

**AB** Applied Biosystems

## LC-MS/MS 定量分析优化技巧

美国应用生物系统中国公司  
应用技术服务部

## 样品制备方面:

- 样品处理的好坏直接关系到整个**LC-MS**分析的成败，必须要有成熟规范的样品制备方法。
- 样品预处理各步不能随意省略，如萃取、分离、去盐等。某些化合物必须化学衍生化以适应**LC-MS** 要求，如磷酸酯水解。
- 若**MS**信号实在太低，考虑更换样品处理方法。
- 浓度非常低的样品不能保存太长时间，容器吸附、分解等原因使样品浓度降低，标准品工作液现配现用。

## 离子化方法选择：根据样品性质确定离子化方式

### 适合ESI(IS)的样品类型：

- 高极性化合物、蛋白质、肽类、低聚核苷酸等生物分子；
- 胺类、季铵盐等；
- 含杂原子化合物如氨基甲酸酯等

### 适合APCI的样品类型：

- 弱极性/中等极性的小分子，如脂肪酸，邻苯二甲酸等
- 含杂原子化合物如氨基甲酸酯、脲等

ESI不适合的化合物：极端非极性化合物如苯等；

APCI不适合的化合物：非挥发性样品；热稳定性差的样品

## 离子化方法选择:

- 碱性化合物宜用正离子方式
- 酸性化合物宜用负离子方式
- 如未知,可能正负都要做
  
- 有些化合物正、负模式都出峰, 选择灵敏度高的方式, 不明确的优先试用正离子方式

## LC条件的选择:

- 根据化合物类型选择流动相组成，甲醇-水，乙腈-水或甲醇-乙腈-水
- 某些化合物只有某种流动相体系才出峰
- 一般正离子方式用甲醇，负离子方式用乙腈好些
- 通常有机相比比例高些好
- 梯度的设定：梯度变化太快对离子化效率影响很大，相应源参数也应该改变，所以恒定比例流动相能满足分离分析要求时，尽量不用梯度，尤其定量分析时

## LC条件的选择:

- 流动相中加入甲酸、乙酸铵等可提高正离子化效率
- 是否加酸不是绝对的，具体应根据LC的分离情况、样品在酸性条件下的稳定性等决定
- 通常pH值低时， $[M+H]^+$ 比率高； pH值高时， $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ ，或 $[M+NH_4]^+$ 比率高

## LC条件的选择

- 定性分析时，有时加一些 $\text{NH}_4^+$ ， $\text{Li}^+$ 等，可帮助确定判断母离子，对碎片较少的化合物，可以增加其质谱特征性，但会使生物大分子的质谱复杂化。
- 水的选择：娃哈哈纯净水比普通蒸馏水好，若在玻璃瓶中已存放时间太长，有可能变质。当本底增大，LC压力增高，应更换水相。

## LC条件的选择

- 溶解样品的溶剂：用流动相或甲醇、乙腈溶比用含水多的溶剂LC峰系形好。如果常用的流动相不能很好溶解样品，可用少量特殊溶剂先将样品溶解后再用流动相稀释。
- LC流量在色谱柱和MS允许情况下适当高可以压缩峰宽，使峰强度提高。
- 当只有粗色谱柱，只能大流量时可采用三通分流，以适应MS的流量要求。

## LC条件的选择

- 选细色谱柱，如内径2mm，进样量可以小，提高相对浓度，离子化效率，灵敏度。
- 换长些的色谱柱，对定性分离效果好，但分析时间延长，如峰形仍不理想，可考虑另选其他型号色谱柱。
- 柱后补偿：当不得不用高浓度TFA时，常用异丙醇,解决信号抑制问题。柱后衍生化，增加离子化。

## 调机准备

- 仪器平衡时间：真空，温度，LC流动相比例，宁可长些。
- 容器注意，塑料离心管添加剂很容易混入，尤其是被有机溶剂浸泡时间较长时，干扰物信号有可能超过待测物。
- LC PUMP脱气，先放掉柱前部管路中液体,排净气泡，还要注意储液瓶液面高度。

## 仪器参数的优化

- **CAL**先校准，用**PPG**或一已知化合物检验，如偏差不大，可以不用做质量校准，但偏高偏低要心中有数。
- 先用浓度大约0.1-1ppm的标样，通过syringe pump，以5-10ul/min优化**COMPOUND**项下面的参数，如**DP**，**CE**，**EP**，**CXP**及**CAD**等。
- 顺序：Q1 SCAN – PRODUCTION SCAN – MRM 。

## 仪器参数的优化

- 不同化合物参数有可能差别很大。
- 再接通LC用FIA优化其他参数及源位置, 或接一个三通,样品仍由注射泵进入离子源,同时LC保持需要的流量, 优化温度和GAS1及2, CXP,CAD,EP优化后通常不用再改, 在保证充分样品离子化基础上, DP低些使母离子丰度提高,总灵敏度相应提高
- 质量范围不要太宽, 涵盖待测离子再增加20-30AMU即可
- 采样时间适当长些噪声低, 当同时检测数十对离子时, MRM采样时间可以数十毫秒.同时检测数对离子时, 可100-200毫秒

## 仪器参数的优化

- 母、子离子输入的质量数值要选准,要根据Q1 SCAN及PRODUCTION SCAN得到的结果输入,不能只是整数。当不能确定精确质量数时,可选待测质量数上下各0.1AMU,同时数对离子优化,最终找出灵敏度最佳的一对离子。例如321.0-152.0, 321.1-152.0, 320.9-151.9....
- 若样品较杂,同一化合物要选择几对母、子离子,经进样实验找出哪对有干扰,去掉,保留不易受干扰的1-2对离子。
- 每对离子各参数分别设,如DP, CE, TIME等,对较弱离子对,采样时间可适当长些。
- 手动运行RAMP各参数分别优化比一次AUTO好, STEP选小些更准,范围不用太宽,每次优化重复两次以上防偶然误差。

## 仪器参数的优化

- 根据LC流量和流动相组成确定温度和GAS1及GAS2，当流量大，水相多时，温度及气流要大。离子源喷雾位置是根据LC流量调节的，基本上流量固定位置就固定。
- 调节喷雾电压，但太高有可能放电。
- 调节Q1及Q3分辨率。
- 许多源参数互相影响，需要反复细调，使信噪比得以改善。

## 清洗

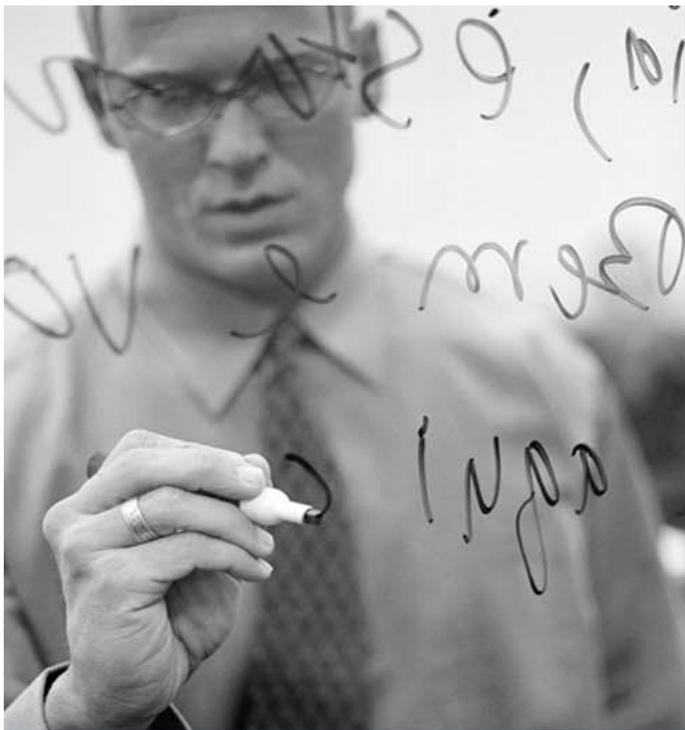
- 做完含生物体液样品后，**LC**需多冲些时间，使吸附到色谱柱上的干扰物完全洗脱下来。
- 若本底高，清洗离子源喷雾针管和**oriface**，喷雾针可拆下超声清洗，**oriface**要用无毛纸沾溶剂擦。
- 清洗管路，可从源上拆下**PEEK**，或将源从仪器上取下，用**SYRINGE PUMP**洗，换不同溶剂，极性、非极性、酸等轮番冲洗，最后甲醇/水。

## 清洗

- 清洗进样针，阀等。
- 用过含酸的流动相后，色谱柱，离子源都要用甲醇/水冲，延长仪器寿命。
- 做完MRM后，用手动使仪器处于Q1 SCAN，降温，停大流量LC，最后关气，但管路中最好有些水，不要完全干。

## 其他可用方法

- 做纯标样分辨率可母、子离子都选**LOW**，**S/N**提高一倍，而噪声并不增高，若复杂混合物，有基质干扰不宜选**LOW**。
- 适当加大进样量。
- 浓缩样品，测定后再推算回原始浓度。
- 谱图平滑后可提高信噪比，可多次平滑。
- 零级空气的选用，负离子比氮气灵敏度提高。
- 提高检测器电压。
- 当化合物很稳定不易产生碎片，可考虑采用**Ar**、**Xe**等原子量较大的气体，以增加碰撞能量。



**AB** Applied Biosystems

提高**LC-MS/MS**的灵敏度和重复性

美国应用生物系统中国公司  
应用技术服务部

## 无信号诊断步骤

- 在需要工程师到达之前，首先说明出现此现象的时机，是正在工作时突然出现，还是一段时间没用仪器，开机后出现的，在此之前，动了仪器哪些部位，是某些扫描方式没有信号还是都没有信号。
- 例如MRM无信号，先看Q1,Q3有无，若Q1,Q3有，则通常是Analyst参数设置问题，若无，则继续
- 看有无本底信号，电噪声有无,如有,则可能是离子源或软件问题。
- 检查真空,Q1 SCAN方式,通常应该 $0.7-1.2 \times 10^{-5}$  torr之间,过好可能是Orifice堵塞,过差则可能是漏气或真空泵有问题。
- 电源电压是否超限，UPS显示正常否？
- 更换了离子源以后，高压线是否插好到位？喷雾电压设置正确与否？
- 各路气体压力是否正常，阀门是否打开，加热气开了吗？
- 离子源喷雾针重装后，有无漏气，漏液？液体是否从针外壁流出？

## 无信号诊断步骤

- 管路有否堵塞，一节一节拆开测试，看通否，喷雾是否均匀，泵压是否过高，通常不接色谱柱，200ul/min流速，压力应不超过数十PSI。

进样管及spray tube堵塞：

- a. 用Syringe推：直线喷出——没有堵塞
- b. 若堵，取下用50水/50甲醇超声清洗
- c. 超声仍无效,更换进样管及spray tube

Orifice堵塞：

现象：灵敏度下降或真空度异常的好

- 处理方法：
- a. 50水/50甲醇清洗orifice外部
  - b. 不能解决问题时再清洗orifice内部

## 无信号诊断步骤

- 若为APCI,检查流速是否过低（如没接LC，只用注射泵），放电尖端对正方向没有，放电电流是否加上？
- 若为APPI,有没有通甲苯？
- 若为NANOSPRAY,针尖碰断了没有？高压放电烧坏或样品堵塞针尖,外涂金属层被磨掉,加不上高压,需提高喷雾电压才有信号，都要更换新的喷雾针。
- 有无气泡，注射针里面，LC流动相管路是否有空气，流速低时多等一会儿，可手推一下注射针，帮助液体快速到达喷雾针。
- 诊断软件的使用要在工程师指导下进行，一定要**OFF LINE**
- 在工程师指导下用万用表测量各点电压值，判断故障点。

## 灵敏度低

- 首先按照无信号处理方法检查。
- **Orifice** 脏也可引起真空变差，当**Curtain Gas**很高才好，说明脏了，清洗。
- 机械泵油半年以上没换，或颜色加深，-换油，低于刻度下限，-补充，注意要用同型号的油。
- 管路漏液，样品没有完全进到离子源里。
- 管路部分堵塞，喷雾时断时续。

## 灵敏度低

- 先调出安装仪器时的PPG等方法，用注射泵SYRINGE PUMP，进PPG看看，CAL漂移否，若CAL不对，造成质量数无法选准，-重新校准仪器。
- 若注射泵采集标准品正常，则再看样品，然后用Reserpine等标准品，接通LC，如果有手动进样阀，可从此处进样，看FIA有无峰，若无，则可能是LC及源参数设置问题。
- 如果正常，则排除MS，再自动进样，看FIA有无峰，若无，则可能是自动进样器问题。
- 若FIA正常，则再继续接上色谱柱采样，判断是色谱柱问题还是流动相问题。

## 灵敏度低

- 离子化方式是否对路，如非极性物质用**ESI**效果很差，有机酸采用正离子方式没什么信号。
- 样品本身的问题，如样品没有完全溶解，浓度不够，所用溶剂与流动相不匹配等。
- 样品存贮时间过长，保存条件不好，分解或吸附了。
- 放在自动进样器中的样品小瓶内套管底部有气泡，没取到样品，或针头位置太高，而样品液面太低。
- 前处理步骤中，标准品、内标样品是否加进，提取过程中有无遗洒。
- 离子抑制，-改变前处理方法或**LC**梯度，或换为**APCI**也可以降低部分离子抑制效应。
- 离子对质量数输入准确否，有无错误？

## 重复性差

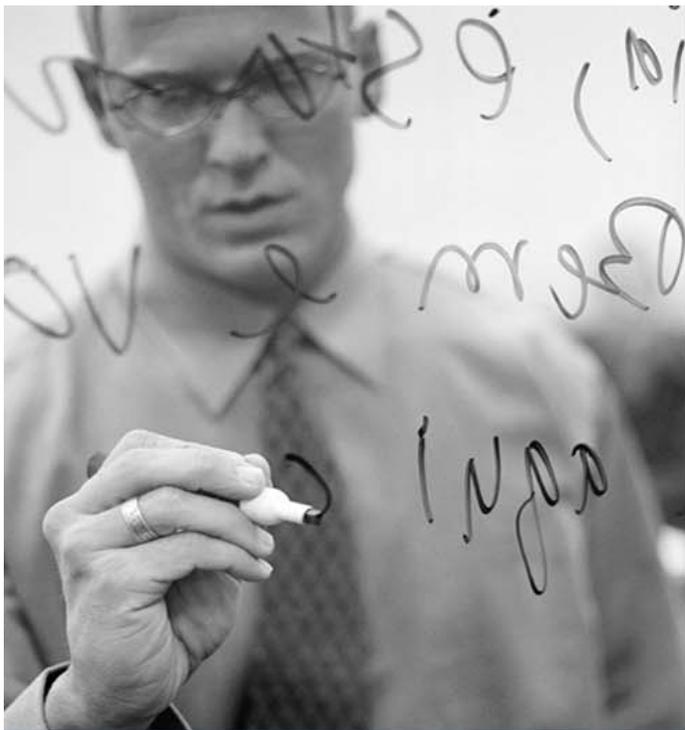
- 参考前面各步骤
- **Curtain Gas**太低，有周期性降低现象。
- **Dwell Time**太长，每个色谱峰采样点太少，至少十几点，**Dwell Time**太短则噪声太高，信噪比不好。
- 新色谱柱没有充分平衡，旧色谱柱老化，重新清洗活化，或更换。
- 离子对的选择有问题，如**M+Na**做为母离子不稳定，子离子若为脱水峰亦不太好。
- 源温度太高，样品分解。

## 重复性差

- 加样前与标液分别平行做处理，观察有无区别，若标准品溶液无问题，而样品重复性差，则问题可能出在基质的干扰或前处理方法不当。
- 稀释配制样品的移液枪，移液管，容量瓶等有无问题。
- 某些样品正离子改为负离子试试，干扰少，重复性会好些。
- 样品管中吸附，尤其低浓度，不成线性，如氨基糖甙，-加些甲酸或乙酸。
- 溶解样品一定要用流动相，如果不同，例如甲醇溶液，流动相是乙腈/水，出峰乱，稀释时残存甲醇都会有影响。
- 梯度洗脱后平衡时间不够，或脏东西没洗干净，累积使得，-彻底洗柱子。

## 重复性差

- 手动阀如果没问题了，再看自动进样器有无问题。
- 空调波动，与仪器在同一供电线路上，启动/停止会影响仪器真空，进而影响实验结果。
- 当液氮剩不多时，及使用钢瓶时，尤其注意压力变化。
- 流动相虽有在线脱气，但装入前超声还是必要的。
- **PEEK**吸附，**FIA**时明显，例：四环素，甲醇溶液，乙腈/水：  
(0.1%乙酸) 30/70，由开始时一个峰最后变为两个峰。另外保留时间也会改变，-充分冲洗管路。



## 串联质谱的日常维护

美国应用生物系统中国公司  
应用技术服务部

## 死机时处理方法:

由于鼠标操作太快，打开窗口太多造成的死机，重启**Analyst**软件，正在采集的数据不会丢失，用**CTRL-ALT-DEL**，**WINDOWS**任务管理器结束任务。尤其当采集数据时，实时查看谱图不要用箭头翻看前后一次的数据，可重新打开一个新的谱图。注意不要在一张谱图上过多次计算信噪比，本底范围也不要选择太宽。

当**SYRINGE PUMP**到头时（**API2000**，**QTRAP**，**QSTAR**），右下角图标变黄，须先点击**STANDBY**，再点击**READY**。

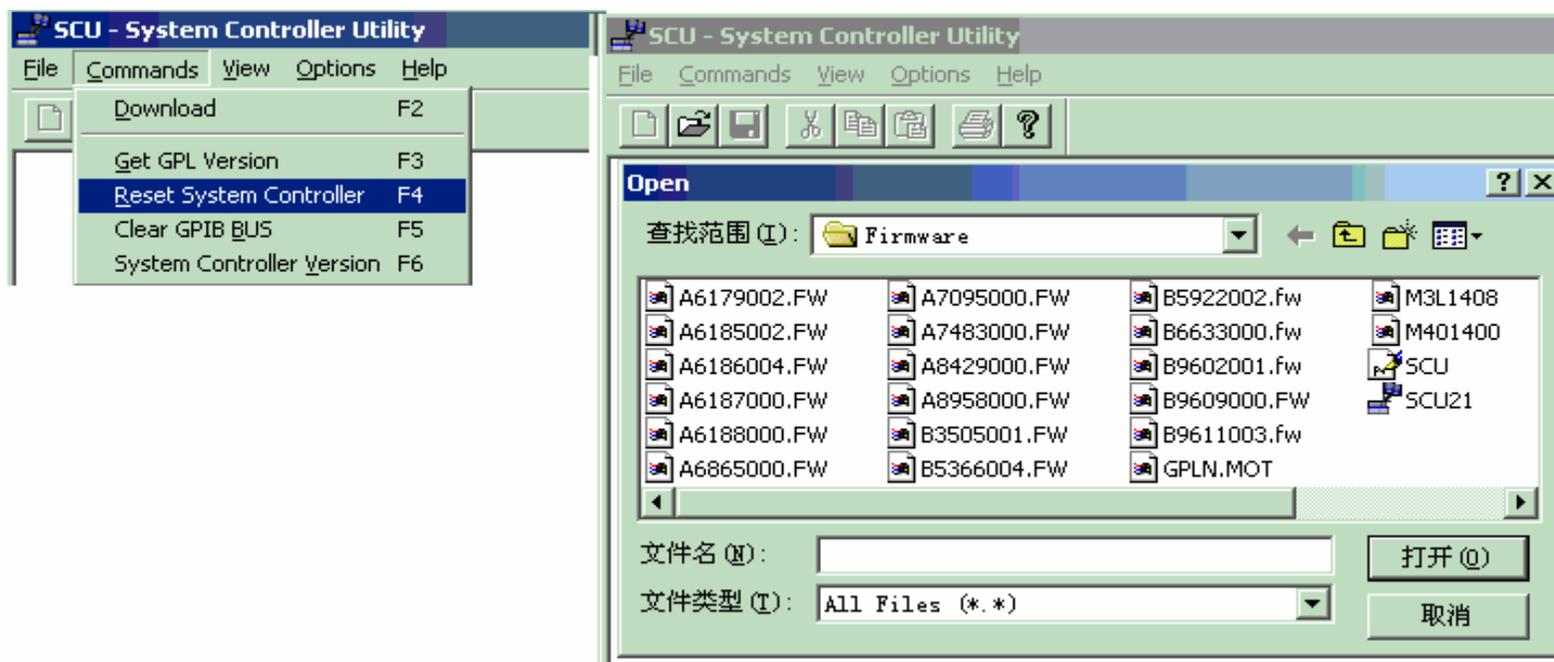
当由于**HPLC**的原因，如漏液等引起图标变红，首先排除**HPLC**故障，并重新开关所有**HPLC**设备一次，待自检通过后，先**DEACTIVATE**，再重新激活。

**ANALYST SERVICES STOP**，中断计算机与仪器通讯，本次采集的数据丢失。

重启**WINDOWS**-正在采集的数据会丢失。

由于**EXHAUST**排气管不通畅，引起图标变红，首先清理排气管，如果图标仍燃3是红色，有可能是阀憋住了，要打开**EXHAUST**进气口，放气，然后再重新接好。

以上步骤都失灵时，在C盘的PROGRAM FILES—ANALYST--FRIMWARE中双击SCU21，按F4， RESET SYSTEM CONTROLLER，等仪器主机上指示灯不再闪硕，重新进入ANALYST。



重装ANALYST软件前，先将API INSTRUMENT中INSTRUMENT DATA和PARAMETER SETTING两个文件COPY出来，然后卸载ANALYST软件，再重装，不要修复。还要用SCU21查看FRIMWARE版本号，如不对要DOWNLOAD，参见软件安装说明。注意计算机用户名，不能有符号，只能是字母和数字，还要以管理员身份登陆。

当软件运行速度很慢，经常死机，可考虑增加计算机内存，但要DELL专用的。

如果出现不能控制附加设备情况，检查是否需要加补丁程序，具体看HOTFIX的说明。

有时由于计算机的问题，引起软件工作异常，如提交后不采集数据等，试试重新编METHOD， BATCH， CONFIGURATION。

经常清理计算机磁盘碎片，  
定期查杀病毒，如果中毒太深，  
可能需要格式化硬盘。

ANALYST1.4每次启动出现如图  
页面，点X即可。



## 离子源和管路清洗及维护方法

- a. 每次做完样后用甲醇或流动相冲洗进样管直到样品信号回到基线
- b. 把离子源取下，用注射器推甲醇冲洗进样管，如果进过非极性样，可用丙酮，氯仿等其他有机溶剂冲洗，最后还要用甲醇再冲一遍。
- c. 把进样管放到甲醇中用超声波清洗
- d. 定期清洁CURTAIN PLATE 及ORIFICE，不要用砂纸擦和针捅
- e. 基线不能靠冲洗下降时清洁离子源
- f. 禁止直接向ORIFICE喷雾
- g. 避免使用无机盐或其它难挥发的缓冲液
- h. 当仪器过脏时，停机清洗Q0

## 仪器日常维护方法

- a. 操作顺序是先开气，再加热，然后通液体进样，停止实验时要相反的顺序退出。
- b. 退出软件及standby前把仪器设定到Q1正离子模式
- c. 注射泵不要让它推到头
- d. 随时检查气压curtain gas 压力 0.35 –0.4 Mpa .  
Exhaust gas压力0.35 –0.4 Mpa不能超限
- e. 定期更换或清洁空气过滤网
- f. 定期校正仪器
- g. 注意仪器后面的排气出口必须保持通畅。

## 机械泵维护方法

- a. 注意机械泵油的颜色，变深后换油,至少半年换一次
- b. 经常检查机械泵油液面正常位置，机械泵油的更换方法：首先关机，要在油处于温热状态下排出，加新油不要过多，刻度一半即可。