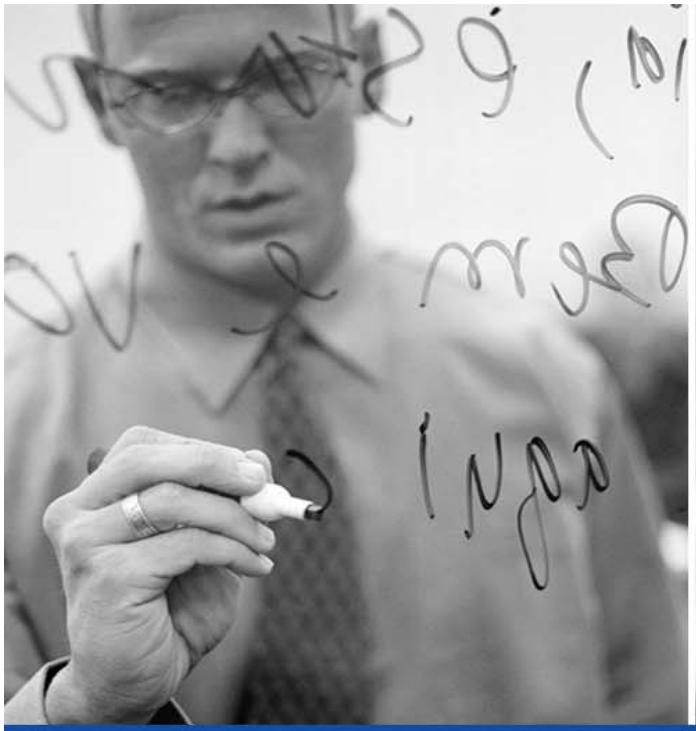


Applied Biosystems

LC-MS/MS定量分析流程与经验

美国应用生物系统中国公司
应用技术服务部

第一步： Q1 SCAN——确定母离子的质荷比

- 根据待测化合物性质，选择分析的极性(+/—)、离子化方式(ESI/APCI)，根据分子量选择扫描范围和时间
- 确定母离子的质荷比，准确到小数点后一位。

参数设置：
扫描方式：Q1 Scan
质量范围：Parameter Range，100～MW+30，t=1～2sec
Center Width，MW±5Da，t=0.5sec

通过手动调节DP、GS1，使喷雾平稳、有效

© 2006 Applied Biosystems

第二步： Product Ion Scan —— 确定子离子的质荷比

- 得到高质量的MS2图，母离子的强度为图谱中基峰强度的1/3到1/4为宜
- 平滑后选择子离子质荷比，确定到小数点后一位

参数设置
扫描方式：Product Ion Scan
质量范围：Parameter Range，50～MW+10，t=1～2sec

通过手动调节CE

© 2006 Applied Biosystems

第三步：优化化合物参数

- 根据前面选出的母、子离子，组建MRM离子对
- 选择多个离子对时，应合理分配每一对的分析时间
- 用“Ramp”，优化Compound项下各参数，以及Source项下CAD参数。各离子对应分别设定。
- 初步建立MRM方法

- 一般优化两次，以得到比较确切的结果

© 2006 Applied Biosystems

第四步：方法转化：将连续进样方法→LC-MS方法

- 关掉所有质谱分析界面，将现有质谱体系灭活，激活液相色谱、质谱设备。
- 单击Acquire中Build Acquire Method，打开上面保存过的MRM方法，添加设备：色谱泵、自动进样器等。
- 设置色谱同步。
- 设置色谱参数，分析时间一般为0.6～1min，流动相组成和流量与实际样品分析时相同；修改质谱分析时间，与色谱参数一致；设置GS1、GS2、TEM初始值为40、40、400左右，保存方法，例如：LC-MRM.dam。

© 2006 Applied Biosystems

第五步：FIA-优化Source参数

- 将前面用过的样品溶液稀释100～1000倍。
- 在Tune项下，双击 Quantitative Optimization，选择FIA分析，根据向导进行自动优化。不接色谱柱进行FIA定量优化

- 注意：需要优化的各可选值之间用“;”分隔。
- 当对源参数含义及设置比较清楚后，可以省略此步。

© 2006 Applied Biosystems

第六步：色谱条件优化

- 接好并平衡色谱柱，用适当浓度标准品考察分离情况
- 根据色谱分离情况，会设定梯度洗脱
- MRM方式可以不必所有峰都基线分离，但要注意避开基质离子抑制的干扰

- 调整色谱流动相组成和流速，并相应调整源参数

© 2006 Applied Biosystems

第七步：标准工作曲线的制作

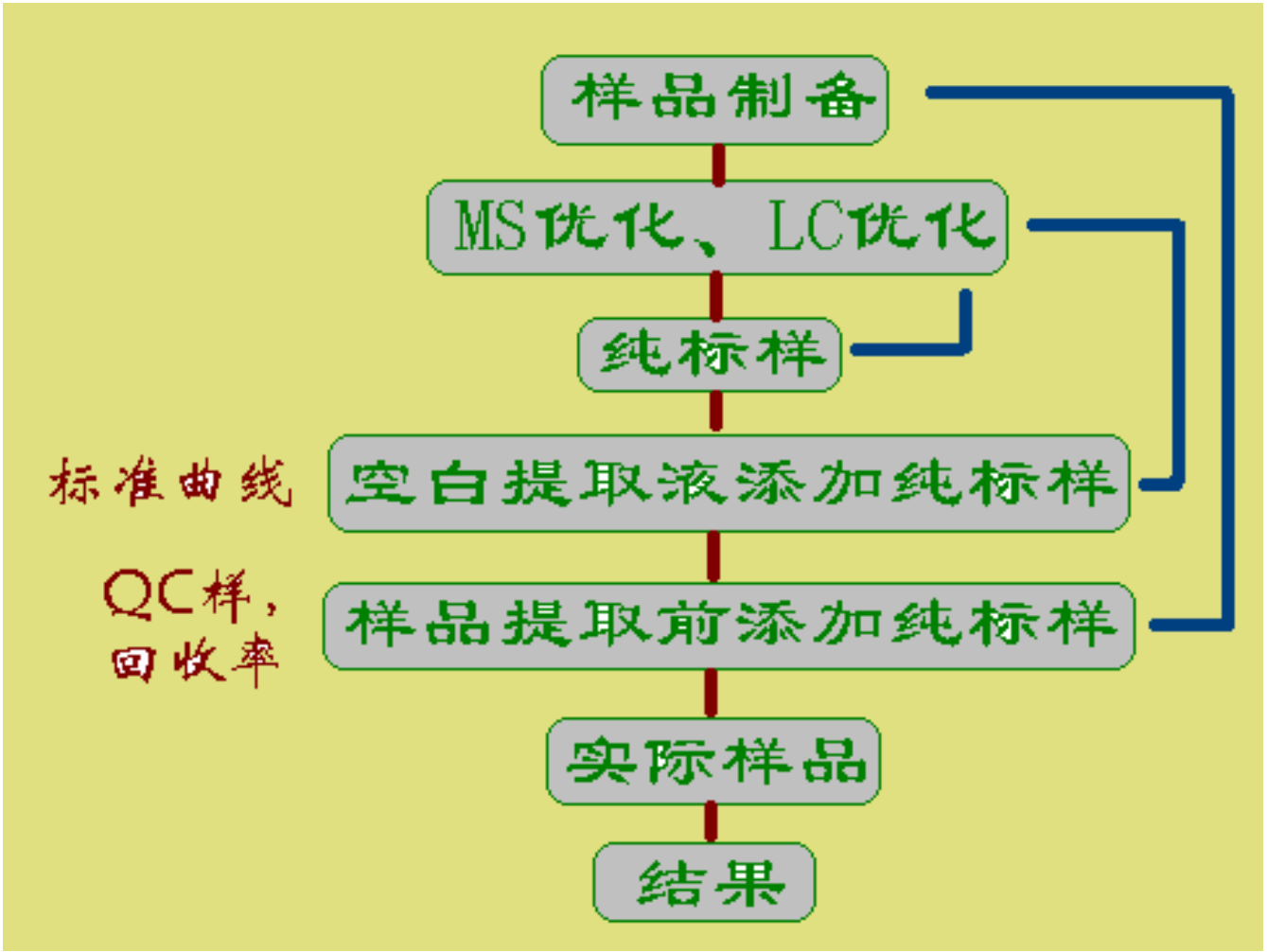
- 空白基质添加标准品，稀释成不同浓度
- 根据LC流动相组成，选择稀释液，配制实际样品，
- 编辑批处理文 件，排列进样顺序
- 平衡MS离子源和色谱柱
- LC-MS/MS采集数据

© 2006 Applied Biosystems

第八步：数据处理

- 标准曲线的制做
- 正确积分色谱图
- 有内标和无内标的计算方法
- 最后结果的打印、存贮、复制

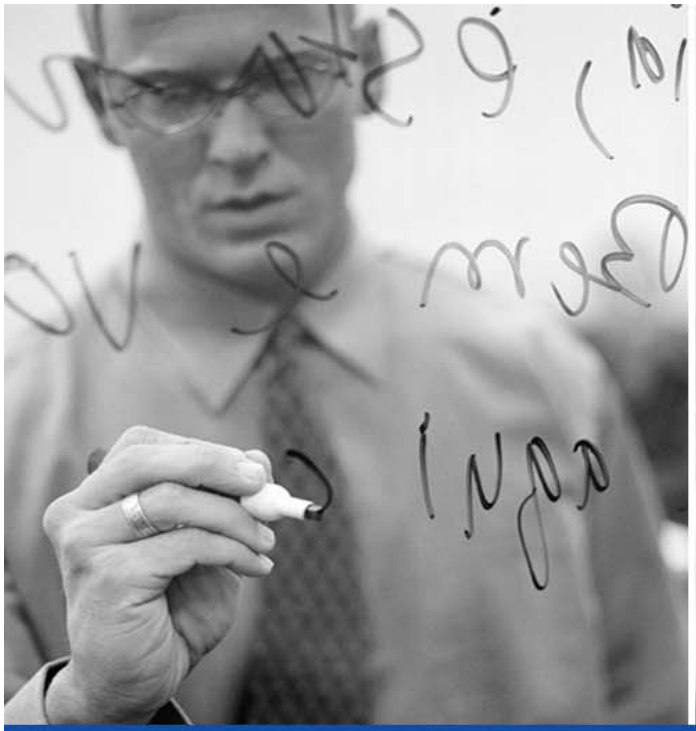
© 2006 Applied Biosystems



© 2006 Applied Biosystems

重复步骤-流程图
多种方法同时编入批处理，
清洗，降温，关机程序
自动STANGBY。

© 2006 Applied Biosystems



Applied Biosystems

成功定量分析的经验与体会

美国应用生物系统中国公司
应用技术服务部

准备工作

- 查阅文献
- 做好样品前处理，萃取 浓缩 分离 纯化
- 有条件的可先在HPLC上摸好LC条件，能够基本分离更好，缓冲体系符合MS要求
- 溶剂包括水的纯度，最好色谱纯以上
- 新的色谱柱可能要先冲洗很长时间才能干净,某些样品非常容易吸附在进样阀和管路中，用溶剂清洗
- 质谱仪须校准，预热时间要足够长，气流的稳定也很重要，液N气阀开度要注意，达到稳定程度

© 2006 Applied Biosystems

MS条件优化——先定性后定量

- 首先，确定离子化方式：
  ESI or APCI，POS or NEG
- 用10-100ppm的纯样，Q1 SCAN 察看存在哪些离子，要能够看到待测的母离子，应明显比周围的噪声离子高，通过改变DP,观察离子的增减,若为POS方式，看M+1，M+18，M+23等等,初步判断分子离子,如看不到则可能是浓度太低或离子化方式不合适，或选择的溶剂体系不合适
- 母离子选M+H,或M-H最好,但有时只有M+NH4,M+Na等,这样CAD能量可能需要高些,选择[M+H]+，还是+NH4，+Na等，要由化合物决定。加合离子若稳定，则可用，不稳定则可能需换流动相，但+H通常好些，所需碰撞能量低，灵敏度高；如含Cl可选择2个母离子峰

© 2006 Applied Biosystems

- SIM与MRM，单级Q只能SIM，MRM可看成2个SIM，选择性更好
- 再根据上一步确定的母离子进行PRODUCT SCAN，确保所有碎片离子都来自待测化合物，而不是溶液中的杂质，找出较强的碎片离子信息。还可改变CE，从中选定MRM需要测定的一对或更多离子对,为最后LC-MS/MS联用做准备
- 做PRODUCT SCAN时，注意小数点后的位数,MRM输入要准,灵敏度才高
- 先多选几个离子对，待出现基质干扰时可换，最后根据法规要求确定离子对数目
- MRM方式优化仪器，通过优化仪器参数，使得母、子离子都达到一定强度水平，使MRM灵敏度最高。可先让仪器自动优化参数，然后再手动细致优化，只检测一对离子时根据TIC的强度来确定仪器参数，一次优化多对离子时，要根据每对离子的XIC强度来分别确定仪器参数

© 2006 Applied Biosystems

- 先用注射泵优化COMPOUND项下面的参数，如DP、CE及CAD等，再接通LC，用FIA优化其他参数如温度，气流和IS电压及离子源位置，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. 然后进行MRM测定。
- CURTAIN GAS在不降低灵敏度情况下尽量大些，雾化辅助加热气流不用太大，这样可以提高信噪比，保持信号稳定。
- 分辨率的选择：当样品较纯，Q3可选LOW，提高灵敏度，若选LOW后本底噪声太高则意义不大。

© 2006 Applied Biosystems

LC条件优化：

- 色谱柱长度可根据分离的要求而定，定性可长些,定量在能有效排除干扰情况下尽量短,提高效率；内径最好选细径柱如2mm的,1mm的,IS可不分流, 4.6mm柱用1ml流量时如不分流灵敏度还不是最佳,不如流量低时更好。流速高，峰形好
- 不同牌号色谱柱，效果很可能不同
- PH的影响-正离子方式PH要低些，负离子方式PH要高些，除对离子化有影响外，还影响LC的峰形，以至定量误差。
  流动相加乙酸铵可适合大部分测定要求

© 2006 Applied Biosystems

- 用流动相配的标样，初步优化确定LC条件是否合适
- 标准品工作液现配现做，尤其是较低浓度，时间长了可能因吸附分解等降低
- 进样顺序要先稀后浓
- 洗针液要常换，进过浓样后要进一针空白，检验是否有残留污染
- 顺序：纯样-添加样-实际样品
- 流动相液优化后，空白提取液配制标准再优化，看干扰，空白添加再提取后看回收率
- 用空白提取液配制标准样做曲线，准确，有效排除干扰因素

© 2006 Applied Biosystems

前处理方法的优化

- LC，MS都优化还不行，改提取方法
- 离子抑制-改变前处理方法或LC条件
- 内标用法，药代动力学时多采用内标，选择原则：内标物与被测物的化学性质有区别时，要注意干扰基质对他们的离子化影响的不同，尽量选同系物。还可利用同位素标记
- 衍生化：有时有助于信号强，且稳定，例如硝基呋喃类，衍生化后容易测量。

© 2006 Applied Biosystems

数据处理

- 最低检出限，信噪比～3:1，定量限～10:1
- 同一物质几对离子的比例应相对恒定，误差不超过15%，峰面积比峰高准确
- 当浓度低，信号弱，自动积分不准时可对峰面积手动积分
- 平滑次数与峰宽因子、保留时间等设置都会影响积分值
- 曲线过零点时，可用4个点；不用，则要5个点
- 线性范围太宽，有时意义不大

© 2006 Applied Biosystems