

HR-MS測定マニュアル

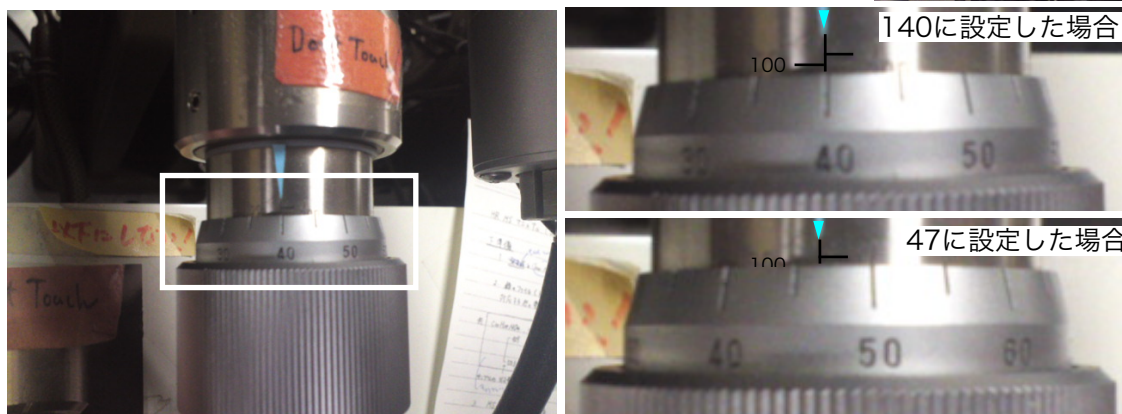
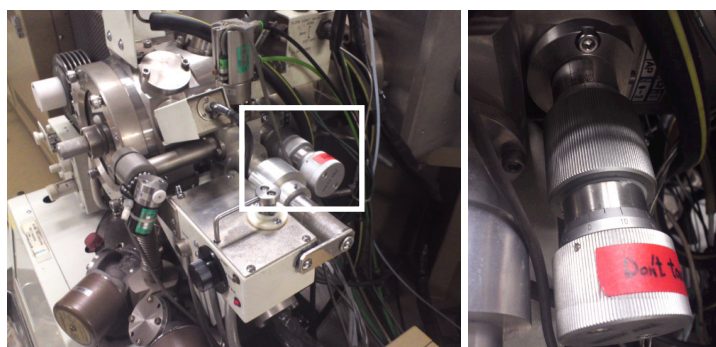
小数点以下4桁までの精密質量測定(high-resolution MS; HRMS)の測定法を説明します。通常のMS測定法は分かっているという前提で説明します。

手順

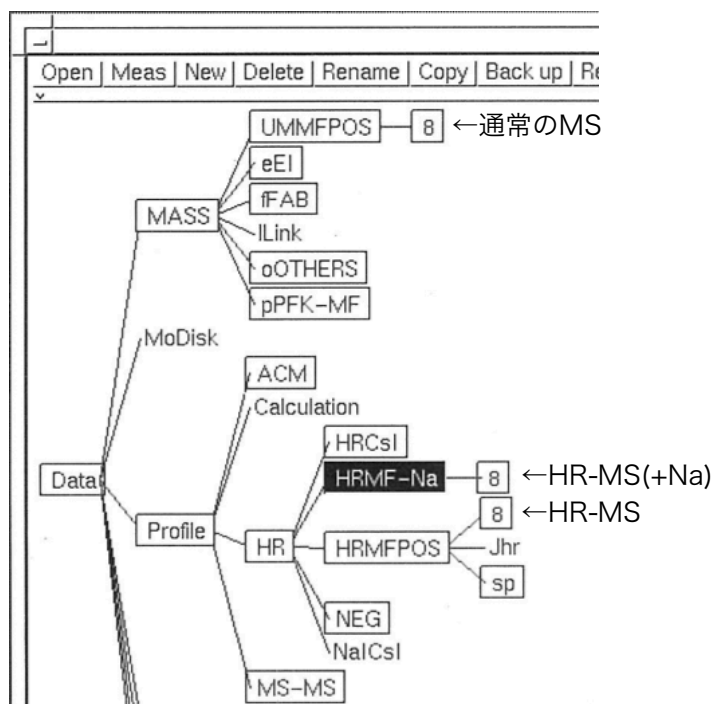
- (1) 目的の化合物の(low-resolution) MSはあらかじめ測定しておき、目的のイオンピークが $[M+H]^+$ であるのか、または $[M+Na]^+$ の様にNa付加イオンの形にしないと検出されないのか、などを確認しておきます。M+HかM+Naかに合わせて、**精密質量(exact mass)**を計算しておきます。精密質量は、一番存在比の多い同位体で計算したもので、chemdrawなどで計算できます。なお、 $H = 1.0078$ 、 $Na = 22.9898$ です。
- (2) HR-MSでは、狭い分子量域のみを測定し、その範囲の中で目的分子量を挟むPEGピークを用いてキャリブレーションを行うため、測定するサンプルに応じてキャリブレーションに用いるピークが異なります。そこでまずは、**目的のピークを挟むPEGピークのペア**をマニュアル末尾の表(Appendix A)で調べます。ただし、Na付加イオンとして測定する場合はAppendix Bの表を使用して下さい。また、測定パラメータの設定に必要な**scan mass range** (スキャンする範囲)と**scan speed**もこの表に載っています。

scan mass range			キャリブレーション用PEGピーク		
360-425	65	15 (9.9+5.1)	371	400-470	70 15 (10.4+4.5)
			415		
450-515	80	15 (10.1+4.9)	459	490-560	80 15 (10+5)
			503		
540-600	100	15 (10+5)	547		
scan speed			(cyclic time)	(Appendix A/B抜粋)	

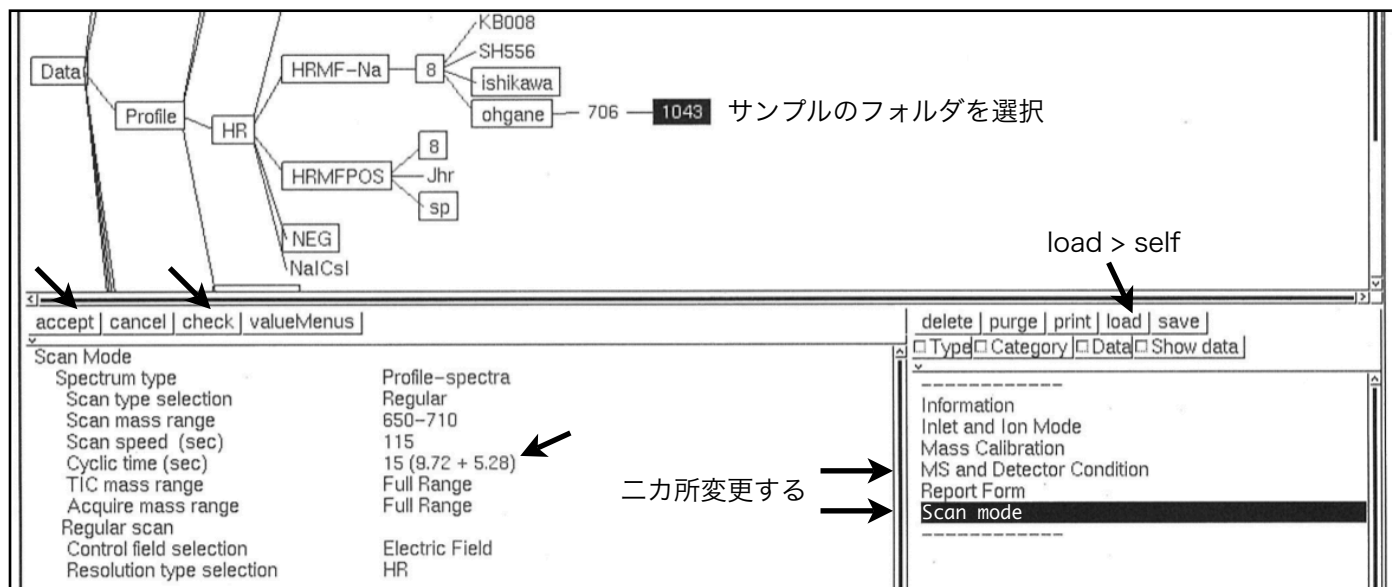
- (3) 次に質量分析計の**分解能を設定**します。Xeガスのひねりの近く(サンプルを入れる部分の奥)を通常測定時の**1000から3000へと変更**し、サンプル調製を行う机の後ろの方を**140から47へと変更**します(写真参照)。



- (4) 次はパソコンでディレクトリ(フォルダ)を作成します。HR-MSでは、DATA > Profile > HR > HRMFPOS (Na付加イオンの場合はHRMF-Na)の下に「8」というフォルダがあり、その中に個人のフォルダがあります(右図参照)。自分のフォルダの下にサンプル番号等の適当な名前のフォルダを作成します。



- (5) サンプルのフォルダを選択し、load > selfとしてフォルダの設定を読み込みます(下図)。右側の枠の中の**MS and Detector Condition**を選択し、**MS resolutionを3000、Detector amp/gainを*1/4**であることを確認します(なっていない場合は入力して下さい)。
- (6) 次に**Scan mode**を選択し、手順(2)で調べておいた**scan mass range**と**scan speed**を入力します("type in")。入力したら、checkをクリックし、左側の枠の中の"cyclic time"がAppendix A(or B)の表と同じあたになったことを確認し、accept > saveとします。



- (7) ここまで設定が終わったら、通常測定と同様にMeasをクリックし、測定画面にしておく。また、フォーカスなどの調整のためにmonitorをクリックしてモニター画面にしておく。

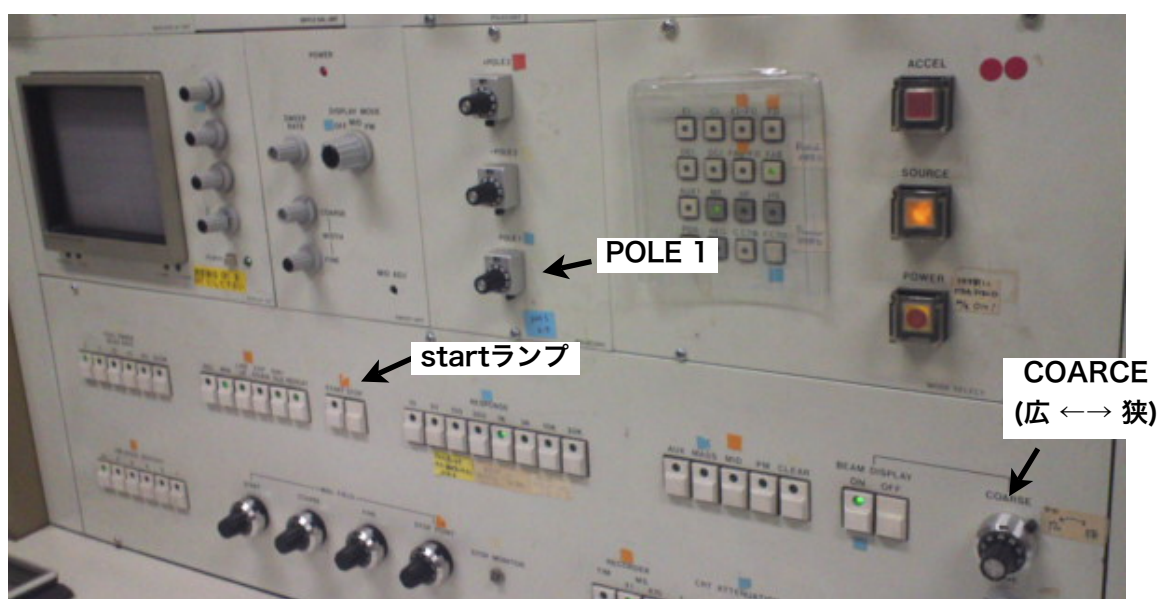
- (8) ここまでの質量分析計の設定とパソコンでの準備が終わったら、**サンプル調製**を行います。サンプルは通常のMS測定時と異なり、キャリブレーション用にPEGを含むマトリックスを用います。たとえば、mNBAをマトリックスとして測定する場合は、mNBA+10% PEG400やmNBA+10% PEG600などです。Naイオンを加える場合はNa入りのmNBA+PEGを用います。他のマトリックスを用いる場合はPEGを加えたものを用意するなり、ターゲット上でうまく混ぜるなりして下さい。

(注意1) PEG400やPEG600はそれぞれm/z 400や600を中心にピークがでます。なので、サンプルの分子量が大きい時は大きめのPEGを使います。PEG400でも600や700程度までPEGピークはでますが、ピークの大きさは小さくなります。

(注意2) キャリブレーションに使うPEGのピークとサンプルのピークの強度が両方ともしっかり検出されるようにする必要があります。片方のピークが強すぎてピークの先端が切れてしまう場合は、PEGやサンプルの量を調節する等します。

(補足) PEGのピークとサンプルのピークがかぶる場合等には、マトリックス+PEGを載せたターゲットとマトリックス+サンプルを載せたターゲットを二つ用意し、測定途中にターゲットを入れ替えるという方法をとります。

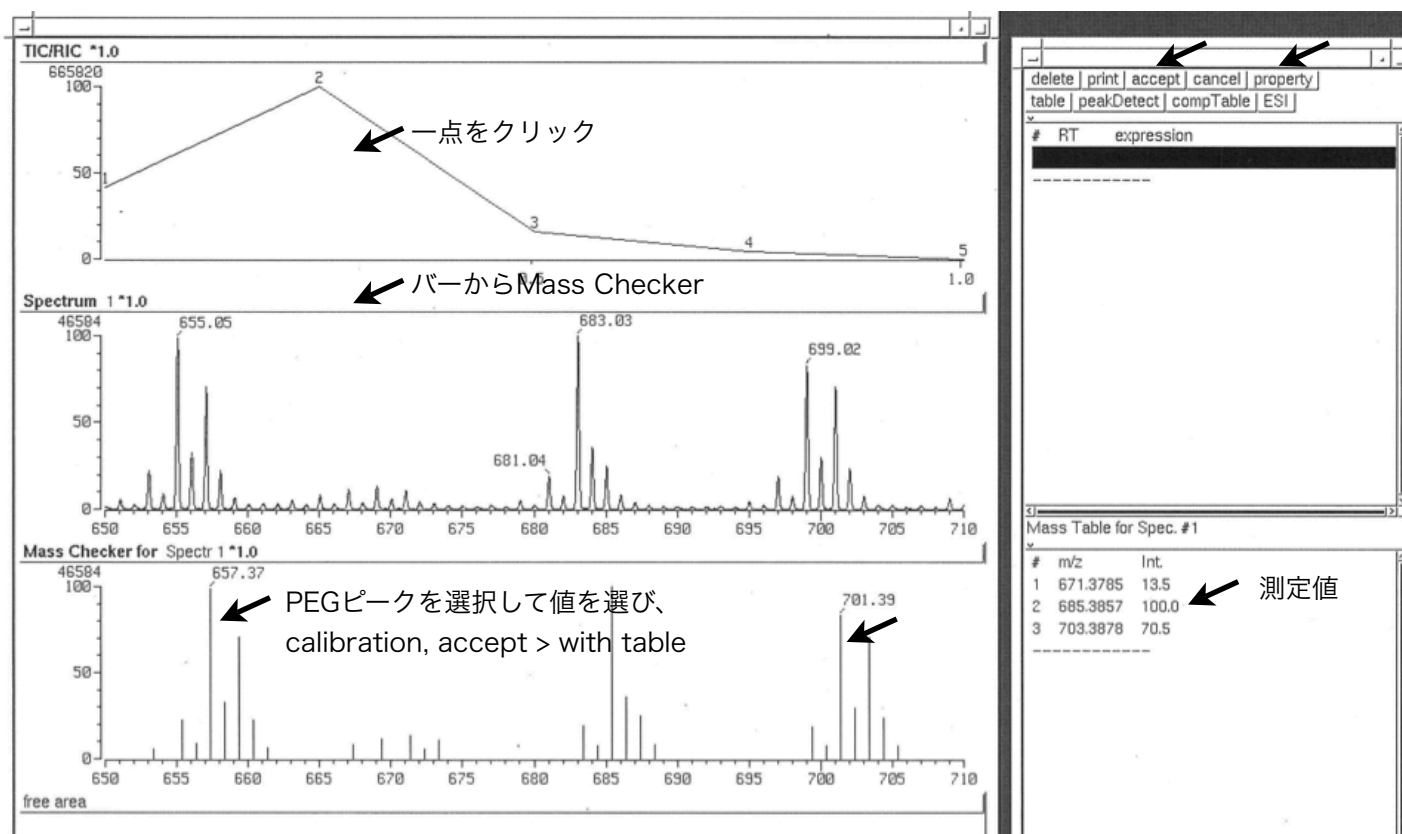
- (9) 通常の測定同様にサンプルをセットし、**accel**をONにして**Emission**を5 or 10にする。目的の分子量あるいはキャリブレーションに用いるPEGピークをモニターに表示し、**フォーカス合わせ**を行う(緑色シールのつまみを調整してピークが最も高くなるように)。次に、**COARCE**を"狭"から"広"の方へ回してピークを拡大(幅を拡大)し、**Pole 1**のつまみを6.5から適当に回してピークが高く、二等辺三角形になるように調節する。



- (10) 通常通り、**Resume**として測定画面に戻り、**Startをクリックして測定開始**。測定中はstartランプが点灯するが、これが5回程度点灯したら**End**として測定を終了し、**save**する。

(補足) PEGとサンプルを別のターゲットで測定する(測定中にサンプルを入れ替える)場合は、startランプが消えている間にaccelをOFFにしてEmissionを0にする。その後はstartランプが点灯するのは気にせずターゲット(PEG)を出し、次のターゲット(サンプル)をセットする。Startランプが消えている間にEmissionを5 or 10にしてaccelをONにする。5回程度startランプが点灯したらEnd > saveとする。

- (11) 次は**データの解析**です。まずは通常通りにサンプルのフォルダを選択して**open**します(図参照)。その後、右の枠内の**property**をクリックし、**Peak Detection**が**Centroid**であることを確認します(場合によってはPeak Topで検出した方が良いでしょう)。
- (12) 画面左上の**イオン強度のグラフの1点をクリック**します。すると下に選んだ測定回のスペクトルが表示されます。**スペクトル上のバーをクリックし、Mass Checker**を選びます。
- (13) 下にでてきたMass Checker画面でキャリブレーションに用いる**PEGピーク(手順(2)で選んだもの)を左から順に二本選びます**。上のバーをクリックし、**assign from key**を選びます。PEGピークの分子量候補が表示されるので、キャリブレーションに使う二つを小さい方から順に二つ選択します(Na付加イオンの測定の場合は、type inでAppendix Bの表に記載されていた値を二つ入力します)。バーから**Calibration**とし、再びバーから**accept > with table**とします。すると、右下の枠内にPEG以外のピークで検出されたもののピークの**測定値が表示**されます。下の図の場合は、サンプルのピークが685.3867と検出されています。なお、計算値と測定値の差は、0.005(5ミリマス) 以下が一般的に受入れられている基準です。この範囲に入っていない場合は、ピーク調整などをして取り直します。
- (補足)** PEGとサンプルを別のターゲットで測定した場合は、まずPEGを測定したデータを用いて上と同様にcalibration > accept > with tableまで行います。次にサンプルを測定したデータを1点選択し、表示されたスペクトルのバーからacceptを選びます。すると右下枠内に測定データが表示されます。計算値とのズレが0.005より大きければ、PEGとサンプルの測定回の組み合わせを変えてcalibration、測定値の表示を繰り返します。それでも0.005以内の値が得られない場合はピーク調整をやり直して再測定して下さい。クリック > Hard Copy > 画面外を右クリックでプリントアウトできます。
- (14) 測定が終わったら、質量分析計の分解能を1000と140に戻し、POLE 1を6.5に、COARCEを「狭」に必ず戻して下さい。



Appendix A (サンプル分子量とキャリブレーション用のPEGピーク対応表)

scan mass range	scan speed	cyclic time	PEGピーク	scan mass range	scan speed	cyclic time
185-250	40	15 (10.4+4.6)	③ 151 ④ 195	140-205	31	15 (9.8+5.2)
270-340	50	15 (10.2+4.7)	⑤ 239 ⑥ 283	230-295	46	15 (10.1+4.9)
360-425	65	15 (9.9+5.1)	327 371	310-380	55	15 (10.1+4.8)
450-515	80	15 (10.1+4.9)	415 459	400-470	70	15 (10.4+4.5)
540-600	100	15 (10+5)	503 547	490-560	80	15 (10+5)
620-690	100	15 (10.1+4.8)	591 635	580-645	100	15 (10.1+4.9)
715-780	120	15 (9.9+5)	679 723	670-735	115	15 (10.2+4.8)
800-865	135	15 (10.1+4.9)	767 811	760-820	135	15 (9.8+5.1)
890-955	145	15 (9.9+5.1)	855 899	840-915	120	15 (9.8+5.2)
980-1040	175	15 (10.1+4.9)	943 987	935-1000	155	15 (10.1+4.9)
1060-1130	160	15 (9.9+5.1)	1031 1075	1015-1090	145	15 (9.9+5)
1155-1215	200	15 (9.9+5.1)	1119 1163	1110-1180	170	15 (9.9+5)
1240-1305	200	15 (9.9+5.0)	1207 1251	1200-1260	210	15 (10+5)
1330-1395	215	15 (10+5)	1295 1339	1285-1350	210	15 (10.1+4.9)
1420-1480	245	15 (9.9+5.1)	1383 1427	1375-1435	240	15 (10+5)
1500-1570	225	15 (10+5)	1471 1515	1460-1525	240	15 (10.2+4.8)
1595-1655	275	15 (10+5)	1559 1604	1550-1615	245	15 (9.9+5.1)
			1648 1692	1640-1700	280	15 (10+5)
			1736 1780	1730-1785	325	15 (10.0+4.99)

Appendix B (Na付加イオンサンプル分子量とキャリブレーション用のPEGピーク対応表)

scan mass range	scan speed	cyclic time	PEGピーク	scan mass range	scan speed	cyclic time
MF, PEG-Na						
160-225	35	15 (10.1+4.9)	③ 172			
			④ 217			
250-315	50	15 (10.3+4.7)	⑤ 261			
			⑥ 305.2	295-360	55	15 (9.9+5.1)
340-400	70	15 (10.5+4.5)	349.2			
			393.2	380-450	65	15 (10.1+4.9)
430-490	80	15 (9.8+5.2)	437.2			
			481.3	470-535	80	15 (9.7+5.3)
515-580	90	15 (10.1+4.9)	525.3			
			569.3	560-620	100	15 (9.7+5.3)
600-670	95	15 (9.9+5.1)	613.3			
			657.4	650-710	115	15 (9.7+5.3)
690-755	115	15 (9.9+5.1)	701.4			
			745.4	730-800	115	15 (10+5)
780-850	120	15 (10+5)	789.4			
			833.5	820-890	130	15 (10.2+4.8)
870-930	150	15 (9.7+5.3)	877.5			
			921.5	910-975	150	15 (10+5)
955-1020	160	15 (10.2+4.8)	965.6			
			1009.6	1000-1060	175	15 (9.9+5.1)
1040-1110	165	15 (10.4+4.6)	1053.6			
			1097.6	1090-1150	190	15 (9.9+5.1)
1130-1195	190	15 (10.3+4.7)	1141.7			
			1185.7	1175-1240	190	15 (9.9+5.1)
1220-1280	200	15 (9.4+5.6)	1229.7			
			1273.7	1260-1330	195	15 (10.3+4.7)
1310-1370	220	15 (9.6+5.4)	1317.8			
			1361.8	1350-1415	210	15 (9.6+5.4)
1395-1460	220	15 (9.8+5.2)	1405.8			
			1449.8	1440-1500	240	15 (9.6+5.4)
1485-1545	255	15 (9.9+5.1)	1493.9			
			1537.9	1530-1585	290	15 (10+5)
			1581.9			
1570-1635	270	15 (10.7+4.3)	1625.9	1615-1680	260	15 (10+5)
			1669.99			
			1713.99	1705-1765	300	15 (10.2+4.8)
1750-1810	300	15 (9.9+5.1)	1758.02			
			1802.048	1790-1855	290	15 (10+5)
						(10.2+4.8)