

LC/MS/MS技术基础及工作流程



安捷伦科技有限公司

概要



- LC/MS/MS 技术基础
- LC/MS/MS方法开发流程

Agilent 6000 系列液质产品家族

应用于从生命科学到化学分析的所有领域



6100 Single Q



6300 Ion Trap MS
SL, XCT and XCT ultra



6400 QQQ MS



6200 TOF MS



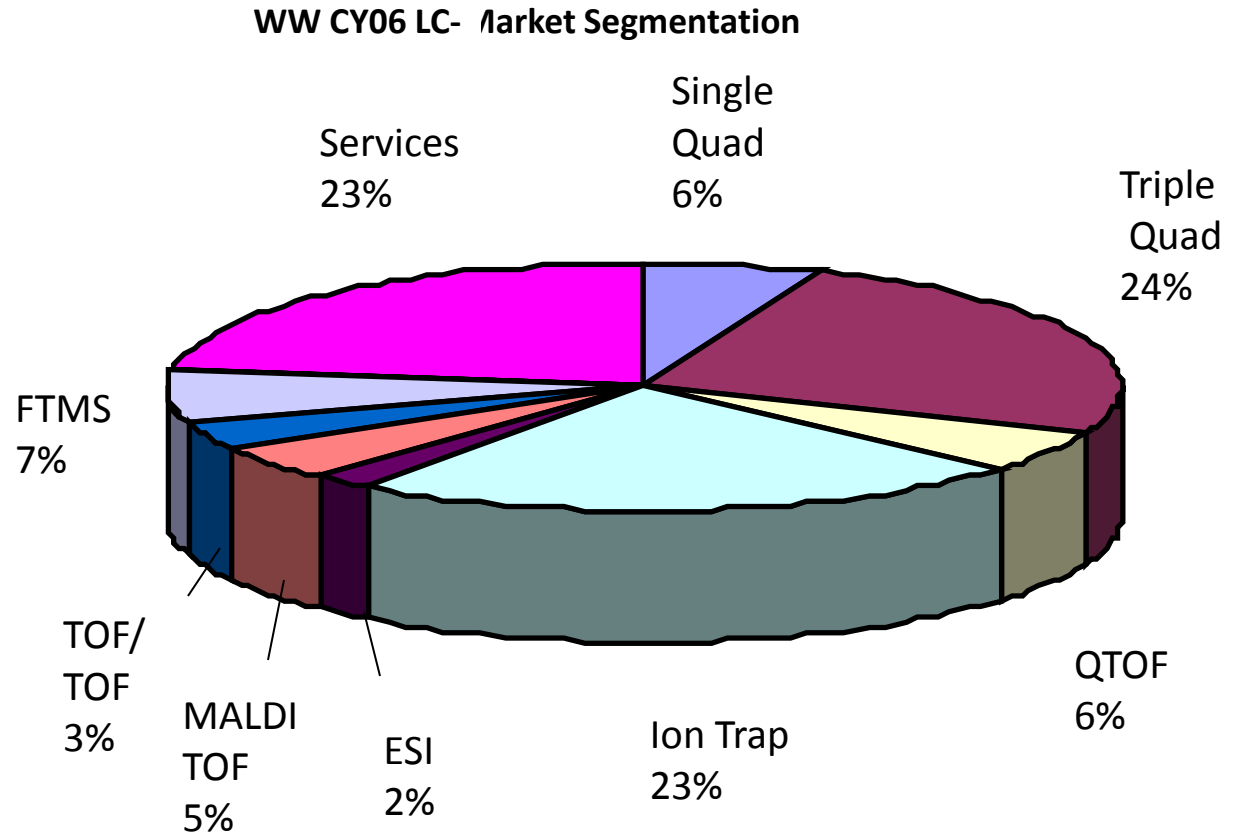
6500 Q-TOF MS

Quantitative

Qualitative

Total Active LC-MS Installed Base by Technique

- **QQQ and Ion Trap segments comprise nearly half of the MS market** 串接四极杆和离子阱质谱占近一半
- Triple Quad LC-MSMS dominated the quantitative markets** 定量应用市场主要采用串接四极杆质谱



Source: estimates based on available CY data

串联四极杆液质在定量分析中的优势

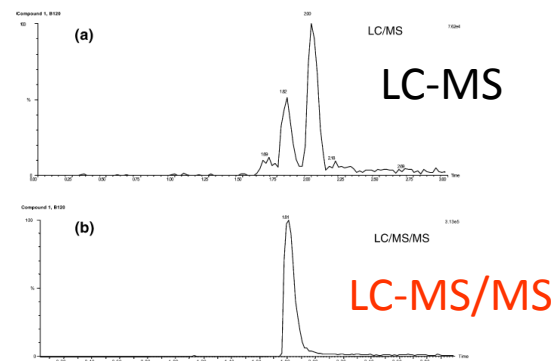
✓ 高灵敏度(适合复杂基体中低浓度化合物的分析)

✓ 高选择性

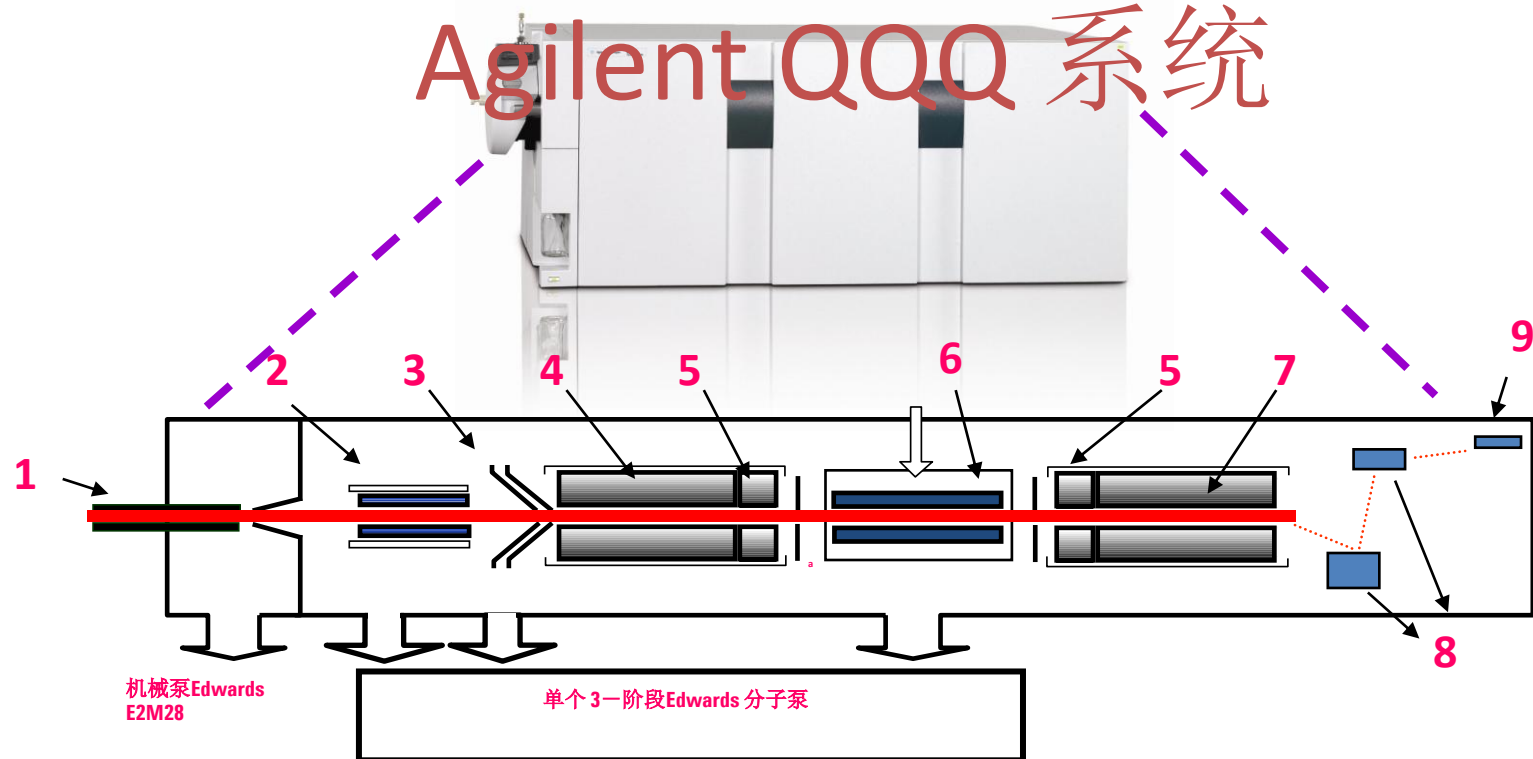
➤ 消除干扰⇒ 定量分析结果更准确

✓ 快速, 实现高通量分析

✓ 定量分析与定性确证一次完成

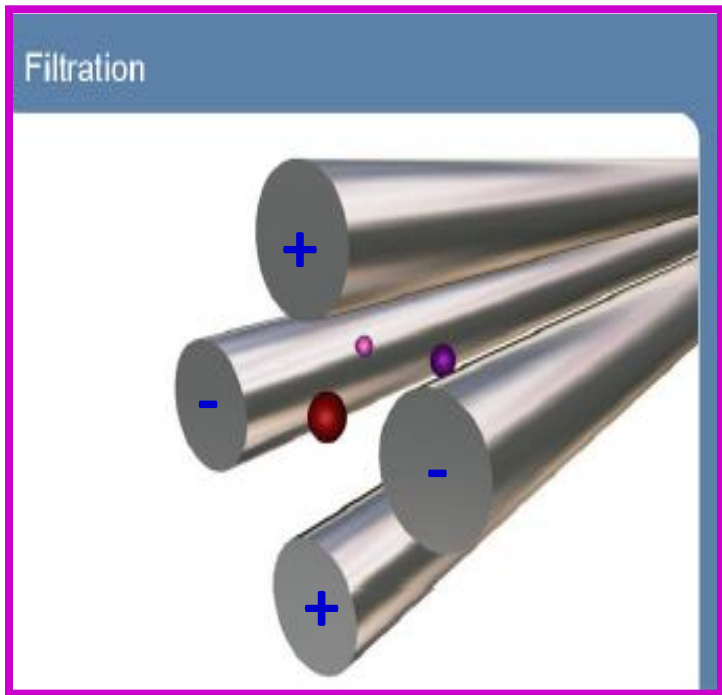


Agilent QQQ 系统



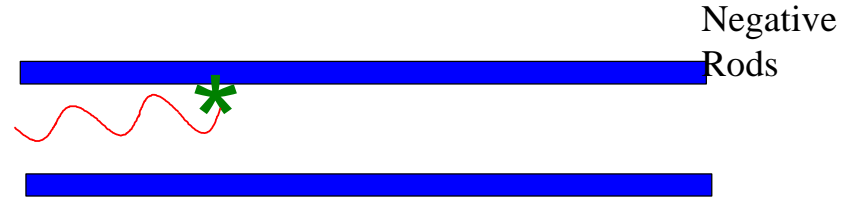
- 1.毛细管 2. Skimmer与八极杆 3. lens1 和lens2 4.四极杆 1(MS1)
5. RF 四极杆段 6. 碰撞池 7. 四极杆2 (MS2) 8. 打拿极 9. 电子倍增器

四极杆工作原理



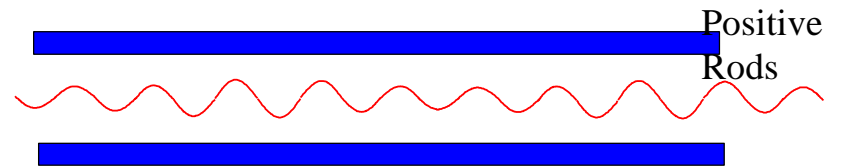
过滤高质量
离子

M
+



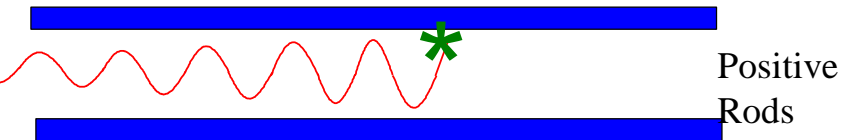
特定质量
离子

M
+



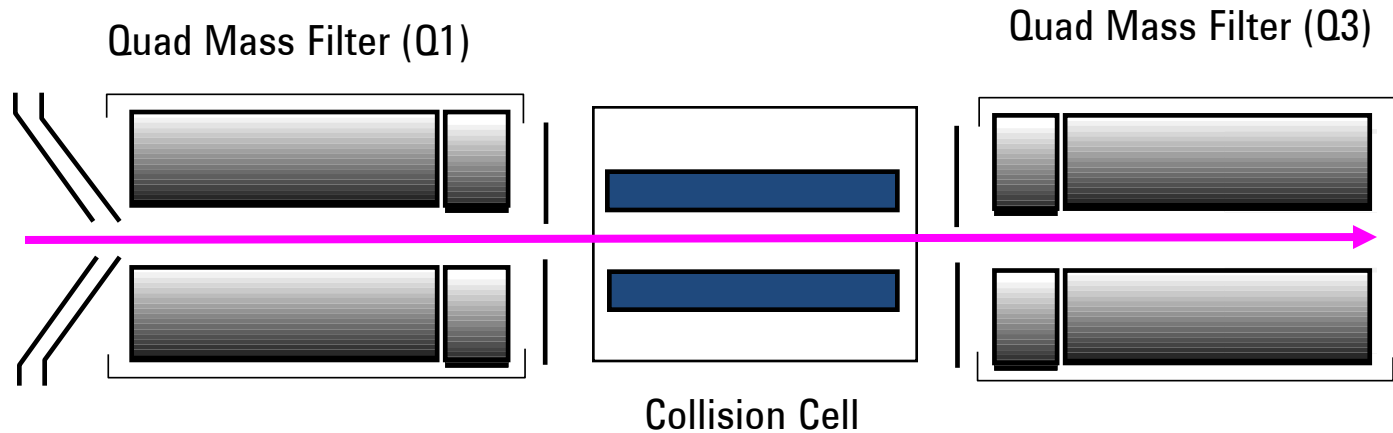
过滤低质量
离子

M
+

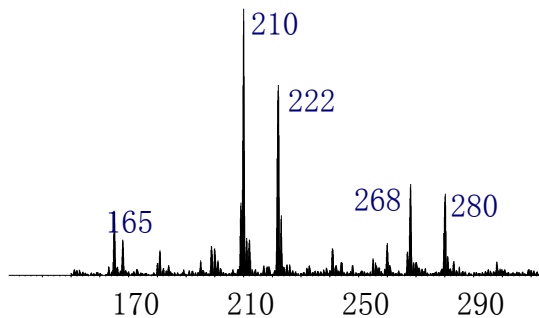


LC/MS QQQ: 卓越的灵敏度和选择性

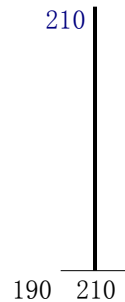
MRM (Multiple Reaction Monitoring)



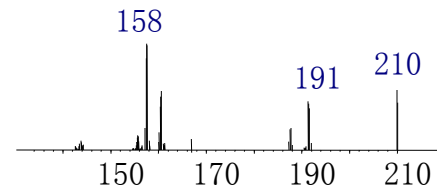
Spectrum with
background ions
(from ESI)



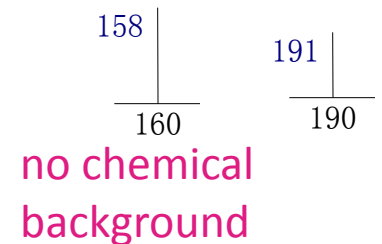
Q1 lets only
target ion 210
pass through



Collision cell
breaks ion 210
apart

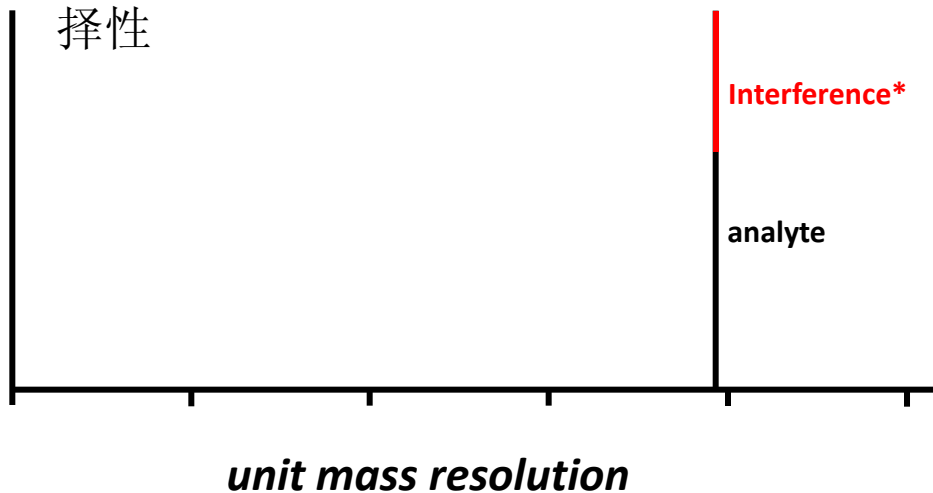


Q3 monitors only
characteristic
fragments 158 and
191 from ion 210
for quant and qual.



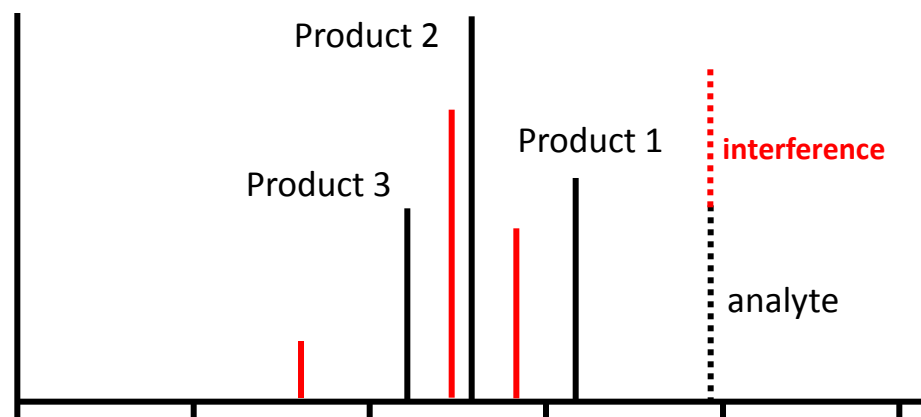
MS/MS 可以消除 Scan 和 SIM 的干扰

SIM 选择性与谱图分辨率相关，对相同质荷比不具有选择性



子离子扫描

母离子选择性同左，极大可能是干扰物和样品的碎裂后产生的子离子不重合



*Because the concentrate of the matrix may be much greater than the analyte, even matrix isotope ions (A+1, A+2, etc) may be a significant interference

名义分子量和平均分子量

对于分子 $\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_3$

平均分子量为

$$6(12.01115) + 3(1.000797) + 3(35.453) =$$

$$\text{MW} = 181.428$$

$$6(12.0000) + 3(1.00078) + 3(34.9989) = 179.9990$$

精确质量/单同位素质量

180.0 daltons----名义分子量 nominal mass

MH Qualitative SW 质谱计算

Agilent MassHunter Qualitative Analysis - Default.m

File Edit View Find Identify Chromatograms Spectra Method Actions Tools Help

Data Navigator Chromatogram Result

Sort by Data File

Tools menu:

- Show Formula Calculator
- Show Mass Calculator
- Open Report Designer...
- Configure for Workflow
- User Interface Configuration...
- Plot Display Options...
- Plot Line Definitions...
- Table Text Definitions...

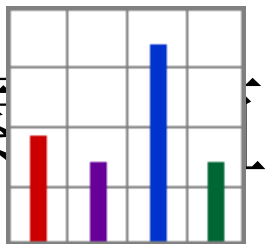
Mass Calculator

Base formula (M): C6 H3 Cl3

Species to calculate:

- ☒ Positive ions ☐ Negative ions
- ☒ Neutral
- ☐ Radical
- ☒ +H
- ☐ +Na
- ☐ +K

Species	Calc m/z	Diff (ppm)
M	179.93	
(M+H)+	180.9373	



原子的精确原子量和同位素

原子	质量	相对丰度	质量	相对丰度	质量	相对丰度	分类
氢	1.0078	100					A
碳	12.0000	100	13.0034	1.1			A+1
氮	14.0031	100	15.0001	0.37			A+1
氧	15.9949	100			17.9992	0.2	A+2
氟	18.9984	100					A
钠	22.9898	100					A
硅	27.9769	100	28.9865	5.1	29.9738	3.4	A+2
磷	30.9738	100					A
硫	31.9720	100	32.9715	0.8	33.9679	4.4	A+2
氯	34.9989	100			36.9659	32.5	A+2
钾	38.9637	100	0.01	40.9618	7.2	A+2	
溴	78.9183	100			80.9163	98	A+2
碘	126.9045	100					A

同位素丰度比可以用 $(a+b)^n$ 二项式展开来表示

a为轻同位素的丰度

b为重同位素的丰度

n为卤素原子的数目

例如 $C_6H_3Cl_3$ ，含有3个氯原子，即 $n=3$ ；

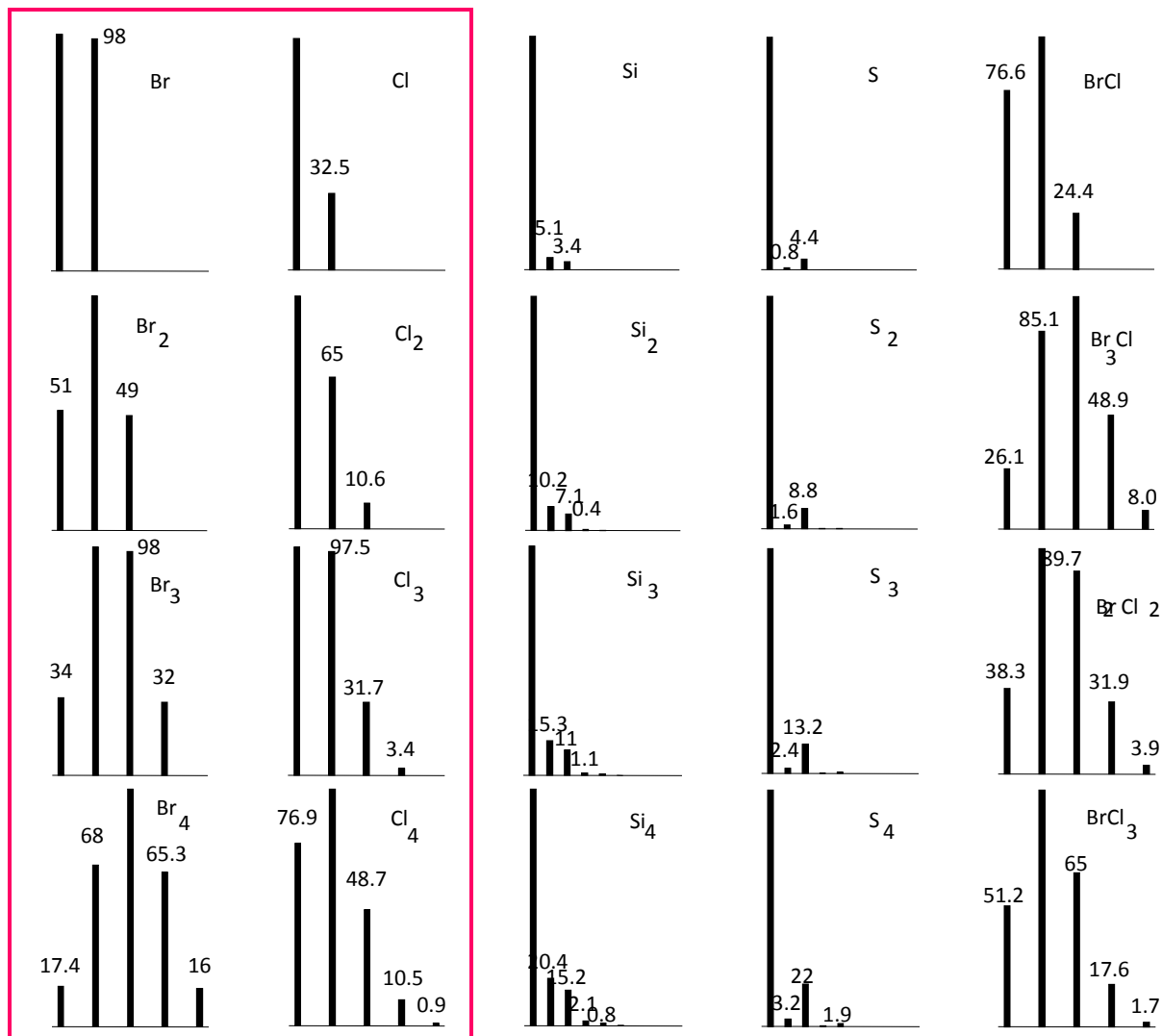
^{35}Cl 的丰度为75.4%， ^{37}Cl 的丰度为24.6%，即a: b约为3: 1

则 $(a+b)^3=a^3+3a^2b+3ab^2+b^3=(3+1)^3=$

$3^3+3 \times (3^2 \times 1) + 3 \times (3 \times 1^2) + 1^3=27+27+9+1$

常见的A+2同位素峰

A+2
ISOTOPES



同位素类型分布计算器

<http://www.geocities.com/junhuayan/pattern.htm>

Address  <http://www.geocities.com/junhuayan/pattern.htm>

Isotope Pattern Calculator v4.0

----- For naturally occurring isotopes version -----

Developed by [Junhua Yan](#) 2001.9

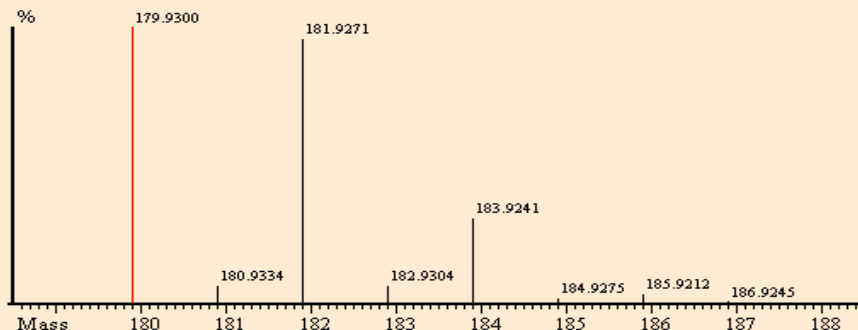
Please type molecular formula (case sensitive):

[\[See help in detail\]](#) **[If this software not work, please visit**

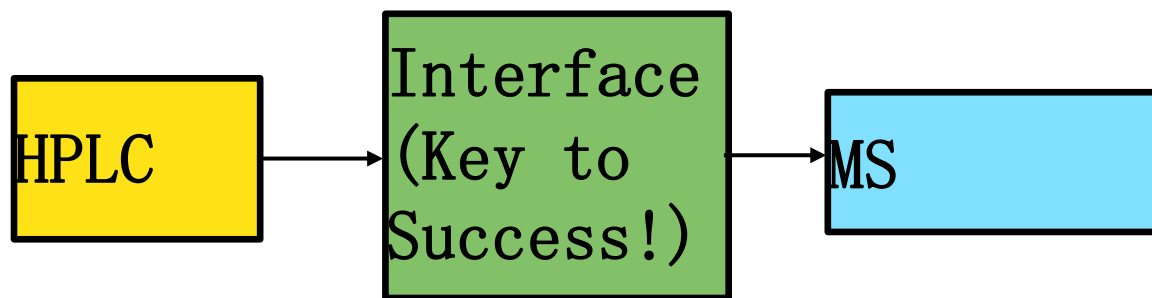
Isotope Pattern Calculator v4.0

[Developed by Junhua Yan](#) 2001.8

Molecular Formula: $C_6H_3Cl_3$
Molecular Weight: 181.447020
Exact Mass: 179.930033



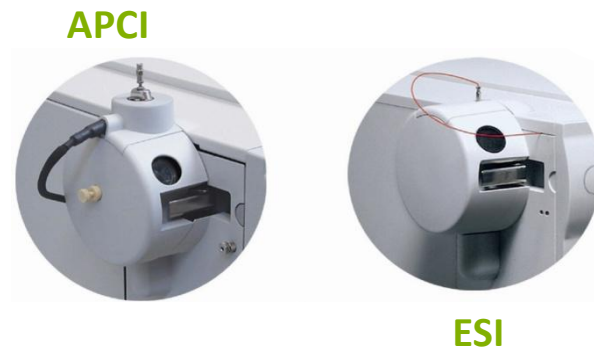
离子化理论



离子源

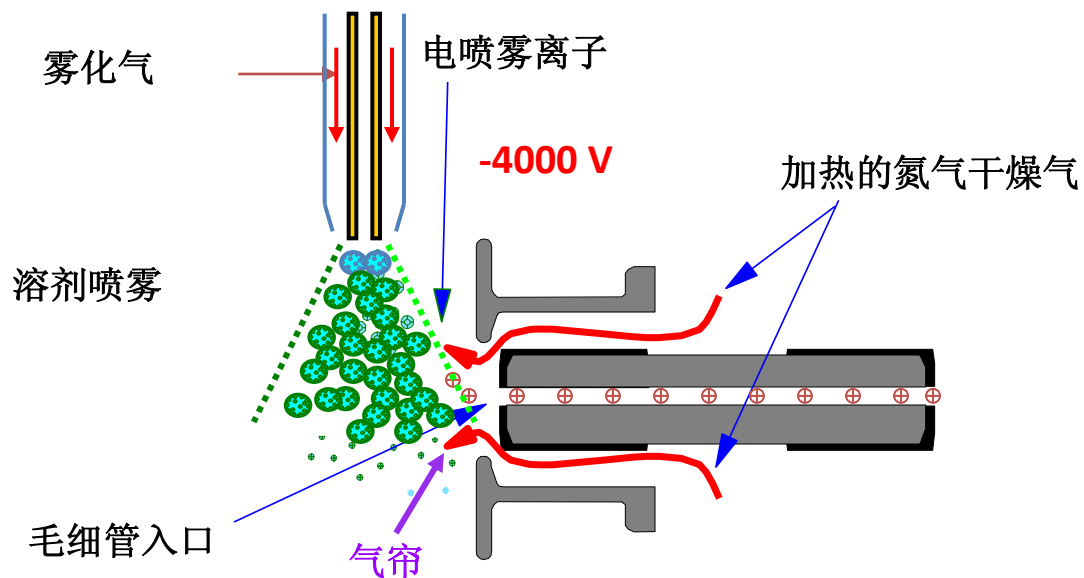
电喷雾 (ESI) : 电离过程是由电场产生带电液滴，然后通过离子蒸发生成待分析离子。雾化通常通过气动辅助。

大气压化学电离 (APCI): 气态化学电离(CI)过程。溶剂或反应气在电晕针的作用下先带电，再转移给化合物形成离子。

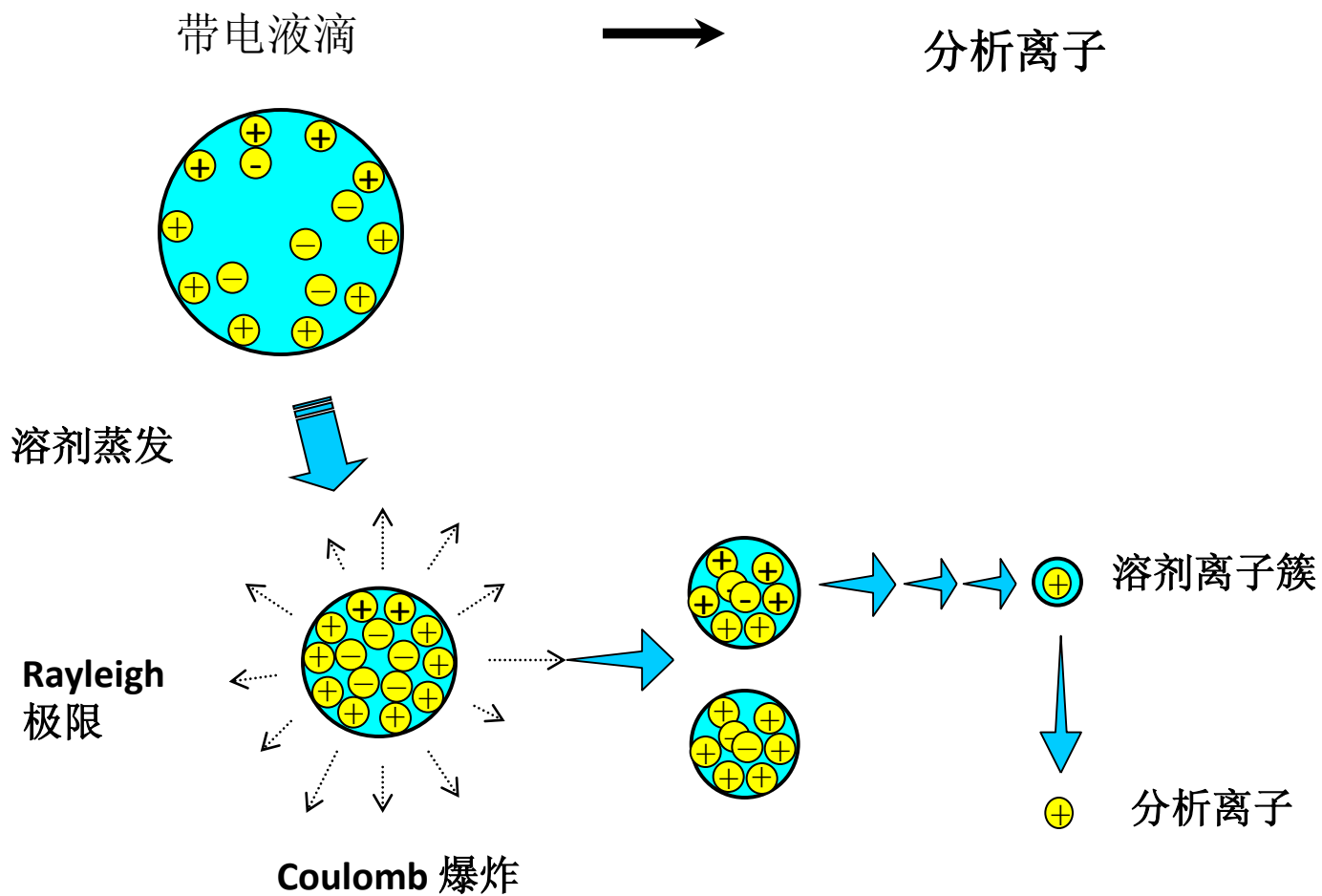


大气压电离-电喷雾电离 (API-Electrospray Ionization)

雾化器组件
(nebulizer)
是同轴套管

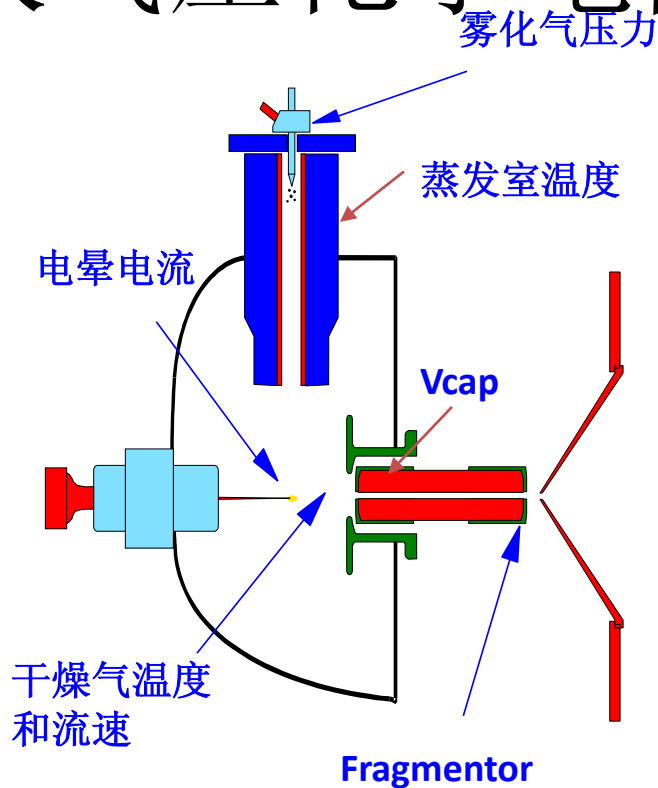


大气压电喷雾电离过程

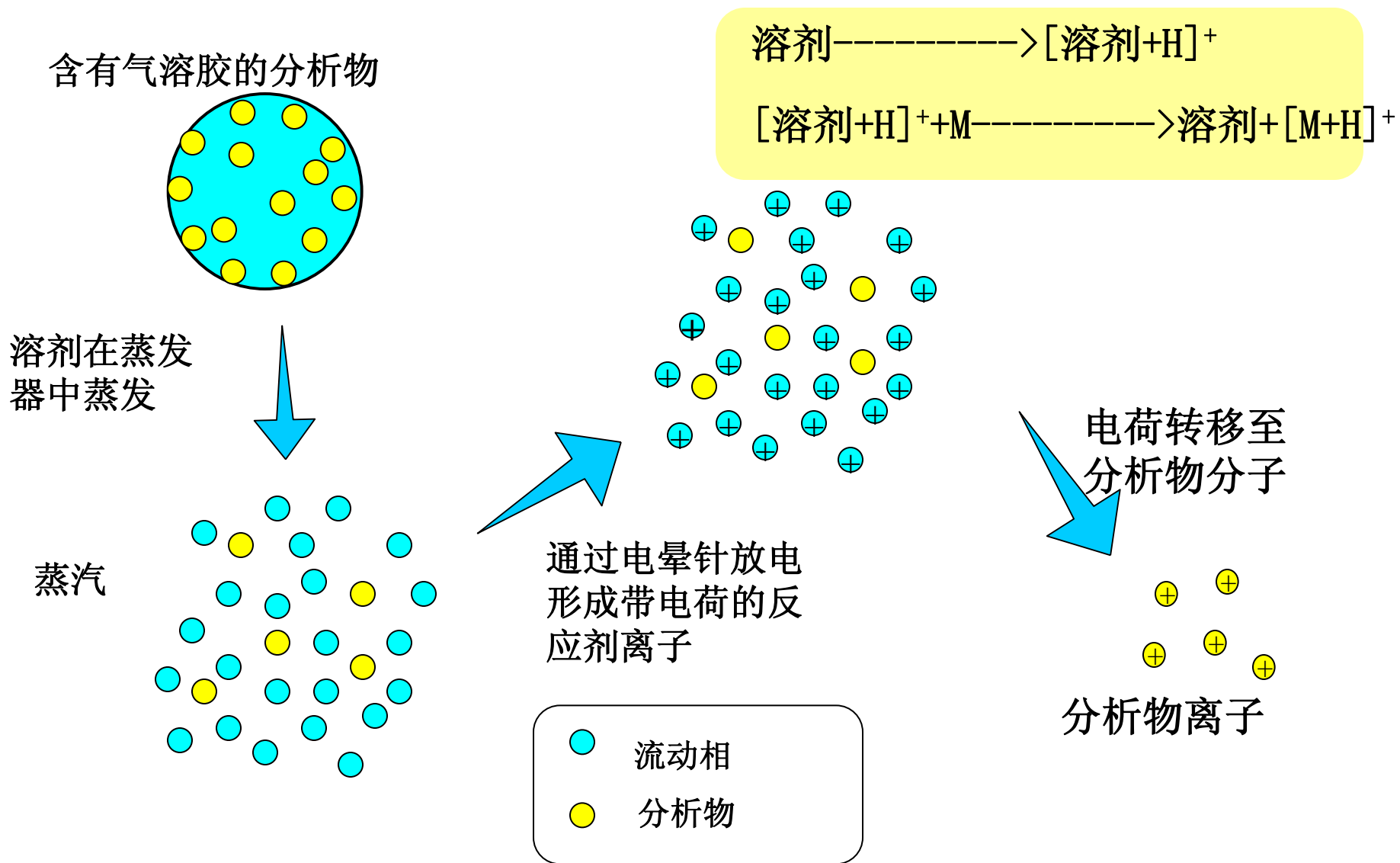


APCI 大气压化学电离

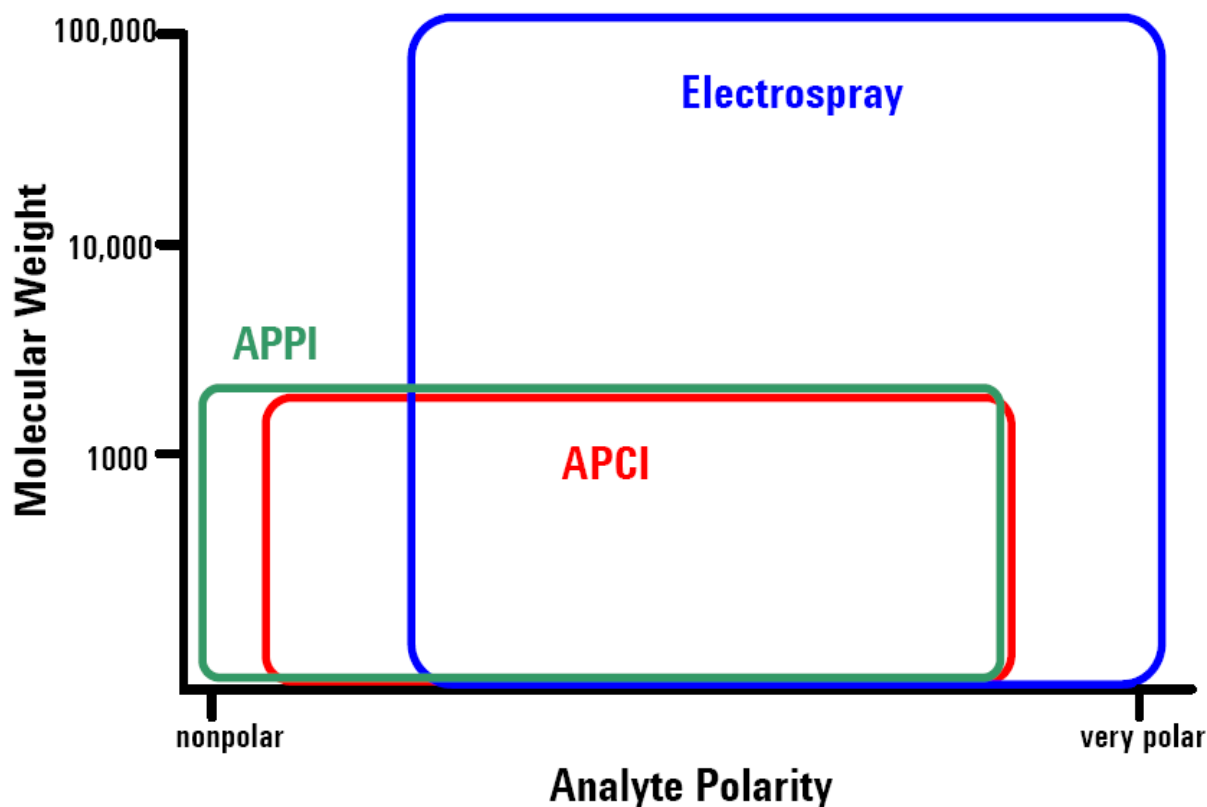
- 雾化
- 蒸发液滴
- 气相电离



APCI 电离过程



Relative Applicability of LC/MS Techniques



概要

- LC/MS/MS 技术基础



- LC/MS/MS 方法开发流程

- MH Quantitative 定量分析软件

LC/MS/MS 定量方法开发流程

- ◆ 1 电离模式的选择
- ◆ 2 MRM 参数优化 使用标准品优化 fragmentor 和 collision energy
- ◆ 3 离子源参数的优化
- ◆ 4 LC分离方法的优化

离子源的选择

ESI

- ò 离子在溶液中以已生成
- ò 化合物无需具有挥发性
- ò 是分析热不稳定化合物的首选
- ò 除了生成单电荷离子之外还可以生成多电荷离子

APCI

- J 离子在气态条件中生成
- J 化合物需具有一定的挥发性
- J 化合物必需是热稳定的
- J 只生成单电荷离子

ESI

➤ 正离子ES模式:

适合于碱性样品, amines, amides, aminoacids, antibiotics等

有杂原子, 可接受质子。如 NH_2 、N、NH、CO、COOR

酸性流动相

➤ 负离子ES模式:

适合于酸性样品, acids, hydroxyls, phosphates, sulfates; 含强负电性基团

有杂原子, 可失去质子。如 COOH 、OH

中性偏碱性流动相

➤ 可正可负:

比较灵敏度

APCI 需考虑

样品

- 分子量和极性中等的化合物：脂肪酸, 邻苯二甲酸酯类.
- 不含酸性和碱性位点的化合物（碳氢化合物、醇、醛、酮和酯）
- 含有杂原子的化合物：脲、氨基甲酸酯
- 电喷雾响应不好的样品

溶液化学参数

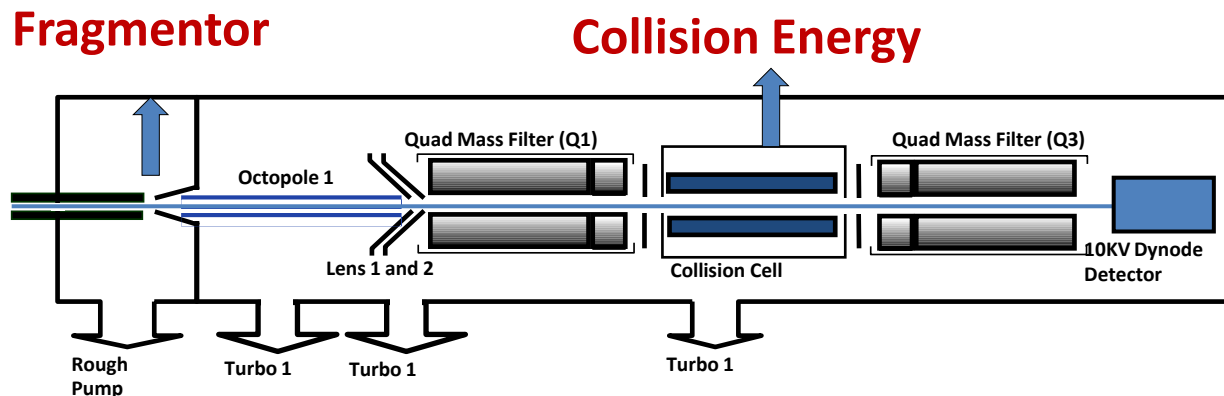
- 较ES对溶液化学作用不灵敏
- 较ES更耐大的流速
- 适用ES不宜的一些溶剂

应避免的样品

- 在气化过程中热不稳定的化合物

LC/MS/MS 定量方法开发流程

- ◆ 1 电离模式的选择
- ◆ 2 MRM 参数优化 使用标准品优化 Fragmentor 和 Collision Energy
- ◆ 3 离子源参数的优化
- ◆ 4 LC分离方法的优化



2 MRM 参数优化

- ◆ 全扫描 scan 或 SIM,

优化毛细管出口电压 (fragmentor), 保证母离子的传输效率

- ◆ 子离子扫描 Product ion scan

使用已优化好的 fragmentor, 选择定性定量离子, 优化碰撞能量 (collision energy), 得到/优化子离子的响应

- ◆ 多反应监测 MRM 定量, 使用已优化好的 fragmentor 和 collision energy, 优化 Dwell time

MS2 Scan 优化 Fragmentor

Sample | Properties | h-ALS-SL | BinPump-SL | Column-SL | VWD-SL | **MS QQQ**

Tune file: atunes.tune.xml [Browse ...]

Stop time: ☒ No limit/As Pump ☐ 1 min

Ion source: ESI ☒ Agilent Jet Stream

Time filtering: ☒ Peak width 0.07 min

Time segments:

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	MS2 Scan	To MS	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

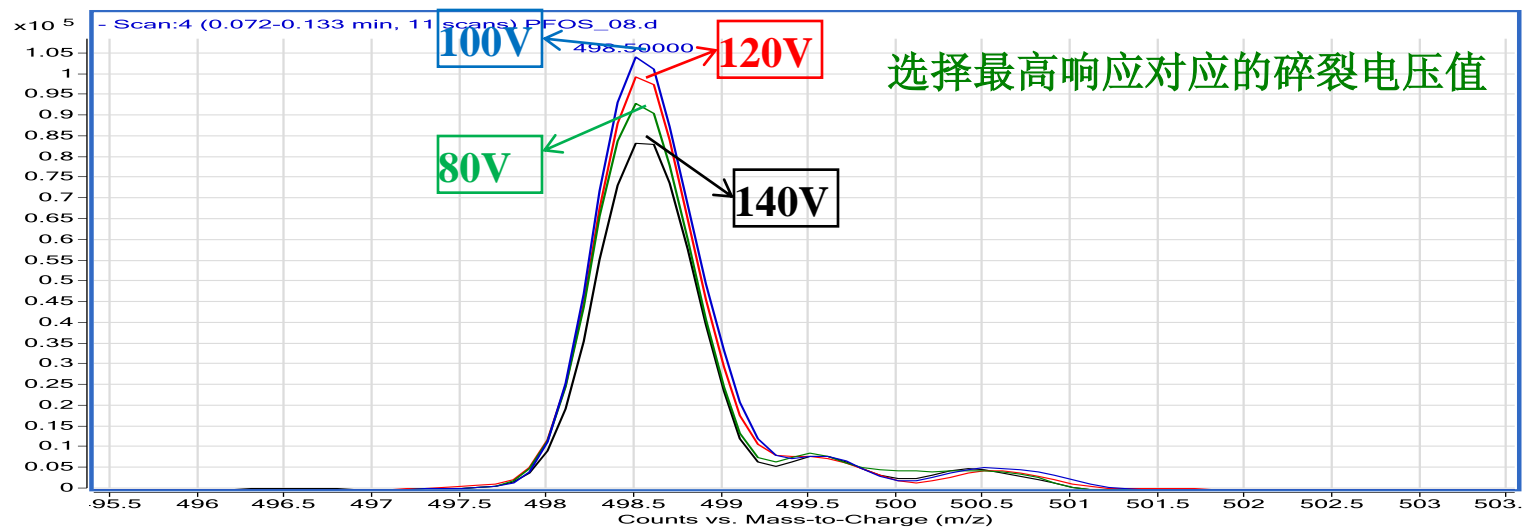
Scan segments:

Segment Name	Start Mass	End Mass	Scan Time	Fragmentor	Polarity
	100	600	200	80	Positive
	100	600	200	100	Positive
	100	600	200	120	Positive
	100	600	200	140	Positive

Scan parameters:

Step size: 0.1 amu

Data storage: Profile



Product ion Scan

选择子离子并优化 Collision Energy

Sample | Properties | h-ALS-SL | BinPump-SL | Column-SL | VWD-SL | **MS QQQ**

Tune file: atunes.tune.xml [Browse ...]

Stop time: ☒ No limit/As Pump ☐ 1 min

Ion source: ESI ☒ Agilent Jet Stream

Time segments:

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	Product Ion	To MS	0	0	<input checked="" type="checkbox"/>

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

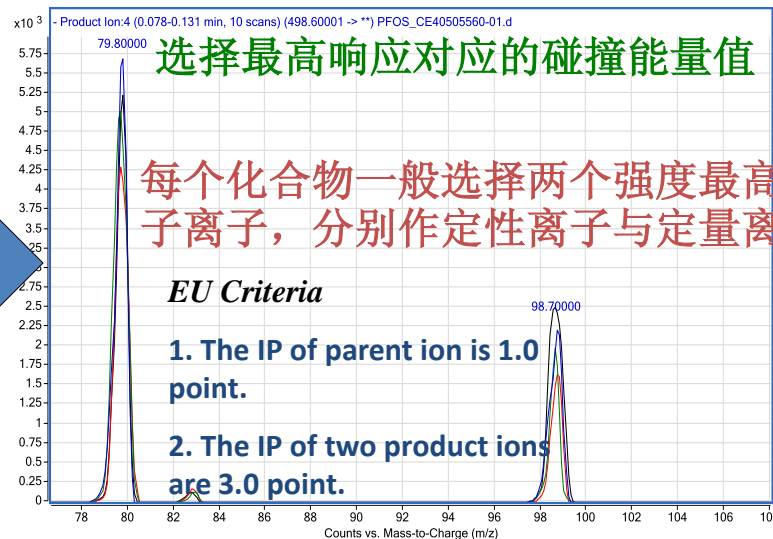
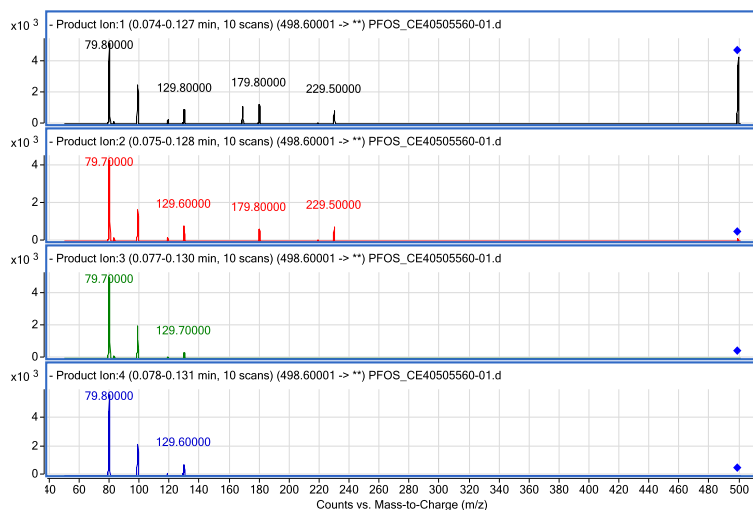
Scan segments:

Segment Name	Precursor Ion	MS2 From	MS2 To	Scan Time	Fragmentor	Collision Energy	Polarity
	498.6	50	500	200	100	5	Positive
	498.6	50	500	200	100	10	Positive
	498.6	50	500	200	100	15	Positive
	498.6	50	500	200	100	20	Positive

Scan parameters:

Step size: 0.1 amu

Data storage: Profile



MRM –Dwell time（驻留时间） 优化

Sample | Properties | h-ALS-SL | BinPump-SL | Column-SL | VWD-SL | **MS QQQ**

Tune file: atunes.tune.xml [Browse ...] [6d]

Stop time: ☒ No limit/As Pump ☐ min

Ion source: ESI ☒ Agilent Jet Stream

Time filtering: ☒ Peak width 0.07 min

Time segments

#	Start Time	Scan Type	Div Valve	Delta EMV (+)	Delta EMV (-)	Stored
1	0	MRM	To MS	0	0	<input type="checkbox"/>

2.34 cycles/s 428.0 ms/cycle

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

Scan segments

Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Polarity
D	<input type="checkbox"/>	413	Unit	369	Unit	50	90	5	Negative
D	<input type="checkbox"/>	413	Unit	169	Unit	50	90	15	Negative
C	<input type="checkbox"/>	363	Unit	319	Unit	50	80	5	Negative
C	<input type="checkbox"/>	363	Unit	169	Unit	50	80	10	Negative
A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	269	Unit	50	70	3	Negative
A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	119	Unit	50	70	15	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	99	Unit	50	120	30	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	80	Unit	50	120	40	Negative

影响灵敏度、重现性

决定色谱峰的数据点数

MRM –Dwell time 优化

Sample | Properties | h-ALS-SL | BinPump-SL | Column-SL | VWD-SL | **MS QQQ**

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

Scan segments

Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Polarity
▶ A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	269	Unit	100	70	3	Negative
A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	119	Unit	100	70	15	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	99	Unit	100	120	30	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	80	Unit	100	120	40	Negative

◆ 设置 Time segment

2.42 cycles/s 414.0 ms/cycle

Sample | Properties | h-ALS-SL | BinPump-SL | Column-SL | VWD-SL | **MS QQQ**

Acquisition | Source | Chromatogram | Instrument | Diagnostics

Scan segments

Compound Name	ISTD?	Precursor Ion	MS1 Res	Product Ion	MS2 Res	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Polarity
A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	269	Unit	150	70	3	Negative
▶ A	<input type="checkbox"/>	313	Unit	119	Unit	80	70	15	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	99	Unit	150	120	30	Negative
B	<input type="checkbox"/>	299	Unit	80	Unit	80	120	40	Negative

◆ 定量离子分配更长的 Dwell time

2.11 cycles/s 474.0 ms/cycle

LC/MS/MS 定量方法开发流程

- ◆ 1 电离模式的选择
- ◆ 2 MRM 参数优化 使用标准品优化 fragmentor 和collision energy
- ◆ 3 离子源参数的优化
- ◆ 4 LC分离方法的优化

3 离子源参数的优化-电喷雾喷雾室参数设置

ESI Source

Source parameters

Gas Temp: 300 °C

Gas Flow: 3 l/min

Nebulizer: 15 psi

Chamber Current: 0.15 µA

Positive: 4000 V

Negative: 4000 V

7 nA

Copy

Paste

Paste to All Segments

雾化气压力和干燥气流速 参数设置

(建议HPLC 流速 <500 µL/min)

Flow Rate	Gas Flow	Nebulizer
≤ 0.2mL/min,	7-9 L/min	30-40 psi
0.3mL/min ~ 0.4mL/min,	9-11 L/min	45-55 psi
≥ 0.5mL/min,	10-13 L/min	50-60 psi

- 含水高需更高的流速
- 如果太低：液滴会导致谱图中的尖峰；MRM背景变高

干燥气温度

300 - 350°C

ESI源参数与液相流速和流动相水相的比例相关

	Positive	Negative
Capillary	1500-5500	1500-4000
Nozzle Voltage	0-500	1000-2000

Source parameters

Gas Temp: 325 °C

Gas Flow: 6 l/min

Nebulizer: 45 psi

Chamber Current: 0.18004 µA

Sheath Gas Temp: 350 °C

Sheath Gas Flow: 12 l/min

Positive: 3500 V

Negative: 3000 V

7.81440 nA

Nozzle Voltage: 0 V

0 V

Copy

Paste

Paste to All Segments

MS QQQ- 离子源参数

HPLC 流速 >500 $\mu\text{L}/\text{min}$

APCI Source

Acquisition	Source	Chromatogram	Instrument	Diagnostics
Source parameters				
Gas Temp:	300	300	$^{\circ}\text{C}$	
Vaporizer:	350		$^{\circ}\text{C}$	
Gas Flow:	5	6.99482	l/min	
Nebulizer:	30	19.9908	psi	
Capillary:	3500	V	4.88400	nA
Corona Current:	4		μA	
Chamber Current:		0.10002	μA	

雾化气压力

60 psig

干燥气温度

start with 350°C

干燥气流速

4 L/min

气化温度

一般 350°C

毛细管电压

需调节 (2000-6000V)

开始 3500 V

电晕电流

开始 20 μA (neg) 或 4 μA (pos)

LC/MS/MS 定量方法开发流程

- ◆ 1 电离模式的选择
- ◆ 2 MRM 参数优化 使用标准品优化 Fragmentor 和Collision energy
- ◆ 3 离子源参数的优化
- ◆ 4 LC分离方法的优化

LC分离方法的建立

ESI

- ò 色谱柱内径建议用2.1mm或3.0mm
- ò 建议用1.8 μm 或3.5 μm （小颗粒填料的柱子具有增加分辨率和灵敏度的优点）
- ò 反相流动相
- ò 建议低 LC 流速

APCI

- ò 色谱柱内径 4.6, 3.0, 2.1 mm
- ò 建议用4.6mm
- ò 反相和正相流动相
- ò 建议高 LC 流速

◆API-MS常用添加剂

降低pH值:

乙酸(pH3-4) , 甲酸(pH2-3) , 甲酸铵(pH5-6) , 乙酸铵(pH6-7)

升高pH值:

氢氧化铵(pH8.2-10.2)

不能使用在HPLC中常使用的磷酸盐, 硫酸盐或硼酸盐 (严重干扰离子化过程并使质谱污染) !

◆将现有的 LC方法改编为 LC/API-MS方法

- 非挥发性的 酸/碱/缓冲盐 **改为** 挥发性的 酸/碱/缓冲盐
- 浓度 <10 mM (对于 ES)或<100 mM (对于 APCI)

流动相的考虑

- 金属离子缓冲盐影响离子化
- 表面活性剂影响去溶剂化过程
- 离子对试剂可以离子化，而导致高背景噪音
- 强离子对试剂可与待测物反应，导致待测物不能离子化
- 某些流动相添加剂可造成持续的高背景噪音

TEA 干扰正离子模式(m/z 102)

TFA 扰负离子模式(m/z 113)

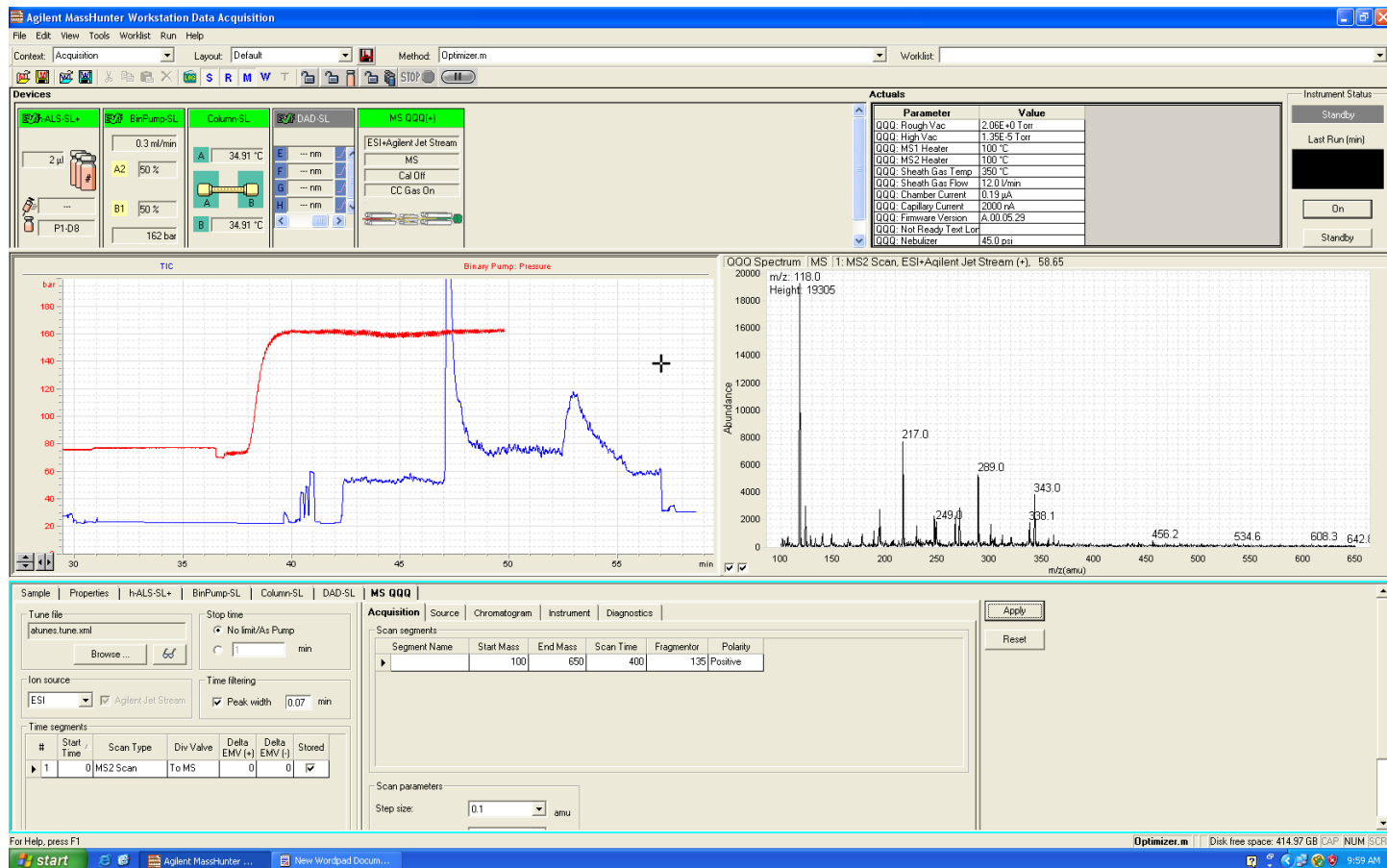
- 增塑剂（邻苯二甲酸酯）背景干扰，(m/z 149,315, 391)

如何判断LCMS系统

通常在Scan模式下:

❖ Positive Mode ≤ 50000 ;

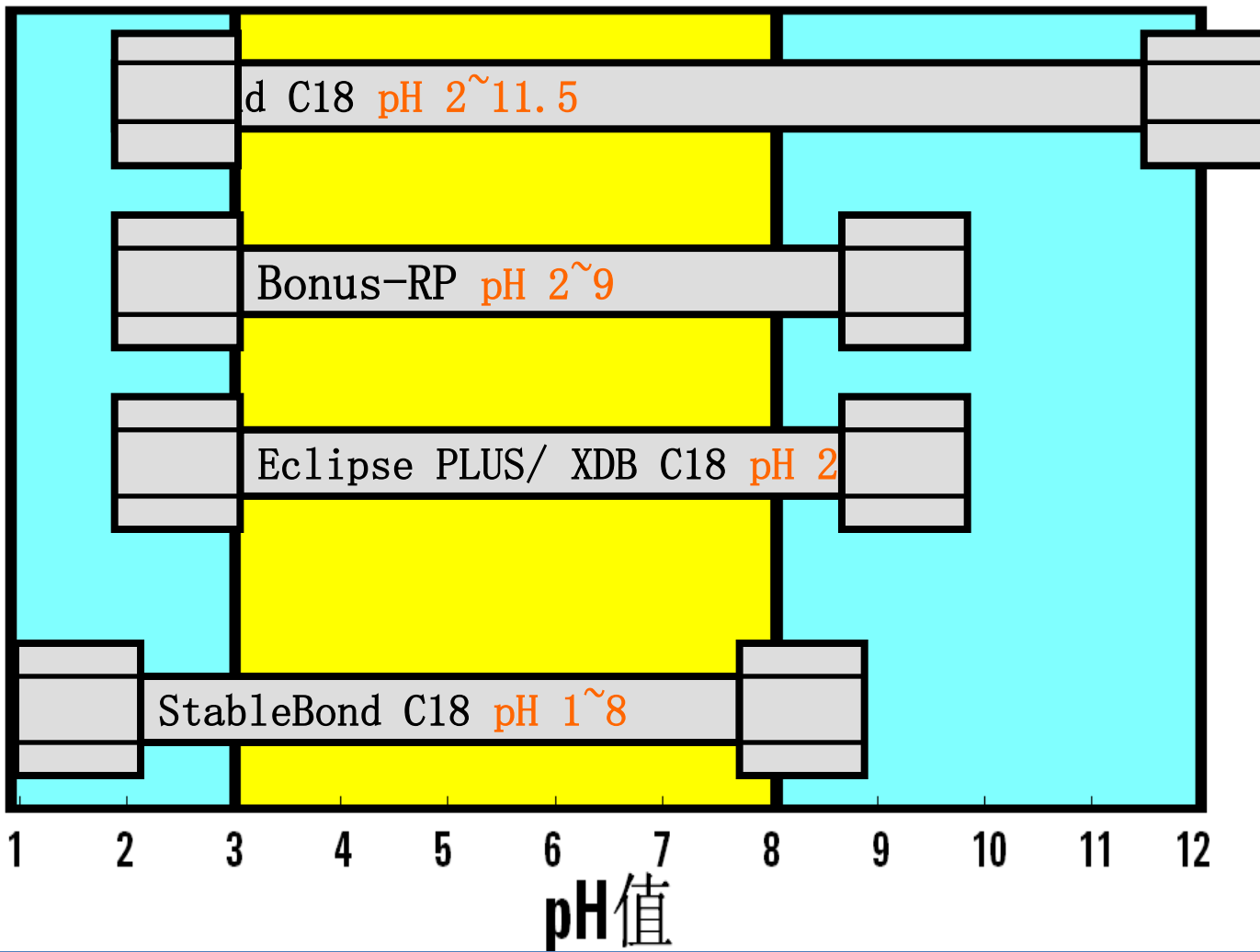
❖ Negative Mode ≤ 10000



色谱柱 ZORBAX主要反相键合相

系列	StableBond	Eclipse Plus	Eclipse XDB	Extend	Bonus-RP
键合相	C18, C8, C3, Phenyl, CN, AQ	C18, C8, PAH, phenyl-hexyl	C18, C8, Phenyl, CN	C18	C18
粒径	1.8, 3.5, 5, 7 μ m	1.8, 3.5, 5 μ m	1.8, 3.5, 5, 7 μ m	1.8, 3.5, 5 μ m	3.5, 5, 7 μ m
内径	毛细管柱, 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 9.4, 21.2mm	2.1, 3.0, 4.6mm	1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 9.4, 21.2mm	毛细管柱, 1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2mm	1.0, 2.1, 3.0, 4.6, 21.2mm
柱长	20, 30, 50, 75, 100, 150, 250mm	30, 50, 75, 100, 150, 250mm	20, 30, 50, 75, 100, 150, 250mm	30, 50, 100, 150, 250mm	30, 50, 75, 100, 150, 250mm
耐受pH范围	1~8	2~9	2~9	2~11.5	2~9
特点	低pH流动相极其优异的稳定性；丰富的键合相选择	方法开发首选柱，对于碱性化合物峰形优异	方法开发首选柱，对于碱性化合物峰形优异	高pH流动相优异的稳定性	独特的选择性；高水相分离碱性化合物

液相柱---pH选择策略



对于一个已知方法，选择色谱柱的首要思路应先从色谱条件尤其是流动相的pH值入手，考虑色谱柱所能耐受的流动相范围及柱温，这是保证方法稳定的基础和关键。

Zorbax反相色谱柱选择的建议

General guidance on choosing a column based on sample type

较强极性	极性	中等极性	弱极性
SB-Aq Bonus-RP SB-C8 Eclipse XDB-Phenyl	Eclipse Plus/XDB-C8/C18 Eclipse XDB-CN Eclipse XDB-Phenyl SB-C3	Eclipse Plus/ XDB-C18 Eclipse Plus/ XDB-C8 Eclipse XDB-CN Eclipse XDB-Phenyl SB - all	Eclipse Plus XDB-C8 Eclipse Plus/ XDB-C18 Eclipse XDB-CN SB-C8 SB-C18

Other columns will work in some cases and could provide a better separation, depending on the actual analytes and excipients present in the sample.

结论：色谱柱的键合相选择，主要从色谱柱的耐受性出发。而对于化合物选择性，流动相和色谱柱键合相不同，都会产生差异。

方法开发的起始步骤

STEP 1

- 选择 **Eclipse Plus C18**
- 低 pH
- 调节 %ACN for $0.5 < k < 20$

峰间隔问题

STEP 2

改变 有机相比例

峰间隔问题

STEP 3

- 改变有机相
- 调速有机相比例以使 $0.5 < k < 20$

峰间隔问题

STEP 4

- 改变键合相
- **Eclipse Plus C8, SB-C18, CN, Phenyl**, 其它的反相键合相

➤选择一根性能优越的 **C18**或 **C8**键合相作为方法开发的起始，这个键合相对应酸性、碱性及中性化合物都可以提供好的峰形和保留。

➤优化流动相中有机相的组成以改变其选择性。

➤方法开发通常从pH3.0开始尝试

➤如果样品中的某些化合物酸性较强，需要将流动相的pH调节在1-2时，请选择 **SB-C18**

➤色谱是经验科学，选择性的优化，只能通过不同的键合相来尝试实现。