高分辨液质联用培训教程及常见问题解决方案

王联红,王麒麟

(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要:正确规范使用仪器,摸索仪器条件和数据处理,开发仪器测试功能和方法,是科研的 必经之路。为了支持全院师生科研工作,编写了仪器培训教程,并定期进行研究生独立操作 大型分析仪器的培训和考核工作。其中,Triple TOF 5600 高分辨质谱培训教程内容分为以下 几部分:仪器的连接与激活、液相操作部分、Q-TOF 手动调谐部分、方法和序列编辑部分、 注意事项、常见问题和故障解决方案汇总等。自该仪器安装以来,培训考核研究生 600 余人, 经培训考核获得上机资格的研究生能规范正确地使用仪器,质谱运行 12 年,基本没出现大 的故障,年平均使用机时 4000 小时以上。

关键词: 仪器培训; 高分辨质谱; 液质联用;

中图分类号: X5

文献标识码:B

Training course and common problem solutions for high-resolution liquid

chromatography mass spectrometry

Wang Lianhong, Wang Qilin

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University,

Nanjing 210023, China)

Abstract: The correct and standardized use of instruments, exploring instrument conditions and data processing, and developing instrument testing functions and methods are the only way to scientific research. In order to support the scientific research work of teachers and students of the school, instrument training courses have been written, and training and assessment work of independent operation of large-scale analytical instruments for graduate students has been carried out regularly. Among them, the Triple TOF 5600 high resolution mass spectrometry training content is divided into the following parts: instrument connection and activation, liquid phase operation, Q-TOF manual tuning, method and sequence editing, precautions, common problems and fault solution summary. Since the installation of the instrument, more than 600 graduate students have been trained and assessed, and the graduate students who have obtained the

qualification of computer can standardize and correctly use the instrument, and the mass spectrum has been running for 12 years, basically without major failures, and the average annual use time is more than 4000 hours.

Key words: instrument training; High resolution mass spectrometry; Liquid-mass combination;

国家重点实验室是依托大学和科研院所建设的科研实体,实行人财物相对独立的管理机制和"开放、流动、联合、竞争"的运行机制。为了实现国家重点实验室仪器的科学开放,为了使研究生具备规范操作大型仪器的能力,尽快进入科研状态,仪器管理者编写仪器培训教程,定期进行研究生仪器操作培训和考核工作。培训讲义的制作,基于仪器公司的装机培训,和作者翻译外文说明书和外文工作站帮助菜单,以及反反复复的模拟演练和修改,凝聚了作者多年的心血。目的是争取让学生在参加集中培训,和一对一上机辅导后,能做到规范熟练地使用仪器,科学地分析数据,从而更好地进行科研工作。

南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室高分辨液质联用,为 Agilent 1260 液相和 AB SCIEX Triple TOF 5600 高分辨质谱联用。培训教程内容为仪器的连接与激活、液相操作部分、Q-TOF 手动调谐部分、方法和序列编辑部分、注意事项、常见故障汇总等。其中,一部分注意事项会单独阐述,一部分注意事项会穿插在其他内容的陈述中。

1 仪器的连接与激活

1)点击 Analyst® TF 软件进入 Analyst 软件界面,首先熟悉以下图标:

Mode List 模式列表;

Project Folders 项目文件夹 (建导师的);

Navigation Bar 导航栏;

System Status Icons 系统状态图标。绿(代表准备就绪);黄(表示模块待机);红(提示有问题)。



2)然后,点击侧边栏的 Hardware Configuration(左),在弹出的对话框中,选择需要连接的 仪器(如:单质谱 5600 mass only、液质联用 LCMS-5600、液相-DAD-MS 联用)。点击 Activate Profile 激活仪器。激活后,前面对勾变为绿色, Activate Profile 变成 Deactivate Profile。



3)检查仪器状态,点击软件右下角状态栏中的图标,主要核实质谱以及液相状态,需要注意 的参数如下:

- ① Source Exhaust Pump:正常时为 Off, 异常为 Bad。
- ② Q1 Vacuum Gauge(经验值):~0.6×10⁻⁵ torr (待机时); ~3.5×10⁻⁵ torr (进样时)。
- ③ TOF Vacuum Gauge(经验值):~0.44×10⁻⁶ torr (待机时); ~0.582×10⁻⁶ torr (进样时)。

每次实验开始之前需要在记录本上记下 Q1 和 TOF 的真空度值。以上数值为第一次装 机后的值,更换真空规后,此值有变化。

MassSpec TripleTOF5600 Detailed Status		
General Info Advanced Info Calibrant Delivery System (CDS) St	atus	
Model: TripleTOF 5600 Method : Id	le	
Vacuum System Status	Sample Introduction Status	
Operating Pressure Reached	Not Ready	
Q1 Vacuum Gauge (10e-Storr) : 0.5	Source/Ion Path Electronics :	On
TOF Vacuum Gauge (10e-6torr) : 0.503	Source Temperature (deg. C)	0.0
Backing Pump Status : Enabled	Source Housing Installed :	DuoSpray Ion Sour
Q1 Turbo Pump : Normal	Source Exhaust Pump :	Dff
Q2 Turbo Pump : Normal	Interface Heater Status :	Ready
TOF Turbo Pump : Normal		
Refresh	$\langle n \rangle$	
1		
<u>Sel</u>		
	User Name: Q-TOFPC\administrator	D:\Analyst Pata 🛷 Idle 🧵 Idle 拍 Idle 👯 Idle 🗧

2 液相操作部分

2.1 准备工作

液相部分的准备:准备色谱柱、流动相,检查废液瓶。

软件部分的准备:先建一个导师的 project。

2.2 建立方法

在对应的 Project (建议以导师命名)下建立液相色谱方法。

依次点击 Build Acquisition Method 和 Agilent 1260 Binary Pump 进入方法建立界面。

需要建立的方法如下:

1)、管路的排气泡方法:分别建立 A 相(水相)和 B 相(有机相)的方法; 5 mL/min, 建议 5 min。

2)、纯有机相的冲洗方法:100%B相, 0.2 mL/min, 建议 30 min (柱子填料粒径大小不同、内径不同, 流速和时间要求不同)。

3)、分离待测样品的方法:根据待测样品自行设定。

液相方法,主要包括二元泵流速,流动相比例,柱温箱温度,自动进样器针的高低位置, 洗针功能等。方法建好后,保存方法。

🔠 Analyst - [Acquisition Method	:] · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
K Eile Edit View Acquire Tools E:	xplore <u>W</u> indow <u>S</u> cript <u>H</u> elp
12 🕫 🖬 🚳 🖪 🐇 🖻 🛍	🗅 🕰 🛨 Acquire Mode 💽 🗖 🔁 TOF Training 💿 🚽 🛤 🕅 🗖 🖽 📾
╡╡┪╏┛┇┓	
<u> </u>	I C Pump Gradient Linda Linda (Advassed) Missa Mode
E Configure	Acquisition method
🖉 Security Configuration	Acquisition Method Total Time Flow Rate A (%) B (%)
	□-
🚿 Report Template Editor	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
(仰) Tune and Calibrate	E - L Agilent 1260 Binary Pump (0.0 mins)
A ^V Instrument Optimization	
_⊮¥ Manual Tuning	the Agilent 1100 Thermo Autosampler
₩∃ Acquire (1)	
* Method Wizard	
E Build Acquisition Method	
Build Acquisition Batch	
& Evolore	X//. * *
Cal Open Data File	
Open Campound Database	
Companies Software	
reakView	
•	

2.3 调用方法,冲洗液相色谱柱

依次点击工具栏中 Quene 和 Equilibrium 调用方法,需调用的方法和步骤依次为:

1)、Purge 阀: 逆时针旋松半圈。

2)、调用 A 相排气泡方法, 5 mL/min, 至管路无气泡为止, 记录此时压力。水相从冰箱中取

出,要先超声脱气,起预热和脱气功能。

3)、调用 B 相排气泡方法, 5 mL/min, 至管路无气泡为止, 记录此时压力。

4)、调用纯有机相方法,降低流速 0.2 mL/min (填料粒径大小不同、柱子内径不同,最优流速推荐值不同)。

5)、Purge 阀: 顺时针旋紧复位。

点击软件右下角状态栏中的柱子图标,进行系统的压力监控,并在记录本上,记录各步

骤的系统压力以备查(排气泡时,柱前压、纯有机相平衡后、起始流动相平衡后、纯有机相 保存前)。

2.4 注意事项:

装柱时,观察柱前有液体流出,低流速下接色谱柱,注意柱子箭头方向,注意要边推边 接,防止死体积和泄露;柱尾巴有液体流出,接上后面管路。平衡到压力稳定,记录此时压 力。流速增加到实验所需流速,观察无漏液后,盖上柱温箱前面板,冲洗色谱柱到正常压力 状态,并稳定,记录此时压力。

开始序列前,用初始流动相平衡至压力稳定。

结束后设定 OFF 冲洗色谱柱方法。纯水不可进 C18 色谱柱,至少 5%有机相。用到缓 冲体系做流动相,后务必及时冲洗,梯度冲洗的起始条件,纯水比例要高于实际测试的水相 比例。例如测样时,缓冲体系相:有机相=20:80,梯度洗脱起始条件为,水相:有机相=30:70, 渐渐过渡到 100%纯有机相。最终将色谱柱保存在纯有机相中。

Eile Edit View Acquire Tools Ex	plore <u>W</u>	/indow <u>S</u> cript <u>H</u> elp		_			Χ	11
🎦 🛱 🖬 🖨 🖪 X 🖻 🖻	29	🗄 🛓 Acquire Mode	_	TOF Trai	ning	💌 🛤 🗙	18 T T H	â
🗃 🍓 ta 🖄 🕹 🖨 🖷 🏛 🖬	1.8.3	≝ ⊠ <u>∄</u> ≁_t¤ ☆ 1	1 🔨				-	
E Configure	Δ	Acquiring Sample 0 of 0) Period	1 of 1	Durations Expected	00:00:00	Queue Server	ŧ
	0% 🔳				100% Elapsed	Re	ady No	rmal
- 🔠 Hardware Configuration		Start Time	Sample Name	Plate Po V	fial Status	Method	Batch	Data
🖉 Report Template Editor	1	😄 3/7/2013 10:35:01 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
((U)) Tune and Calibrate	2	😑 3/7/2013 10:35:57 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
W Justician Continuination	3	🗢 3/7/2013 10:39:09 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
A Instrument optimization	4	😑 3/7/2013 10:42:28 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
ျန္ Manual Tuning	5	📮 3/7/2013 10:42:38 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🕶 Acquire (1)	6	📮 3/7/2013 10:43:02 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
St. Method Wizard	7	😑 3/7/2013 10:44:31 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	8	📮 3/7/2013 10:46:58 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🖳 🔎 Build Acquisition Method	9	😑 3/7/2013 10:48:33 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	10	😑 3/7/2013 10:58:53 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Æ Explore	11	😑 3/7/2013 11:00:23 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	12	3/7/2013 11:01:25 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Upen Data File	13	3/7/2013 11:05:48 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🕞 Open Compound Database	14	G 3/7/2013 11:07:15 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
💦 Companion Software	15	3/7/2013 11:09:31 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	16	3/7/2013 11:13:23 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Peakview	17	3/7/2013 11:18:28 A	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	18	3/7/2013 1:38:56 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	19	3/7/2013 1:41:27 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	20	3/7/2013 1:44:14 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	21	3/7/2013 1:49:12 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	22	3/7/2013 1:51:13 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	23	3/7/2013 1:54:43 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	24	3/7/2013 1:56:51 PM	TuneSampleID	0	Terminated	testTune	ManualTune	MT2
$\langle / \cdot \rangle$								

3 Q-TOF 手动调谐部分

准备工作:从冰箱中提前取出调谐校正液,确认"A 通道"正离子或"B 通道"负离子的校 正液管路没入液面下。

3.1 进入手动调谐界面

Analyst - [Tune Method Editor]			
jie Edit Vjew Acquire Tools Englore	Mindow Script Help		
	🔉 🗠 ± 🛛 Tune and Calibrate Mode 💌 📋 🔂 TOF Training		E .
******	島至夏島ぐ宮 ヶ 下で ←⇒☆森永心 <i>林</i>		
Configure	Acquire Stat I nomp Parameter Edit Ramp	V Use	
Security Configuration	SourceCare Controlled Resolution Data-tay	_	
Hardware Configuration			
S Report Template Editor			
Tune and Calibrate			
A Instrument Optimization			
Kanual Turing			
Acquire			
K Method Wizard			
= puid Acquisition Method			
Explore			
🚅 Open Data File			
😝 Open Compound Database			
Companion Software			
PeakView			
			🖡 WebEx 播放器 — TOF Manual Cal 2 🗵
			文件(四) 控制(()) 控助(山)
Help, press F1			Uter Name: Q-TOPPC
			Webex v

点击侧边栏上的 Manual Tuning 按钮进入手动校正界面或者点击工具栏中的快捷方式

3.2 编辑手动调谐液相方法

"**T**"。

1)、在调谐界面下选择 LC Method,同时把 use 前面框里的过勾上,将液相和质谱关联。

2)、设定液相条件,保证在手动调谐过程中流动相在同步进行(一般设定为初始流动相比例,时间设为5分钟。液相流速的设定跟用的柱子有关,要了解相关常识。流速越高,气量越高。)

3)、检查 CDS(校正传输系统)校正管路没入校正溶液;检查 CDS 的 Peek 管与 APCI 源相连; 检查液相流路与中间 ESI 源连接;检查针的位置。

4)、检查"A"正离子, "B"负离子。

2 🛱 🖬 🖨 🖪 🕺 🕯 🖷 🖆	🔉 🗠 🛃 Tune and Calibrate Mode 💌 🗂 🖻	TOF Training 🔄 🔄 💷 🔣 🔟 📰 🖽
ਖ਼ਖ਼ta≵₿₿♥₿₡₿	≞≌፼&⊬⋈☆T∛∭←→↗	▶ ✿ ư블 禾 ヘ☆ AŸ
Configure	Acquire Start Ramp Parameter Source/Gas Compound Resolution Detector	Edit Ramp LC Method Image: CDS In LC Pump Gradient Limits Limits (Advanced)
Hardware Configuration	Declustering Potential (DP) 100.0	Total Time Flow Rate A (%) B (%)
Tune and Calibrate (1) AY Instrument Optimization _{If} Manual Tuning ∄ Acquire	Collision Energy (CE) 45.0 * Collision Energy Spread (CES) 0.0 * Ion Release Delay (IRD) 67 * Ion Release Width (IRW) 25 *	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
Wethod Wizard Euild Acquisition Method Figure Explore Open Data File		- VT

3.3 手动调谐一级质谱

1)、依次选择扫描类型 TOF MS, 极性, 扫描范围 (m/z 100~1000, 本身范围比 reference 大。

如何看 reference? 依次 Tolls setting—调谐选项—reference 174-792)。

🔤 Zanfigure	Acquire Start Ramp Parameter	Edit Ramp MS Method 🗸 🔽 Use CDS Inject CDS Refit CDS Purge
- 🔎 Security Configuration	Source/Gas Compound Resolution Detector	MS Advanced MS
Hardware Configuration Report Template Editor Tune and Calibrate (1)	Ion Source: DuoSpray Ion Source Temperature Reached √	Scan type: TOF Msses (Da)
A ^Y Instrument Optimization _I r¥ Manual Tuning	lon Source Gas 1 (GS1)	Accumulation time : 0.249966 (secs) Min: 100 Max 2000
*3 Acquire	Ion Source Gas 2 (GS2)	Polarity Display Mass
🔨 Method Wizard	Curtain Gas (CUR)	Positive Center (Da) Width (Da)
📄 📔 Build Acquisition Method	Temperature (TEM) 550.0	
Build Acquisition Batch	IonSpray Voltage Floating 5500.0	
🗳 Open Data File		Period
Compound Database		Duration: 5.000 (mins) Cycles: 1091 - Delay Time: 0 (secs)
M Companion Software ∰ PeakView		

2)、点击 Source/Gas 按钮,设定源和气的参数,通常设定值为 GS1(雾化气):55; GS2(加

热气):55; CUR (气帘气): 35; TEM (温度): 550; ISVF (离子捕获电压):5500(正离子), -4500 (负离子一般比正离子的电压少 1000.)。

	Temperature Not Reached		Sc		
	lon Source Gas 1 (GS1)	55 🔺	Aci		
	lon Source Gas 2 (GS2)	55	F		
	Curtain Gas (CUR)	35 +			
	Temperature (TEM)	550.0 +			
	lonSpray Voltage Floating (ISVF)	55\$0.0			
3)、点击 Compoud 按	钮,设定DP(去簇电压)): 80; CE(碰撞創	8量):10).	7
	Acquire Start	Ramp Parameter	Edi	(; ; Y	
	Source/Gas Compound Reso	olution Detector	MS	X	
	Declustering Potential (DP)	÷ 0.¢8	1		
	Collision Energy (CE)	10.0 +	Sc	÷	

Ac

4)、{几大步骤 start→CDS inject→CDS stop→STOP→看数据→Save 调谐文件}

点击 Start 开始扫描(这个时候 CDS 没有进入,是只有液相流动相进入),出现 TIC(左) 和 MS(右)的扫描图。对于正离子,TIC 图信号一般在 10⁶左右, MS 图信号在 10⁴左右

对于负离子, TIC 图信号一般在 10⁵左右, MS 图信号在 10⁴左右

如果信号过高,需要对管路进行冲洗,用异丙醇:水。比较常见的溶剂背景离子,要善于总结。

	Analyst - [Tune Method Editor D:\A	Analyst Data@rojects\TOF Training\Acquisi	ition Methods\testTune.dam]		
	Be Est Yew Acquire Iools Explore	e Window Script Help	🔁 TOF Training 💽 🖃 🗶 🛄 🗖 🔲	■	X
Corpus Acada Exercise Consecution Exercise Consecuti	• • • • • & & & & & & & & & & & & & & &	夏岡島と岡安丁冬 キャノ	产金谱天话 #		
TC #102 MB tim Earlys (1 meLangis (2) Max 6.64 mg 2 107 ML 57MB mm tim Earlys (1 meLangis (2) meLangis (Colgan A Secular Colganities A Secular Colganities Colganities A Read Translate Galar Transmitter Colganities A Menda Transg Annual Transg A Menda Transg A Menda Transg A Menda Transg A Menda Transg B Maha Capatities Read D Maha Capatities B Maha Capatities D Maha	Acquire Topp Filmp Parameter SourceOre Company (Research) Detector Sin Sauce Dedge film Sauce Temperature Results Dedge film Sauce Temperature Results Office Source Over 2 (952) Gr Cristin Hour Sauce Temperature Results Gauge Sauce	Edit Ranc. [C: Nethod P Use UChrup Gelderf Lain: Lein: Monitodia UChrup Gelderf Lain: Lein: Monitodia 0 00 00 00 0 00 00 00 100 0 00 00 00 100 0 0 00 00 100 0 0 0 00 00 0 0 0 00 00 100		
1.56 1.66 1		Tic of -101 Mit have Saraya () (Inselanyad Saraya Sarayaa Sarayaaa Sarayaaa Sarayaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	15 20 25 25 25 25 25	Visit 0.5 dot op 1 (7) Visit 1.7 Visit 0.7 Vis	Mari Lici ya -TOF Manual Cat_2 El Marita
Neg years fit and the second sec	Help, press F1		1.0009, 1000	User Name: Q-10/PC/administrator D/JAna	yst Deta 🕵 Abort 🔳 Run 👩 Run 👫 Ide

5)、点击 Start 扫描之后,观察 TIC 信号,基线平稳之后,点击 CDS Inject

112 215, 1410 C			
fit Ramp LC Method	• •	Use	CDS reject CDS Refill CDS Purge
Pump Gradient Limits Limits (Advance	d) Micro Mod	e 📃 👝	
Total Time Flow Rate (min) (µl/min)	A (%)	B (%)	
0 0.00 400	90.0	10.0	

CDS Refill 表示将 CDS 校正液泵入注射器,充满注射器,一般在采集 CDS 信号过程中 信号下降时,需要点击 CDS Refill 将注射器内校正液注满。CDS Refill 完成后会自动停止。 CDS Purge 表示用当前的校正液充满管路,赶出残存的溶液和排出气泡。如果不是更换校 正模式(正和负之间切换),不需要用 Purge。

6)、CDS Inject 之后仪器由于进了校正液,信号会出现明显上升的峰,20-30 秒后等 TIC 信号稳定,即可点击 CDS stop 按钮停止进校正液

	1 co modilod		- I	Use	CDS COS R
LC Pump Gradie	nt Limits Li	mits (Advanced	d) Micro Mod	e	
	Total Time (min)	Flow Rate (µl/min)	A (%)	B (%)	
0	0.00	400	90.0	10.0	
1	5.00	400	90.0	10.0	
2					
3	1				
4					
5					
1-		1	1	1	1

7)、点击 Stop 停止扫描

Acquire Stor Ramp Parameter	Edit Ramp	LC Method		• •	Use
Source/Gas Compound Resolution Detector	LC Pump Gradie	nt Limits Li	mits (Advanced	d) Micro Mod	le
Ion Source: DuoSpray Ion Source		Total Time (min)	Flow Rate (µl/min)	A (%)	B (%)
Temperature Reached 1/	0	0.00 5.00	400 400	90.0 90.0	10.0
Ion Source Gas 1 (GS1) 55 🔺	2 3 4				
Ion Source Gas 2 (GS2) 55 🔺	5	X			

8)、鼠标左键选择"左边 TIC 图"平台的后半段比较平缓的地方,双击,就会出现右边质谱。 在出现的质谱图上右击,选择 Re-Calibrate TOF。



TOF Calibration
1. 选择 役止 Reference Table APCI Negative Calibration Solut APCI Positive Calibration Solut
Experin Csl_ALILITUS_Reference Mass Calculate new calibrations Average Error: 0.553454 ppm 1 146.12187 Glu-fibrinopeptide B Calculate new calibrations 校正误差控制在 2 266.166838 266.159810 External Calibration 放正误差控制在 3 315.170767 315.162250 State and the second
4 354.212340 5 442.275534 442.264670 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246 5 500.2004246
Selected Range Calibration is applied to selected range of scans Current 7.03204199858504230e-004 6.09274765759003980e-002
Whole Sample Calibration is applied to all scans in current sample New 7.03198321030150850e-004 1.76817806443660020e-001 4 Entire File Calibration is applied to all 3 Calibrate spectrum
✓ Set As Instrument Default
保存校正文件
TOF Calibratit Save in Tuning Cache Image: Cache in the image: Cache in
SAVE CURRE SAVE CURRE Selected WD Documents MU Computer Entire Entire V NoleS MU Network File name: MU Network File name: MU 20130307153005 (recalibrated) wiff Save at Upe; V/I FileS (wiff) MU 20130307153005 (recalibrated) wiff MU 20130304254wiff MU 20130304253wiff MU 20130304253wiff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 20120304475miff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 201203046251wiff MU 2012103046251wiff MU 201210304
ExploreDir TOF Calibration SA Image: Comparison of the second when the Close button on the Recalibre; APCI Positive Calibration Solution Tole renormality
OK Experimental Mass Theoretical Mass Calculate new calibrations Average Error: 0.553454 ppm Entire File Calibration is applied to all samples in the file 3 315 162204 315 162204 354 212249 V 3 54 2122419 354 212240 External Calibration External Calibration V Set As Instrument Default 100 F recalibration TOF recalibration
SAVE CURRENT CALIBRATION Selected Range Calibre Whole Sample Calibre C
Image: Set As Instrument Default Close Help

按照下图中位置(1.2.3.4),依次点击,进行校正操作

3.4 校正液使用注意事项:

1)、仪器很稳定,无需频繁校正,建议5h进行一次"自动校正"即可。

2)、正负离子校正液每次做完实验后需要换上密封的瓶盖,放至实验室冰箱保存

3)、校正液倒出一点用,不要整瓶用。因为常温下成分会降解,发生变化。

4)、如果长期不用,要用纯甲醇 purge 校正液管路。平常做完,后面没有人,管路就放 到 甲醇水或者纯甲醇的瓶子里,校正液放回冰箱,节约使用。

Compone		
Calibratia	Positive Mass (Da)	Negative Mass (Da)
Calibration ion A	146.1176	144.1030
Calibration ion B	266.1598	264.1453
Calibration ion C	n/a	277.0983
Calibration ion D	315.1623	n/a
Calibration ion E	354.2122	352.1977
Calibration ion E	n/a	403.1122
Calibration ion C	442.2647	440.2501
Calibration for G	609 2807	n/a
Calibration ion H	648,2695	616.3550
Calibration ion I	618.3095	792,4598
Calibration ion J	n/a	n/a
Calibration ion K	922.0098	2/2
	1521.9715	Пла

3.5 手动调谐二级质谱

选择扫描类型 Product Ion,

ľ	MS Advanced N	1S]	4				J	
	Scan type:	TOF MS		TOF Masses (D	a)	4 1000		
	Accumulation time	Product Ion Product Ion Precursor Id		Display Mass		Max: 1000	/width	
	\geq	C Negative		Center	r (Da) Wi	idth (Da)		
*	Period Duration: 5.001	(mins)	Cycles: 1	1091 •	Delay Tim	e: 0	(secs)	

选择合适的母离子,可以选择自动填充,即在下拉菜单选择 Calibrate,勾上 Auto Calibration,再勾掉,回到 Mass Method。母离子的一套参数就自动填充进去了。

Edit Ramp	Calibrate		▼ Vse	CDS Inject	С
I▼ Auto Calil Note: When A DP will be ad	bration Auto Calibration justed based on	is selected for the the current refere	Product Ion scan type nce table.	e, the precursor mass, CE	E, ar
Calibrant Ref	erence Table	APCI Positive C	alibration Solutior 💌	View	1
CDS Inject Fl	ow Rate	500	(ul/min)		(7
CDS Refill/Pu	urge Flow Rate	1000	(ul/min)	7/1	r
			K		

手动校准二级质谱需要根据实际样品选择相近的校正液物质,例如,正离子模式,样品 m/z为400左右,则可以选择 m/z为315的校正液物质做二级校正,以此类推。

Tolls setting 下选择, APCI(+)只有 315/609 这两个可以做二级校正, 二选一。APCI(-) 只有 277/403, 可以做二级校正。因为其他 m/z 只有母离子, 没有子离子, 是多肽。

Edit Ramp	MS Method	▼ IV Use	CDS Inject CDS Rehill CDS Purge
MS Advance	ed MS	Λ	
	-		
Scan type:	Product Ion 💌	TOF Masses (Da)	
Product Of:	609.28066 (Da)	Min: 80	
Accumulation tir	me: 0.100006 (secs)	 High Resolution High Sensitivity 	──根据灯丁分辨率和灵 ──敏度的需求选择
Polarity	Positive	Display Mass	Center/Width
\sim	C Negative	Center (Da)	Width (Da)
\sim			
Period			
Duration: 5	5.000 (mins)	Cycles: 3000 📩 Dela	y Time: 0 (secs)

ý

点击 Source/Gas 按钮,设定源和气的参数,与一级质谱一致

点击 Compoud 按钮,设定 DP (去簇电压): 80; CE (碰撞能量):35; CES (碰撞能量范围):15 经验值 m/z609,45±15; m/z315,35±15

之后进行调谐,与一级质谱方法一致,即**{几大步骤** start→CDS inject→CDS stop→STOP→**看数据**→Save 调谐文件**}**。

4 方法和序列编辑部分(含自动调谐)

高分辨仪器,在序列里,必须要经常性地自动校正。。不能一劳永逸。经验值一般为 3~5 小时自动校正一次,所以需根据样品测定时间调整自动校正的频率。

4.1 方法编辑

点击侧边栏上的 Acquire,再选择 Build Acquisition Method。



依次,编辑液相方法和质谱方法。



液相方法编辑,可以设置等度或者梯度。

🔠 Analyst - [Acquisition Method:]			1				
K Eile Edit Yiew Acquire Tools Exp	olore <u>W</u> indow <u>S</u> cript <u>H</u> elp							
12 🚅 🖬 🖨 🖪 👗 🖻 🛍	🗅 🗠 🛃 🗛 Acquire Mode 💽 📄	2	TOF Training		-	e 🗙 🖪	1 🗖 🖽	B
₩ ₩ 10 & & & 0 & 0	₽₽₽₽₩☆Tヾ							
El Configure	Acquisition method		LC Pump Gradier	nt Limits L	imits (Advance	d) 🗍 Micro Mo	de	
Security Configuration	⊡∰ Acquisition Method ⊡ Mass Spectrometer 1.998 mins			Total Time (min)	Flow Rate (µl/min)	A (%)	B (%)	
Hardware Configuration	Period 1.998 mins		0	0.00	0	0.0	100.0	
(III) Tune and Calibrate	Agilent 1260 Binary Pump (0.0 mins)		2					
AV Instrument Optimization	→		3 4					-
ng¥ Manual Tuning	Agilent 1100 Thermo Autosampler		5					
🕶 Acquire (1)								
 Method Wizard Build Acquisition Method Build Acquisition Batch Explore Open Data File Open Compound Database Companion Software 					V	ŀ	Ż	7
PeakView			X	「スム		5	V	

TOF 方法编辑,依次选择扫描类型 TOF MS,极性,扫描范围。

MS Advanced MS	Polarity	
Experiment: 1	Positive Negative	TOF Masses (Da)
Scan type: TOF MS TOF		M <mark>in: 100 Max: 1000</mark>
Accumulation time : 0.249966 (secs) Mir		Display Mass
Polarity C Positive		

Accumulation Time: 一级质谱时间(<0.3 s)加上二级质谱时间(<0.1 s), 保证最后 得到的总循环时间(Cycle time)小于1 s。

点击 Edit Parameters(参数编辑)模块点击 Source/Gas 按钮,设定源和气的参数,通常 设定值为 GS1(雾化气):55;GS2(加热气):55;CUR(气帘气):35;TEM(温度):550; ISVF(离子捕获电压):5500(正离子),-4500(负离子)。

点击 Compound 按钮, 设定 DP (去簇电压): 80; CE (碰撞能量):10。

Parameter Settings Source/Gas Compound Ion Source: DuoSpray Ion Source Description DuoSpray Ion Source Ion Source Gas 1 (QS1) 55 • Ion Source Gas 2 (QS2) 55 • Curtain Gas (CUR) 550 • Temperature (TEM) 550 • IonSpray Voltage Floating 4500.0 • Apply the following parameters to all other experiments: Source/Gas Compound DK Cancel	Parameter Settings Source/Gas Collision Energy (CE) 100 iod: 1 Apply the following parameters to all other experiments: Source/Gas Compound OK Cancel
如图所示添加二级质谱	Copy this experiment Accul

选择 Experiment 2, Scan type Product Ion, 勾上 IDA Experiment, 即将一级和二级关联。

IDA 信息相关性采集,满足 IDA,会自动作二级。一般为一拖 10,前 10 个信号最高的会做二级。

्📩 Run (0.0 mins)

Acquisition method	MS Advanced MS
Acquisition Method	Experiment: 2
Mass Spectrometer 5,000 mins	Scan type: Product Ion 💌
TOF MS (-) Product Ion (-) 30.0	Product Of: 30 (Da)
Agilent 1260 Binary Pump (0.0 mins)	Accumulation time : 0.100016 (secs)

点击 Source/Gas 按钮,设定源和气的参数,通常设定值为 GS1(雾化气):55; GS2(加 热气):55; CUR(气帘气):35; TEM(温度):550; ISVF(离子捕获电压):5500(正离子), -4500(负离子)

点击 Compound 按钮,设定 DP(去簇电压,正离子为正,负离子为负): 80; CE:35(碰撞能量,正离子为 35,负离子为-35); CES(碰撞能量范围):15。。表示为 35±15,能量有 个范围

	Parameter Settings	Parameter Settings
	Source/Gas Compound	Servee/Cool Compound
	Ton Source: DuoSpray Ion Source	Cellician Ensure (CE)
	191	Collision Energy (CE) -35.0 -
		Ion Release Delay (IRD)
		Ion Release Width (IRV)
	Curtain Gas (CUR) 35 +	
	Temperature (TEM) 550	
	IonSpray Voltage Floating	
		Apply the following parameters to all other experiments:
	Apply the following parameters to all other experiments:	🗖 Source/Gas 🗖 Compound
		OK Cancel
	UK Cancel	
	点击 Switch Criteria,进行 IDA 设定	
	MS Advanced MS Switch Criteria Include / Evolude IDA	
	Ino Advanced ing Commencement Includer Exclude Tox	
-11	- Survey NIDA Experiment	可以进一步细化二级扫描离子(
	Survey 7 IDA Experiment	一般不用 口许设置扫描范围即
		可)
	✓ For ions greater than: 100 m/z	
		表明扫描的离子是带2到4
	Equippe employ them 1250	
		个电荷(一般个用,做单
		电荷即可)
	✓ With charge state 2 ▼ to 4 ▼	
	10	扫描阈值。数值越小,可获得离
	Which exceeds 10 cps	子粉妆拢冬 中知样只前坦下
<u>~</u> Ш	✓ Exclude isotopes within: 4 Da 封印全面位表	的 [设为100]
- 11		\$HJ
	Mass Taleranasi 50 Ppm	
	Mass Tulerance. 50	款认阻 50。
	v inda	精确
	Maximum number of candidate ions	
	to monitor per cycle:	表示一级 MS 后面跟几个二级 MS/MS,
		一般为 6-10 原则是这个数值的设定
4	Exclude former target ions	农示的——级灰馆时间加上一级灰馆
	G Muur	时间(Accumulation Time,一般为
A.	v• Never	0.03-0.05sec) 最后得到的兑循环时

C Always C For 0

After 1

seconds

occurence(s)

时间(Accumulation Time, 一般为 0.03-0.05sec)最后得到的总循环时 间(Cycle time)小于1sec.



点击 IDA Advanced, 勾选 DBS(动态背景扣除

4.2 序列编辑

点击侧边栏上的 Acquire,再选择 Build Acquisition Batch。

先点击 Add Set , 默认为 SET 1 之后再点击 Add Samples , 在右边的下拉菜单里选择 方法,编辑序列,要填写的具体内容有:样品名称(Sample Name),小瓶位置(Vial Position), 数据文件名 (Data File)。

在 Calibrate 选项卡中将 Auto Calibration 之前的对勾勾上,进行自动校正(通常 5 h 校正一次)。

在 Submit 选项卡中编辑的序列提交

📹 Acquire

```
    ✓ Method Wizard
    ✓ Build Acquisition Method
    ✓ Build Acquisition Batch
```

```
🔎 Explore
```

Sample Locations Calibrat	e Quantitation Submit
ノハハノ	
SET1	
Auto Calibration	选择相隔多少样品校正,根据
Calibrate Every	5 Samp存品数量设定
Calibrant Reference Table	APCI Negative Calibration Solution View
CDS Inject Flow Rate	500 ul/min

在 Submit 选项卡中编辑的序列提交,如果出现报错,则原因是自动校准的标准物质的 质荷比超过了编辑的一级或者二级质谱的扫描范围,需要更改校正表中的离子范围。



修改自动校准物质:依次点击 Tools→Settings→Tuning Options。

点击 Reference,选择所采用的校正液,选中或勾掉相应的离子,点 OK 即可。



4.3 运行序列

序列提交后,点击 Quene,可以看到序列状态。

点击 Equilibrium(工具栏中)调用方法所需方法进行平衡。

仪器(色谱柱)已经平衡,处于 Standby 状态下,就可以开始序列 (注意:在调谐状态下,状态栏里的 T 是呈灰白色,开始序列前确认该图标为非激活状态)。

实验结束后点击 Deactivate Profile 使仪器失活。

Configure Security Configuration	Act	quiring Sample 0 of	f 0 Period	1 of 1	100%	Durations Expected Elapsed	00:00:00	Queue Server	양편]
	0/8	Charle Time	Commiss Name		1.00%	Ctatur			
Beport Template Editor		Start Time	Sample Name	Plate Po	viai	Status	Method	Batch	Data
(a risport remplate Editor			A TuneSampleID	0		Terminated	testrune	ManualTune	MIZ
«ψ» Tune and Calibrate	2	3///2013/10:35:57	A TuneSampleID	0		Terminated	testiune	Manuallune	MIZ
- A Instrument Optimization	3	3///2013 10.39.09	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
ィ빌 Manual Tuning	5	3/7/2013 10.42.28	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Accuire (1)	6	3/7/2013 10:42:30	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Acquire (1)	7	3/7/2013 10:43:32	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🌂 Method Wizard	8	3/7/2013 10:46:58	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🖵 📔 Build Acquisition Method	9	3/7/2013 10:48:33	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Build Acquisition Batch	10	3/7/2013 10:58:53	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	11	3/7/2013 11:00:23	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Explore	12	3/7/2013 11:01:25	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🛁 🚰 Open Data File	13	3/7/2013 11:05:48	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
🔄 😂 Open Compound Database	14	🗢 3/7/2013 11:07:15	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
Companion Software	15	😄 3/7/2013 11:09:31	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	16	😄 3/7/2013 11:13:23	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
PeakView	17	🗢 3/7/2013 11:18:28	A TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	18	🗢 3/7/2013 1:38:56 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	19	😄 3/7/2013 1:41:27 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	20	😄 3/7/2013 1:44:14 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	21	😑 3/7/2013 1:49:12 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	22	3/7/2013 1:51:13 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	23	3/7/2013 1:54:43 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2
	24	😄 3/7/2013 1:56:51 F	PM TuneSampleID	0		Terminated	testTune	ManualTune	MT2

注意: TOF MS 和 Product Ion 方法中 advanced MS 选项卡下的 Pause between mass ranges 必须给定一个数值,不能为零,否则,仪器将不采集信号。一般情况下,该参数为 系统默认值,无需修改。



5 注意事项

(1)、所有样品均须过 0.22 um 滤膜,或者 15000 rpm/min 离心 5~10 min 取上清液。

(2)、C18色谱柱建议保存在纯甲醇中,因为乙腈时间长了会析出结晶。

(3)、进样小瓶的盖子买粗糙有纹路的,抓瓶出现故障时,不可以用手强行扳机械臂下爪子, 关机即可。

- (4)、水相,当日用时新配,超声脱气再用。溶剂要淹没滤头。
- (5)、缓冲液体系,样品测试结束一定要及时冲洗柱子和系统。
- (6)、水相长期不用,滤头放到有机相中。
- (7)、所有管路不可夹到仪器组件里,废液出口要观察是否流畅。
- (8)、Purge时,纯水5mL/min时,若压力超过7-8bar,告知老师。

(9)、使用中,注意观察压力变化。接柱子时,采取低流速 0.1-0.2mL/min。"柱前纯有机溶剂压力""接柱子纯有机溶剂至平衡压力"、"实验结束纯有机溶剂冲柱子的压力",登记在实验记录本上。

- (10)、冲柱子,从 MS 离子源进口前断掉。
- (11)、液相柱不能和液质联用柱子混用。
- (12)、样品如含有无机盐,务必前处理。过H柱,或SPE处理
- (13)、如因为样品量少用到内插管,注意抬高液相针,用尺子量。
- (14)、测试开始/结束的质谱背景信号,发负责老师。
- (15)、上样浓度务须注意,未知样品先稀释一千到一万倍再上样。
- (16)、数据,桌面 upload data 上传到服务器。不允许连外网 / 下软件 / 插 u 盘。
- (17)、参加培训,预约考试,获得使用资格。使用自己的账号。
- (18)、校正液用完1瓶再开新的。别拿错。
- (19)、不要随意修改仪器参数,尤其检测器电压。
- (20)、氮气发生器冷凝水,除湿机水,及时倾倒。
- (21)、有机废液要按规定处理。
- (22)、注意仪器室卫生、用电安全。

6 常见问题解决方案

仪器运行 12 年来,学生遇到各种问题,会求助老师。在方法开发方面,会一对一指导 实验,例如:

- (1)、问题:保留时间不具重现性,无法定量;柱压比之前高1.9倍。(郭同学)
 - 解决:梯度最后要回到起始比例并维持足够时间;建议设置高比例水相清洗。
- (2)、问题:峰拖尾,峰宽超2分钟。液相峰是大包,很宽。(吴同学、戴同学)
 - 解决:优化色谱条件,先后洗脱出几个尖峰,并且数据得到很好解析
- (3)、问题: 高分辨液质测试藻毒素质量误差偏大。(刘同学)

解决:考虑高质量端兼方法采集时间长,建议增加自动校正频率,且梯度设短一点。

(4)、问题: 高分辨测试没信号。(石同学, 龚同学、汤同学)

解决:优化色谱梯度。排查发现 0.1%甲酸冰箱久置挥发,重申水相必须新配原则。

(5)、问题:样品背景溶剂是丙酮,能否直接进样。(姜同学)

解决:建议氮吹,流动相复溶。否则峰形非常难看,前伸峰。

- (6)、问题:降解产物,两性离子,氨基和磺酸基都有,做负离子测试,要加氨?(王同学) 解决:建议加甲酸铵乙酸铵 2mM~5mM。
- (7)、问题:做了一个多月都没有测出信号。(冯同学)

解决: 正负离子的判断, 不清楚化合物性质, 采取错误离子模式

(8)、问题:直接进样有信号,一上柱子就消失(虞同学)

解决: 溶剂的选择有讲究。从高比例有机相到纯有机相。

(9)、问题:准分子离子找不到。(于同学)

解决:母离子选择[M+H]+、[M+Na]+?

(10)、问题:样品在死体积出峰。(鲁同学)

解决:极性物质,C18柱上无保留,选择合适的色谱柱。

(11)、问题:负离子,手动校正时,质量误差 0.6ppm。但是做样品时,标样(m/z 151)13-17ppm 解决:在 batch 里设置一个自动校正,即 Autocali。

研究生在使用仪器时,经常会出现一些小的故障,久病成医,作者会第一时间相应,当 日维修好,节约了时间,节省了维修经费。

(1)、问题:液相不泵液,Purge时,压力为0。或,通道 purge 时波动。

解决:入口单行阀阀芯超声清洗,如还无法解决,更换阀芯

(2)、问题:自动进样器不取样了。

解决:用的瓶盖光滑,更换有螺纹的。

(3)、问题:正离子不行,校正两小时通不过,质量误差 200ppm。

解决:质谱部分清洗,更换探针,更换所有 PEEK 管路,清洗流路。

(4)、问题:液相模块红了,无法进样。

解决:漏液。漏液传感器处擦拭后,重新联机。

(5)、问题:质谱无信号。

解决: 经检查液相部分正常, 质谱喷针堵了, 探针超声清洗, 或换探针。

(6)、问题: CDS 校正传输系统不输液体。CDs inject 有信号平台不够高。或 CDS 有气泡,

一大段连绵不断的气泡。

解决:用纯甲醇冲洗 CDS 系统。

(7)、问题:自动进样器报红,针座处漏液。

解决:同学的样品没有过滤好,或者离心取的上清液中有颗粒。90%是针座堵了,超声, 如超声如法解决,用提前购置的配件更换。10%是针扎毛了,更换。

仪器的培训工作要有责任心,日常的运行维护和维修要有耐心。Agilent 1260—AB SCIEX Triple TOF 5600 高分辨质谱联用的培训讲义,除了本文的 word 版本外,还有 ppt 版本,视频版本。这台仪器累计培训 600 余人次。培训之后,每位同学可申请老师的一对一辅导上机,取得上机操作资格后,方法开发中遇到任何问题,都可以求助负责的老师。受益于培训及指导的研究生,每年都有一定数量的论文发表在 ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, WATER RESEARCH 等环境领域顶级期刊上。因为日常的维护和故障的维修到位,年平均节约维修经费 20 万元,年平均使用机时 4000 小时以上。