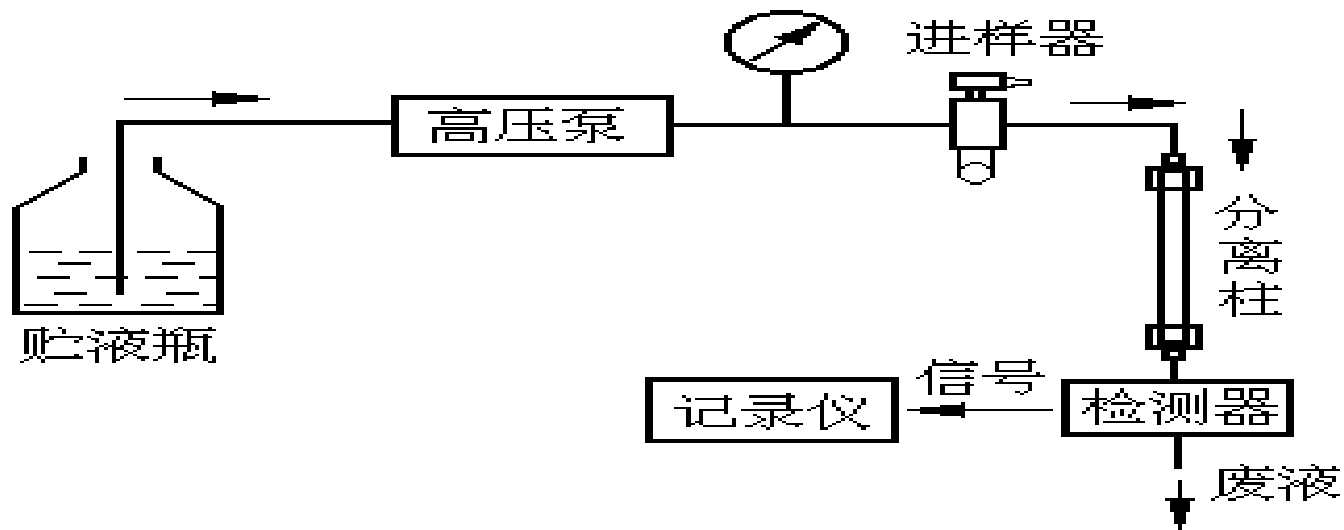


# 液相色谱-质谱类仪器 原理与实际操作

# 第一章

## 液相色谱仪的结构和原理



输液  
系统



进样  
系统



分离  
系统



检测  
系统



记录  
系统

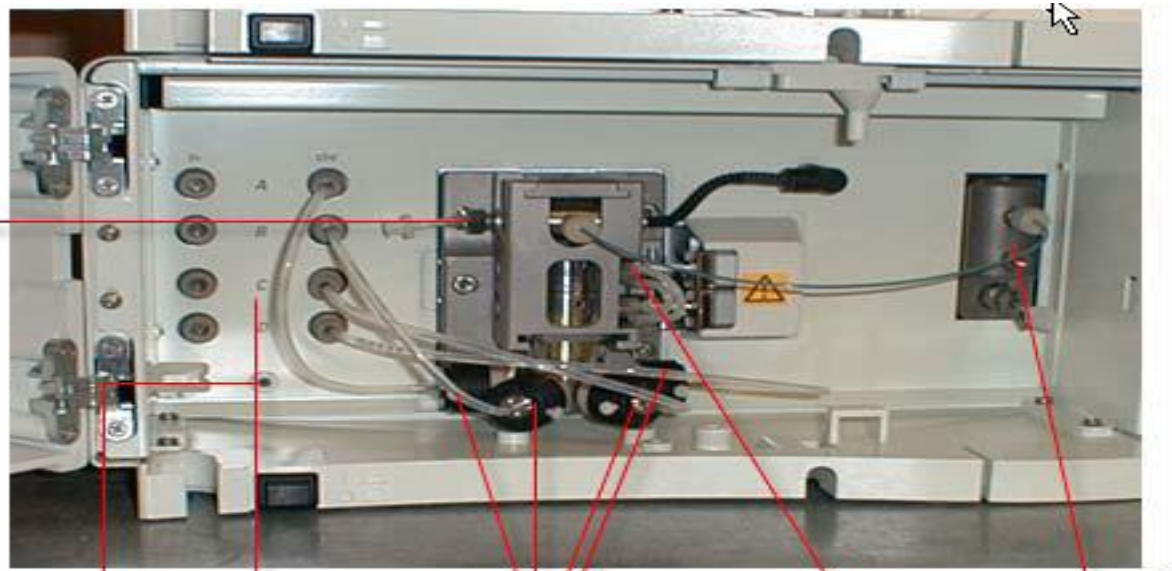
高压、高速是高效液相色谱的特点之一。

# 1、输液系统：

- (1) 贮液系统（离线脱气、在线真空脱气）
- (2) 高压泵：将流动相在高压下连续输送入色谱柱，使样品在色谱柱内完成分离过程。
- (3) 输液系统辅助设备：管道过滤器（在线过滤器）、脉动阻尼器、压力传感器、显示装置、流动相流量测定装置等。
- (4) 等度/梯度洗脱：提高分离效果。



排液阀



脱气机  
排气口

真空脱气机

比例阀

泵头

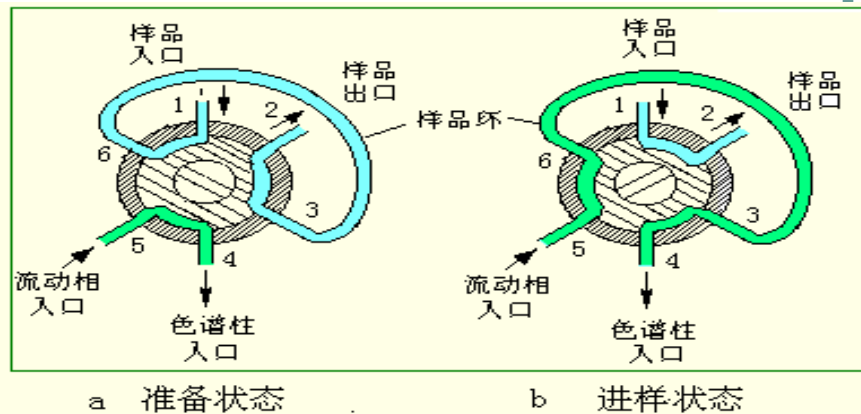
阻尼器

## 2. 进样系统:

### ◆六通阀为常用的进样方式

**作用：**将分析样品定量的输送入高压色谱系统内。

**要求：**重复性好、死体积小，便于实现自动化。



### 3. 分离系统:

组成: 色谱柱和柱温箱

正相: 极性色谱柱-非极性流动相

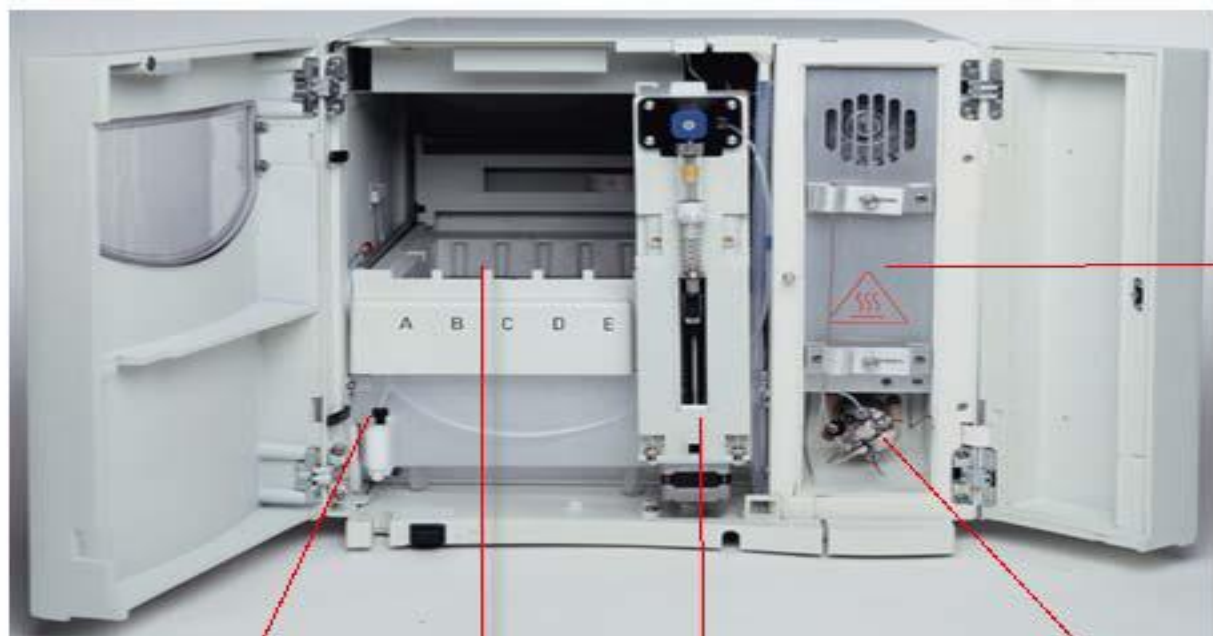
反相: 非极性色谱柱-极性流动相

填料:  $C_{18}$ 、 $C_8$ 、 $CN-$ 、 $NH_2-$ 、阳离子交换、阴离子交换等

柱填料粒径:  $2\mu m$ 、 $3\mu m$ 、 $5\mu m$

柱规格:  $2.1 \times 150mm$ 、 $2.1 \times 100mm$ 、

$4.6 \times 150mm$ 、 $4.6 \times 250mm$ 、 $3.5 \times 150mm$  等



洗针废液出口

样品室

注射器驱动总成

六通阀

控温箱

## 4. 检测系统

紫外检测器

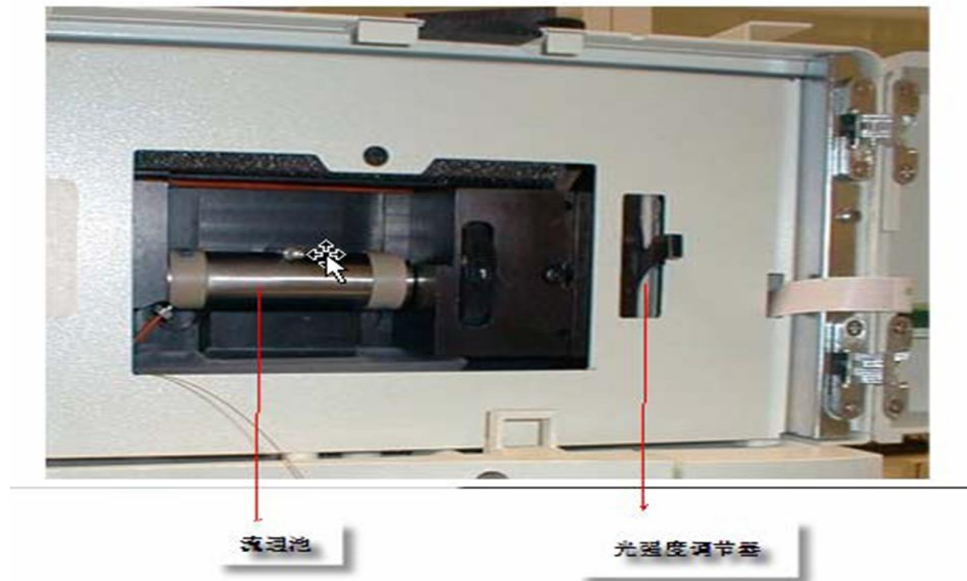
二极管阵列检测器

荧光检测器

示差检测器

蒸发光检测器

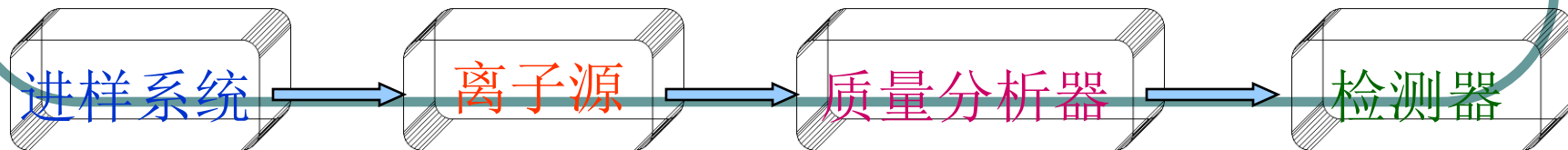
质谱检测器



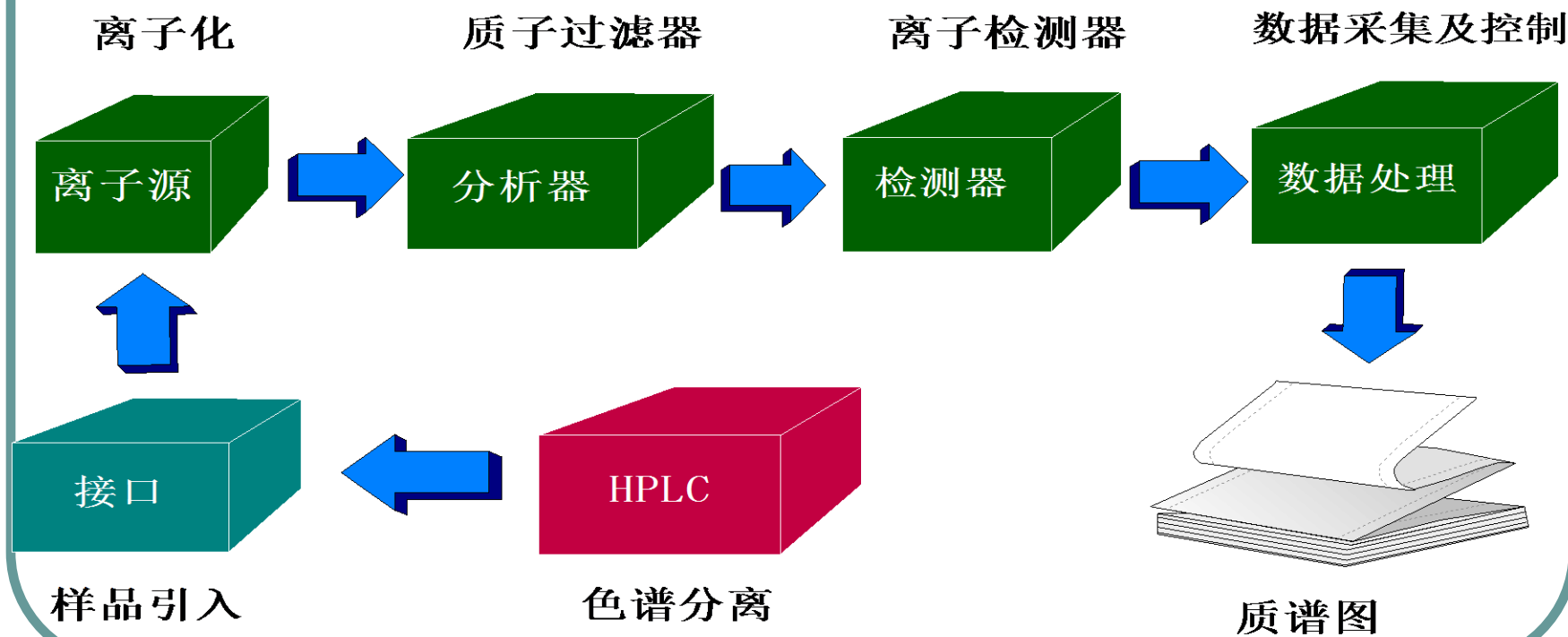
# 液质联用仪

液质联用仪的操作主要通过四个基本功能来实施。

- (1) 使化合物进行有效分离；
- (2) 使分子离子化，它通过在离子源中进行电子电离、快速原子/离子轰击、基体辅助激动解吸或电喷雾来实现；
- (3) 带电分子的离子及其碎片根据质荷比分离；
- (4) 分离的带电荷的离子通过检测器检测。



# LC-MS组成



# 质谱真空系统1

- 质谱仪的离子源、质量分析器和检测器必须在**高真空**状态下工作。
- **实现：**由机械真空泵(前极低真空)，扩散泵或分子泵(高真空泵)组成真空机组，抽取离子源和质量分析器部分的真空。



# 质谱真空系统2

质谱仪在高真空条件下工作是为了 ...

- 尽量减少离子-分子之间的碰撞
  - 碰撞可能导致离子偏离所期望的轨迹 (例如由离子源到四极杆检测器)
  - 碰撞可能导致产生意外的离子或带来副反应
- 防止在高电压 (用于某些离子聚焦) 下生成电弧
- 减少污染/化学噪音

利用这个特点, 用液质联用的软电离方式可以得到化合物的准分子离子, 从而得到分子量。

# LC/MS联用关键技术—接口

- 液相色谱的出口: 从液相色谱流出的组分在大气压条件下的溶液状态
- 质谱的入口: 在高真空工作条件下的质谱仪接受气相离子
- 液质联用的接口必须完成三个转变:
  - 物态转变: 液态 - 气态
  - 带电状态: “中性” - 带电离子
  - 真空变化: 低真空 - 高真空
- 要求: 雾化, 去溶剂和电离同时完成

# 电离技术

- 电喷雾电离
  - Electrospray Ionization – ESI
- 大气压化学电离
  - Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI

# 电喷雾(ESI) 离子化过程

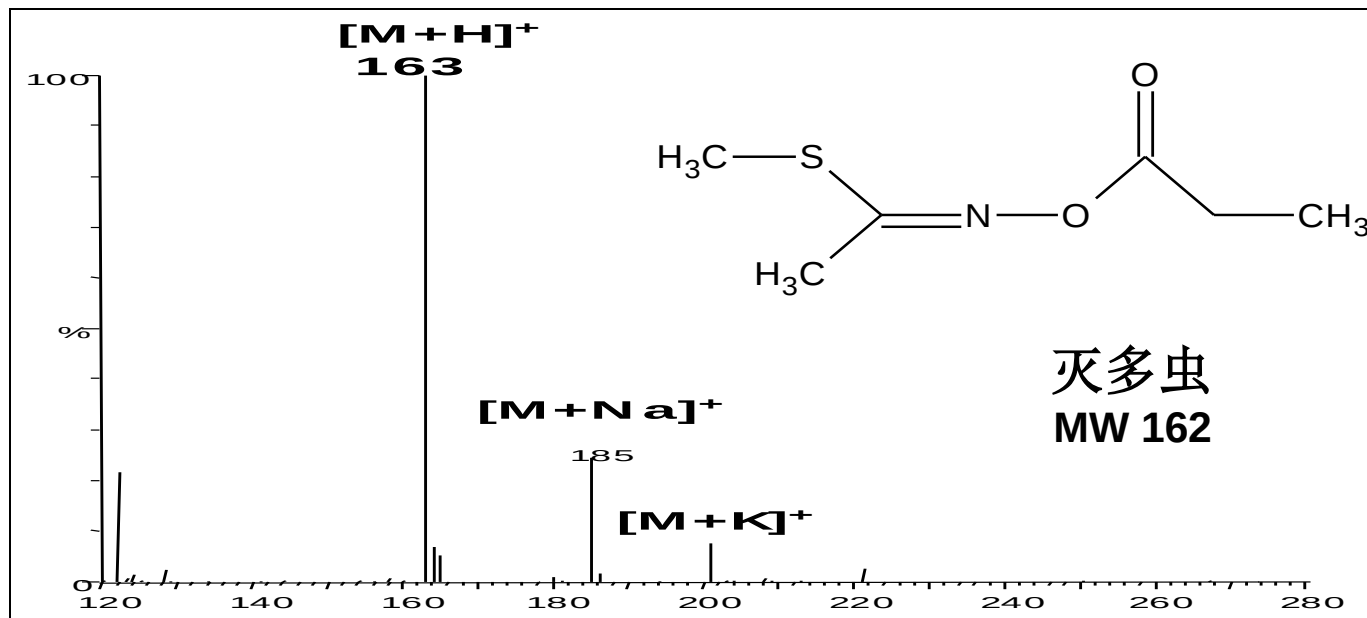
- 电喷雾离子化可分为三个过程:
  - 形成带电小液滴
  - 溶剂蒸发和小液滴碎裂
  - 最终形成气相离子

# ESI的特点

- 低分子量化合物一般产生单电荷离子(失去或得到一个质子)
- 高分子量生物大分子和聚合物产生多电荷离子
- 几乎没有碎片离子
- 可能生成加合物和/或多聚体
  - 常见的是溶剂加合物和 $\text{NH}_4^+(\text{M}+18)$ ,  $\text{Na}^+(\text{M}+23)$ , 和 $\text{K}^+(\text{M}+39)$  加合物
- 灵敏度取决于化合物本身和基质

# ESI+ 电离模式

产生  $[M+H]^+$  准分子离子峰



# 大气压化学电离 (APCI)过程

- 大气压化学电离可分为以下两个步骤：
  - 快速蒸发
  - 气相化学电离(电晕放电)

# APCI的特点

- 一般而言，只生成单电荷离子
- 几乎没有碎片离子
- 可能生成加合物和/或多聚体；一般是溶剂加合物及 $\text{NH}_4^+$  ( $M+18$ ),  $\text{Na}^+$  ( $M+23$ ), 和  $\text{K}^+$  ( $M+39$ ) 加合物
- 基质影响较小（相对于ESI），质谱图不受缓冲盐及其缓冲力变化的影响

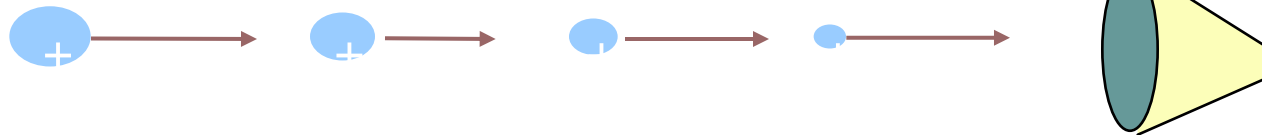


# 质量分析器:

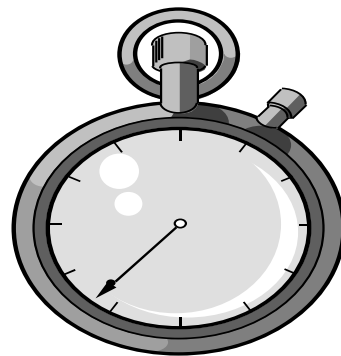
- 是质谱仪中将离子按质荷比分开的部分, 离子通过分析器后, 按不同质荷比 ( $M/Z$ ) 分开, 将相同的  $M/Z$  离子聚焦在一起, 组成质谱。

# A. 飞行时间质谱

离子源

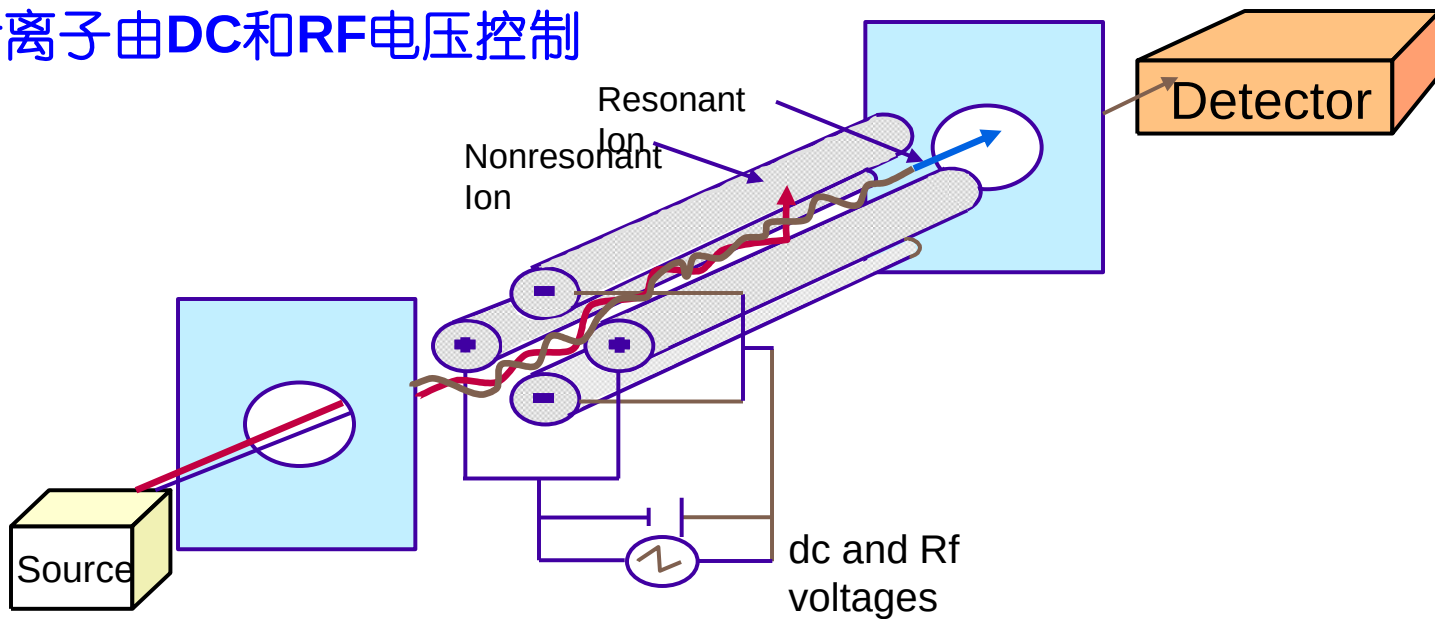


- 所有离子一同起跑
- 质量小的跑得快
- 时间分辨



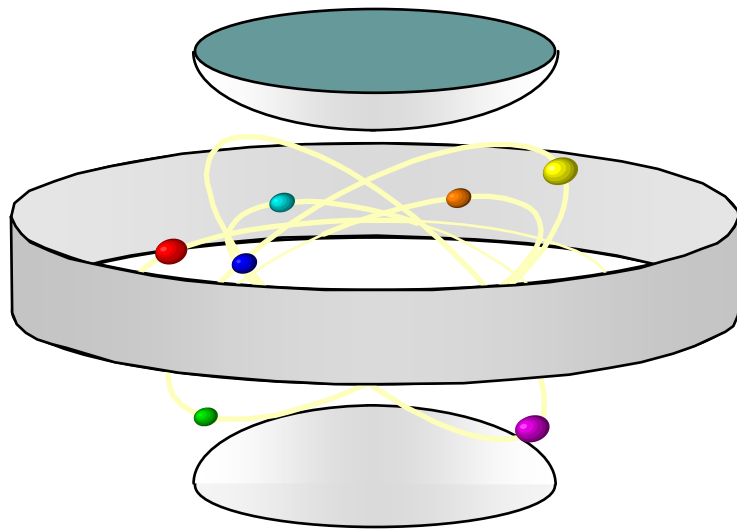
## B. 四极杆质量分析器

被分析离子由**DC**和**RF**电压控制



## C. 离子阱

- 原理与四极杆类似
- 离子被 RF & DC 电场所储存
- 扫描电场可以释放特定的 $m/z$ 离子



# 质量分析器特性

| 分析器  | m/z范围  | 分辨率             | 质量精度       | 动态范围   | 真空        |
|------|--------|-----------------|------------|--------|-----------|
| 四极杆  | $10^3$ | $10^3$          | 0.1%       | $10^5$ | $10^{-5}$ |
| 离子阱  | $10^3$ | $10^3$ - $10^4$ | 0.1%       | $10^4$ | $10^{-3}$ |
| 飞行时间 | $10^6$ | $10^3$ - $10^4$ | 0.1-0.01 % | $10^4$ | $10^{-6}$ |

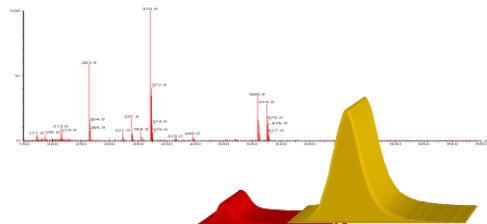
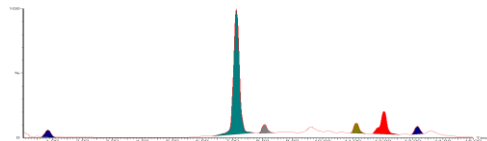
# 检测接收器：

- 接收离子束流的装置，有：电子倍增器、光电倍增器、微通道板等。
- 将接收来的电信号放大、处理并给出分析结果及控制质谱仪各部分工作。

# LC/MS特点

## ● MS的特点

- 灵敏度高
- 定性/定量本领高
- 脉冲扫描采集数据
- 高真空环境工作



# LC/MS与GC/MS的区别

- 气质联用仪 (GC-MS)：最早商品化  
适宜分析小分子、易挥发、热稳定、能气化的化合物；  
用EI得到谱图，标准谱库对比。
- 液质联用 (LC-MS)：不挥发性化合物分析测定；  
极性化合物的分析测定；  
热不稳定化合物的分析测定；  
大分子量化合物的分析测定；  
无商品化的谱库，只能自己建库或自己解析谱图。



# 常见术语:

- **质荷比**: 离子质量(以相对原子量单位计)与它所带电荷(以电子电量为单位计)的比值, 写作 $m/Z$ .
- **峰**: 质谱图中的离子信号通常称为离子峰或简称峰.
- **离子丰度**: 检测器检测到的离子信号强度.
- **基峰**: 在质谱图中, 指定质荷比范围内强度最大的离子峰称作基峰.
- **总离子流图**: 质量色谱图; 准分子离子; 碎片离子; 多电荷离子; 同位素离子;

## 总离子流图:

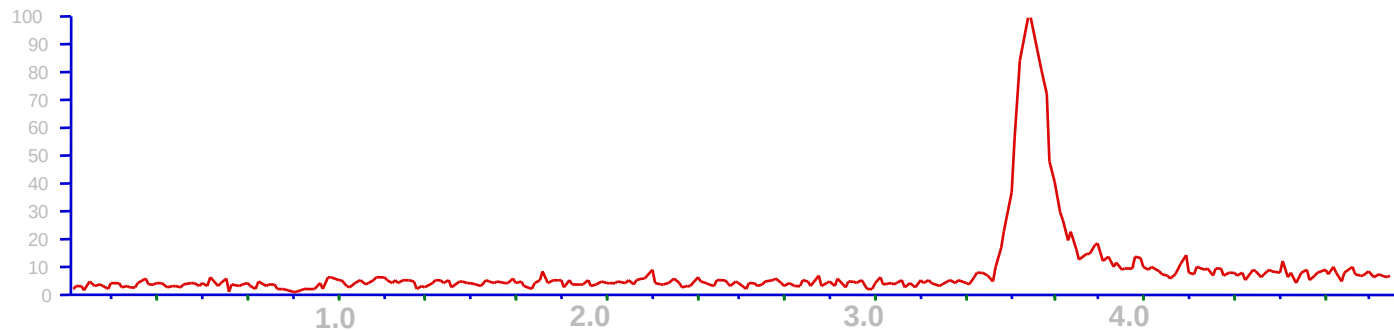
- 在选定的质量范围内，所有离子强度的总和  
对时间或扫描次数所作的图, 也称TIC图.

# 质量色谱图

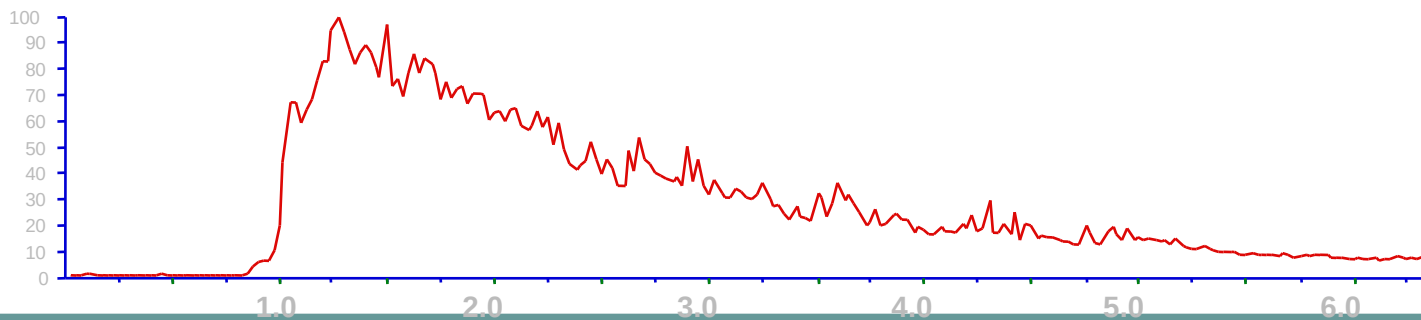
- 指定某一质量(或质荷比)的离子其强度对时间所作的图。
- 利用质量色谱图来确定特征离子，在复杂混合物分析及痕量分析时是LC/MS测定中最有用的方式。
- 当样品浓度很低时LC/MS的TIC上往往看不到峰，此时，根据得到的分子量信息，输入M+1或M+23等数值，观察提取离子的质量色谱图，检验直接进样得到的信息是否在LC/MS上都能反映出来，确定LC条件是否合适，以后进行SIM等其他扫描方式的测定时可作为参考。

# 质量色谱图

质量色谱图



总离子流图



# 准分子离子

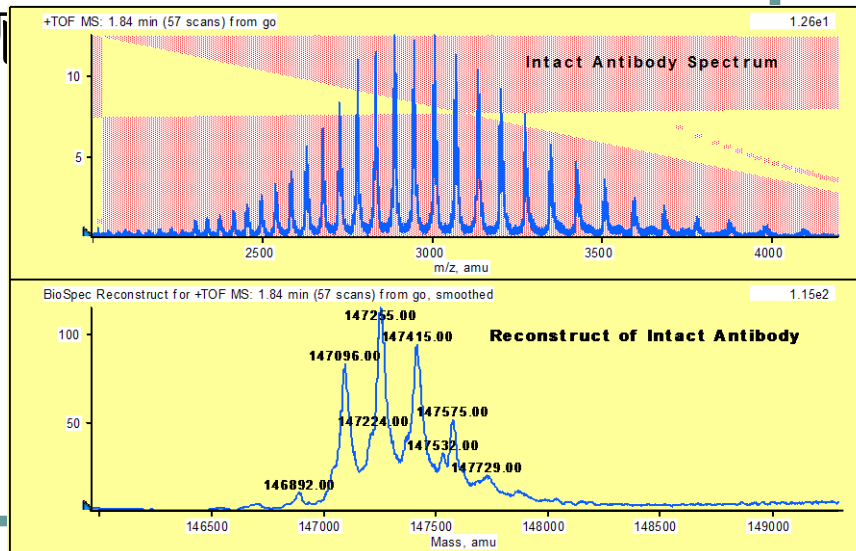
- 指与分子存在简单关系的离子，通过它可以确定分子量.液质中最常见的准分子离子峰是 $[M+H]^+$  或 $[M-H]^-$  。
- 在**ESI**中, 往往生成质量大于分子量的离子如 **$M+1, M+23, M+39, M+18$** .....称准分子离子,表示为: **$[M+H]^+, [M+Na]^+$** 等。

# 碎片离子

- 准分子离子经过一级或多级裂解生成的产物离子。
- 碎片峰的数目及其丰度则与分子结构有关,数目多表示该分子较容易断裂,丰度高的碎片峰表示该离子较稳定,也表示分子比较容易断裂生成该离子。

# 多电荷离子

指带有2个或更多电荷的离子, 常见于蛋白质或多肽等离子。有机质谱中, 单电荷离子是绝大多数, 只有那些不容易碎裂的基团或分子结构-如共轭荷离子。它的存在说明样品是较稳定的。采用电喷雾的离子化技术, 可产生带很多电荷的离子, 最后经计算机自动换算成单质/荷比离子。



## 第二章

# 液质联用仪的操作和要求



# 1. 接口的选择

- **ESI**适合于中等极性到强极性的化合物分子，特别是在溶液中能预先形成离子的化合物和可以获得多个质子的大分子（如蛋白质）。
- **APCI**不适合可带多个电荷的大分子，其优势在于弱极性或中等极性的小分子的分析。

## 2.正、负离子模式的选择

选择的一般原则为：

- 正离子模式：适合于碱性样品，可用乙酸或甲酸对样品加以酸化。样品中含有仲氨或叔氨时可优先考虑使用正离子模式。
- 负离子模式：适合于酸性样品，可用氨水或三乙胺对样品进行碱化。样品中含有较多的强负电性基团，如含氯、含溴和多个羟基时可尝试使用负离子模式。

### 3.流动相的选择

- 常用的流动相为甲醇、乙腈、水和它们不同比例的混合物以及一些易挥发盐的缓冲液，如甲酸铵、乙酸铵等，还可以加入易挥发酸碱如甲酸、乙酸和氨水等调节pH值。
- LC / MS接口避免进入不挥发的缓冲液，避免含磷和氯的缓冲液，含钠和钾的成分必须 $<1\text{mmol/l}$ 。（盐分太高会抑制离子源的信号和堵塞喷雾针及污染仪器）含甲酸（或乙酸） $<2\%$ 。含三氟乙酸 $\leq 0.5\%$ 。含三乙胺 $<1\%$ 。含醋酸铵 $<10^{-5}\text{ mmol/l}$ 。
- 做样前一定要摸好LC条件，能够基本分离，缓冲体系符合MS要求。

## 4.流量和色谱柱的选择

- 不加热ESI的最佳流速是1–50  $\mu\text{l} / \text{min}$ ，应用4.6 mm内径LC柱时要求柱后分流，目前大多采用 1–2.1 mm内径的微柱，建议使用200–400  $\mu\text{l} / \text{min}$
- APCI的最佳流速0.5~1  $\text{ml} / \text{min}$ ，常规的直径4.6mm柱最合适。
- 为了提高分析效率，常采用<100 mm的短柱（此时UV图上并不能获得完全分离，由于质谱定量分析时使用MRM的功能，所以不要求各组分完全分离）。这对于大批量定量分析可以节省大量的时间。

## 5.辅助气体流量和温度的选择

- 雾化气/鞘气对流出液形成喷雾有影响，干燥气/辅助气影响喷雾去溶剂效果，碰撞气影响二级质谱的产生。
- 操作中温度的选择和优化主要是指接口的干燥气体，一般情况下选择干燥气温度高于分析物的沸点**20℃** 左右即可。对热不稳定性化合物，要选用更低的温度以避免显著的分解。
- 选用干燥气温度和流量大小时还要考虑流动相的组成，有机溶剂比例高时采用适当低的温度和流量小一点。

# 影响分子量测定的因素1

- 1) 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。
- 2) 气流和温度：当水含量高及流量大时要相应增加。
- 3) 溶剂和缓冲液流量：流速适当高可以提高出峰的灵敏度。
- 4) 溶剂和缓冲液的类型：通常正离子用甲醇好，负离子乙腈好些。
- 5) 选择合适的液相色谱类型：正相、反相、选择合适的色谱柱。

# 影响分子量测定的因素2

- 6) 合适的电压：锥孔电压高时，样品在源内分解或碎裂；高锥孔电压时会使多电荷离子比例低，多聚体也减少。
- 7) 样品结构和性质。
- 8) 杂质的影响：溶剂的纯度、水的纯净程度等。当成分复杂，杂质太多时，被测物离子化程度不好，同时使LC分离不好。
- 9) 样品浓度不够，需要浓缩。

# 我所现有仪器及配置

|        |          |                             |
|--------|----------|-----------------------------|
| Waters | HPLC     | UV、FLD                      |
| Varian | HPLC     | UV、FLD                      |
| Thermo | UHPLC    | PDA、FLD                     |
| Waters | LC-MS    | PDA, 单级四级杆、配有ESI、APCI电离源。   |
| Thermo | LC-MS-MS | PDA, 串联三重四级杆、配有ESI、APCI电离源。 |





# 第三章

## 待测样品的要求

# 为什么要进行样品的预处理？

- 从保护仪器角度出发，防止固体小颗粒堵塞进样管道和喷嘴，防止污染仪器，降低分析背景，排除对分析结果的干扰。
- 要求获得最佳的分析结果，从ESI电离的过程分析：ESI电荷是在液滴的表面，样品与杂质在液滴表面存在竞争，不挥发物（如磷酸盐等）妨碍带电液滴表面挥发，大量杂质妨碍带电样品离子进入气相状态，增加电荷中和的可能。

# 样品的预处理常用方法

- a) 超滤
- b) 溶剂萃取 / 去盐
- c) 固相萃取
- d) 色谱分离
  - 反相色谱分离
  - 亲和技术分离
- e) 甲醇或乙腈沉淀蛋白
- f) 酸水解, 酶解
- g) 衍生化

## 第四章

# 液质联用仪的维护与保养

# 维护保养1

## 维护液相部分

- 棕色玻璃瓶会更好地避免藻类的生长。
- 过滤溶剂以免其中微粒永久性阻塞毛细管。

## 可采取措施

- 使用灭过菌的溶剂瓶来减缓藻类生长。
- 使用新鲜配制的流动相，特别是水溶剂或盐缓冲液建议不超过两天。
- 避免溶剂瓶暴露在直射阳光下。

## 维护保养2

- 每1-2周对机械泵进行一次振气。停止进样和扫描，打开机械泵的振气开关，15分钟左右后关闭机械泵的振气开关。**振气中不能卸真空**
- 每六个月对机械泵更换一次泵油。将质谱卸真空后，关闭仪器，打开机械泵泵油出口阀，将废油倒出，再用200mL的新泵油冲洗机械泵的油仓，然后将机械泵泵油出口关闭，倒入新泵油至机械泵上的刻度线内。

**不能超过最高刻度线和低于最低刻度线**

## 维护保养3

每个月更换、清洗一次离子传输毛细管。

- 仪器处于Standby状态下，传输管温度降至50度；
- 将离子传输毛细管卸下，用甲醇-水(50/50)溶液超声至少5分钟，再用甲醇超声至少5分钟；
- 取出离子传输毛细管，用氮气吹干或晾干，装回仪器即可使用。

## 维护保养4

每两个月清洗一次Tube lens和Skimmer

- 将质谱卸真空后，关闭仪器；
- 戴上无粉手套，将金属离子传输管及Tube lens、Skimmer卸下；
- 用甲醇-水(50/50)溶液超声至少5分钟后，再用沾浸甲醇的无尘纸轻轻擦拭Tube lens、Skimmer上的污渍，然后用甲醇超声10分钟左右；
- 取出部件，晾干，装回仪器中，开机，抽真空。



感谢各位！

