** の画面に切り替え、保存したマススペクトルを確認する。

※ この後、msTornado Control 上でキャリブレーションすることもできるが、msTornado Analysis の機能が多いので、以下のようにエクスポートして解析するとよい。

4.6.6. データを解析ソフトウェア（msTornado Analysis）で解析したい場合は、右クリックの Export → msTornado Analysis を選択する。他のソフトウェアで開く場合も同様。

- 4.6.7. msTornado Control を起動しているときは、Tools メニューから msTornado Analysis を選択して起動する。パソコンのデスクトップにショートカットがあるので、そこから起動してもよい。
- 4.6.8. Control から起動したときはデータが開かれた状態になっている。直接起動したときは、File メニューから Open Project Folder を選択し、データが保存されているフォルダを選択する。
- 4.6.9. 解析したいデータを左枠のリストから選択し、右クリックの Open、もしくはダブルクリックでスペクトルを開く。
- 4.6.10. ここで内部標準法によりスペクトル内でキャリブレーションする場合は、以下の手順で行う。
1. スペクトル画面で右クリックし、Calibration を選択する。
 2. Standard Mass Table にチェックを入れ、 から標準試薬のテーブルを選択する。
 3. Isotopic を選択した状態で、 をクリックする。
 4. RMS 値が 2.0 以下であることを確認し、問題なければ OK する。
- ※ 元に戻したいとき（外部標準法の結果に戻すとき）は、 をクリックする。

標準試薬を混ぜていない場合であっても、低分子化合物であれば、マトリックス由来のピークや既知の不純物などから簡易的なキャリブレーションすることもできる。以下のように行う。

※ 標準試薬が必要ないというわけではなく、別にスポットした標準試薬で外部標準法によりキャリブレーションし、その後にマトリックス由来のピークで内部標準法によりキャリブレーションする、という手順になる。

【事前準備】 予め外部標準法により標準試薬でキャリブレーションしておく。このとき、検出される標準試薬のピークの範囲に対して、測定対象サンプルのピークが範囲内にあるようにする。

1. スペクトル画面で右クリックし、Calibration を選択する。
2. Custom にチェックを入れ、**Add New Compound** をクリックする。
3. テーブルに行が追加されるので、マトリックス由来などのピークに該当する質量を入力する。精密質量解析の場合は、Isotopic m/z のみでよい。別テーブルからコピーペーストすることもできる。
4. Isotopic を選択した状態で、**Assign using Selected Mass Table** をクリックする。
5. RMS 値が 2.0 以下であることを確認し、問題なければ OK する。

※ テーブルが 3 点以下の場合、自動的に RMS がゼロとなる。

=== 組成推定 ===

4.7. 精密質量（小数点以下の質量）を用いて元素組成のシミュレーションを行う場合は、以下の手順で行う。

4.7.1. msTornado Analysis 用にエクスポートしたデータを用意する。

※ キャリブレーションしていない場合は、ここで行っておく。

4.7.2. アイコンの CH_n をクリックし、Elemental Composition Estimation を表示する。

4.7.3. アイコンの CH_n をクリックし、解析したいピークの位置で右クリックし、表示された数値を選択すると、Mass 欄に値が入力される。

※ ピーク範囲内でクリックする必要があるため、ピークの先端ではなく、真ん中あたりをクリックするとよい。

4.7.4. 組成推定の条件を設定する。

Tolerance : 許容される誤差として相対質量確度 (ppm) を入力する。

m/z 1,000 のピークで Tolerance 5ppm なら、 ± 0.001 (1mDa)

Electrons : イオンの電子数の偶奇を選択する。

偶数 : カチオン ($[M+H]^+$ など)、アニオン ($[M-H]^-$ など)

奇数 : ラジカルカチオン ($M^{\cdot+}$)、ラジカルアニオン ($M^{\cdot-}$)

Charge : イオンの電荷数を入力する。通常は 1 価を選ぶ。

DBE Range : 不飽和度の下限と上限の範囲を入力する。

Mas Results : 検索される最大数を入力する。誤差の小さいものから出力される。

Elements : 計算シミュレーションに使用する元素とその数を設定する。

※ Elements の表に無い元素は、計算の対象外になる。Na や Ag などが付加して検出される場合でも表に入れておく必要がある。逆に付加していないとわかっている場合はゼロにしておくといよい。

4.7.5. Estimateをクリックすると、Results に結果の表が表示される。

===MS/MS 測定 (TOF-TOF モード) ===

4.8. TOF-TOF モードは、狭い質量範囲のプリカーサーイオンを選択し、コリジョンセル内で衝突エネルギーを与えることで生成したプロダクトイオンを測定する方法である。測定を行う場合は、以下の手順で行う。

4.8.1. このモードで測定をする前に、Spiral モードで外部標準法でのキャリブレーション測定と、サンプル測定をしておく。

4.8.2. Control Method の▼をクリックし、TOF-TOF モードに変更する。

4.8.3. Load Method メニューの Control Method を選ぶ。Confirm の確認事項を「はい」として、測定したいメソッドファイルを読む。

4.8.4. サンプルプレートの画面から、測定したキャリブレーション用のサンプルスポットを指定する。

4.8.5. タブを TOF-TOF に切り替え、Precursor Ion Tuning にチェックが入っていることを確認する。

4.8.6. Precursor Ion Selection の をクリックする。Precursor Selection ウィンドウが開くので、左側の Peak Picking List、または Centroid Spectrum から測定対象としたいプリカーサーイオンを選択すると、選んだ m/z が左枠に表示される。

Peak Picking List ⇒ 選択したいテーブルの質量をダブルクリック

Centroid Spectrum ⇒ 選択したいピークを右クリックし、表示された数値を選択

※ 測定を行っていない場合や、別のスポットで測定した場合、Select からではなく、 m/z を直接、数値入力してもよい。

4.8.7. Selection Window を wide に設定する。

4.8.8. を OFF から ON にする。

4.8.9. 通常の測定と同様に **Laser ON** をクリックして測定し、ピークが出ることを確認する。

4.8.10. スペクトルの目的のプリカーサーイオンのところを拡大し、Fit Mass Range にチェックを入れた状態にする。

4.8.11. ピーク形状や分解能を確認しながら、Delay Time、Laser Intensity、Detector Gainなどを調整する。

4.8.12. Selection Window を [normal: 1unit] に変更する。

4.8.13. **Laser ON** をクリックして測定し、1unit（ピーク1本）で検出されることを確認する。他のピークも同時に検出されている場合、Ion Gate Adjust の値を調整する。

※ Ion Gate Adjust の値をプラスにすると範囲が高質量側（右）にシフトし、マイナスにすると逆にシフトする。イオン強度にも注目して、強度が高くなるように調整する。

4.8.14. MS/MS Data Acquisition を選択する。

4.8.15. CIS Gas の欄で He を選択し、**Gas Switch** をクリックし、真空度の Collision Cell の圧力が上がることを確認する。

※ Collision Cell のガス圧の推奨範囲は、 $6.0E-05 \sim 2.0E-04$ 程度。

4.8.16. **Laser ON** をクリックして、プロダクトイオンスペクトルが検出されることを確認する。

4.8.17. キャリブレーション用の本測定として積算を進め、100 トレース以上のデータを取得する。Description に試料名を入力し、**Save Spectrum** をクリックする。

4.8.18. 以降、測定対象サンプルのデータ取得も順次行い、外部標準法と同様にキャリブ

ーション後に行うか、測定後に再キャリブレーションで適用する。TOF-TOF のキャリブレーション操作は次項で説明する。

5. 終了操作

5.1. msTornado Control を開き、**HV Swich** をクリックして ON から OFF に切り替える。

5.2. 以下の手順でプレートを取り出す。

5.2.1. **Main** 画面にある取り出しボタンをクリックする。

5.2.2. 本体のプレート導入部のドアランプが点灯するのを待つ。

5.2.3. プレート導入部のロック解除ボタンを押してドアを開ける。

5.2.4. 六角レンチでプレートホルダを外す。

5.3. 以下の手順でプレートを洗浄する。

5.3.1. サンプルやマトリックスが溶ける溶媒を用意し、流し洗うか、濡らしたキムワイブなどでプレートの汚れを拭きとる。このとき、繊維がウエルの枠に引っ掛からないように注意すること。

5.3.2. 汚れが落ちない場合は、薄めた洗剤を浸したスポンジなどで洗い、よく洗い流す。

5.3.3. プレートを専用の容器に入れ、水：メタノール＝1：1の溶液に浸けて、10分間超音波洗浄する。メタノールの代替にエタノールでもよい。

5.3.4. 清浄なミリQ水（洗瓶に入れてから放置していないもの）で流し洗い、乾く前に窒素ガスを吹き付けて液滴を飛ばし、乾燥させる。裏面はキムワイブなどで拭きとってもよい（表面は拭き取らない！）。

5.3.5. ホコリが被らないように、速やかに容器に仕舞い、デシケーターに保存する。

※ LC/MS が稼働中の場合、窒素ガスの代わりに、窒素発生装置に接続しているエアスプレーを使用できる。

※ この作業でも汚れが落ちない場合、硝酸洗浄で落ちることがある。手順を間違えると腐食されてしまうこともあるので、詳しくは担当者に相談すること。

5.4. msTornado Control を閉じる。

※ 閉じ忘れてしまうと、消耗品であるカメラに電源が入ったままになる。必ず閉じること。

- 5.5. データの移動は、以下のいずれかで行う。
- A. 「機器室内に常設の USB メモリ」使って機器 PC からファイルをコピーした後、機器センターの窓口 PC や 206 号室の解析用 PC を使って、「個人持込の USB メモリ」などにデータを移動する。
 - B. 「共有ストレージ (_Upload)」にファイルをコピーする（フォルダはコピー禁止!）。ファイルが機器センター利用者の Teams にアップロードされるのでダウンロードする（ダウンロード後は削除）

※ 個人で持ち込んだ USB メモリなどの機器は、装置 PC への接続禁止!

- 5.6. 使用したサンプル容器やチップなどを忘れずに片付ける。クリーンベンチ内が汚れたら、エタノールなどで拭いておく。
- 5.7. 使用記録簿に利用時間や氏名などを記入する。