

## Waters 高分辨LCMS系统原理与应用

沃特世科技（上海）有限公司



# 主要内容

## ■ Vion淌度质谱的原理介绍

## ■ 超高效液相色谱 (UPLC)

流动相及添加剂  
色谱柱  
梯度设置

## ■ 质谱工作原理(QTOF)

ESI的原理和特点  
TOF的原理和特点  
质谱的校正方式  
MS<sup>E</sup> 采集模式

# 什么是离子淌度？

## ■ 离子淌度 (Ion Mobility) :

单位场强下离子迁移的速率，又叫离子迁移率

## ■ 离子淌度的量纲:

电位梯度为每米1伏特时的迁移速率称为此种离子的淌度

单位是米<sup>2</sup>/(秒·伏特)

## ■ 在一定电场强度下，某种离子在一定温度和一定介质中移动的速率是一定的，其迁移速率只与下面两个因素有关：

- 介质的导电率

- 化合物的性质

分离技术：电泳

如：毛细管电泳

SDS-PAGE

.....

## ■ 质谱中的离子淌度分离

- 高真空系统，气相电泳

- 离子迁移率，更多的与化合物自身性质相关

续 ...

## ■ 离子淌度

- 是代表离子迁移速率特征的物理量
- 是化合物自身固有的性质之一

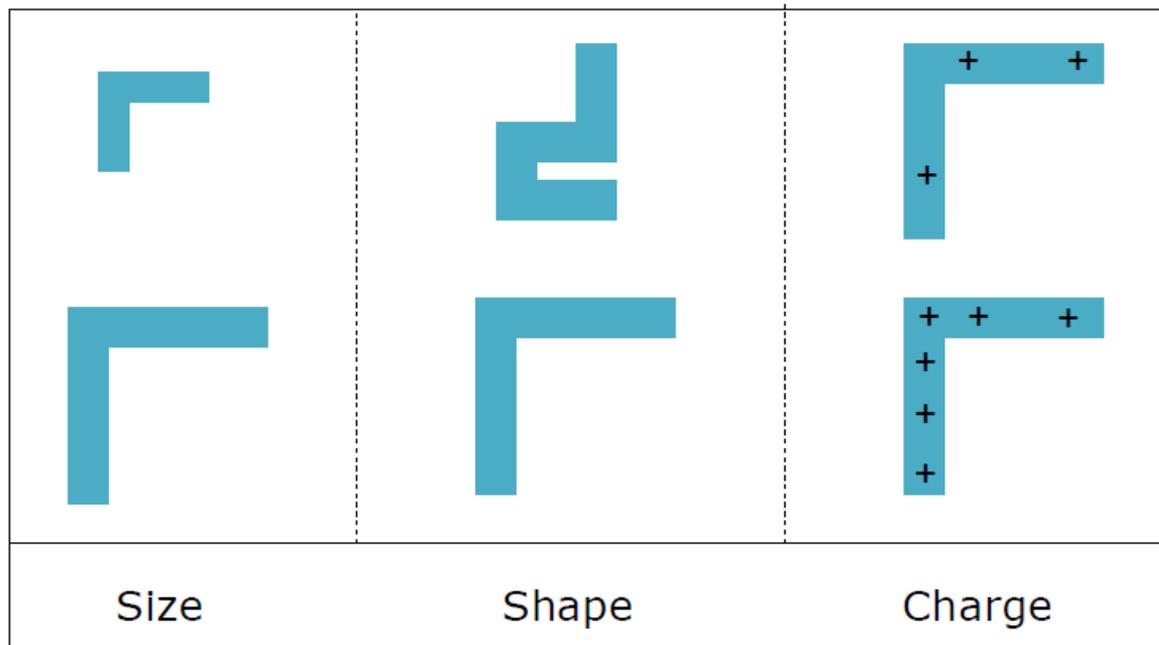
## ■ 离子淌度与化合物关系

- 分子大小
- 分子所带电荷数
- 分子形状

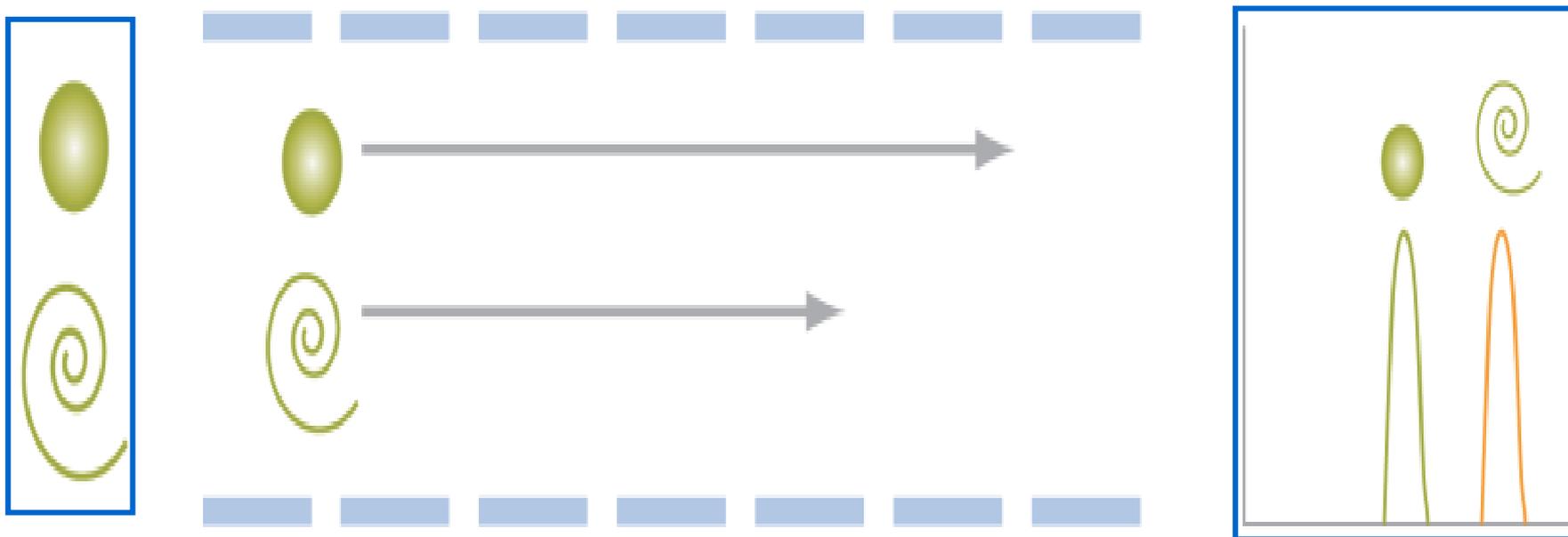
碰撞截面  
Collision Cross Section, CCS



The mobility of an ionised molecule is dependant on its...



# Ion mobility separation



# HDMS系统：可以提供多一维的数据

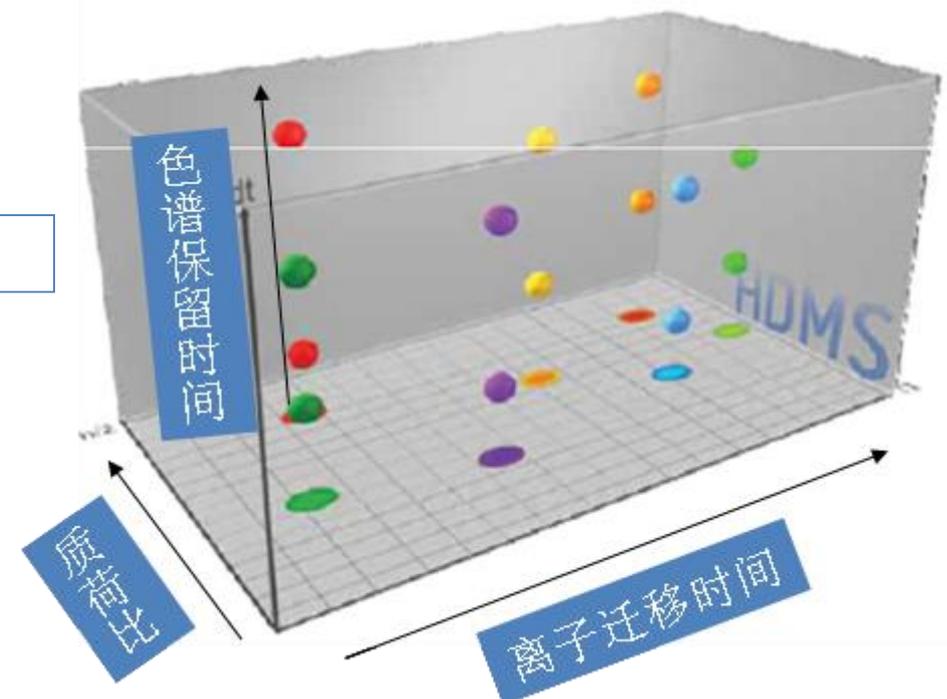
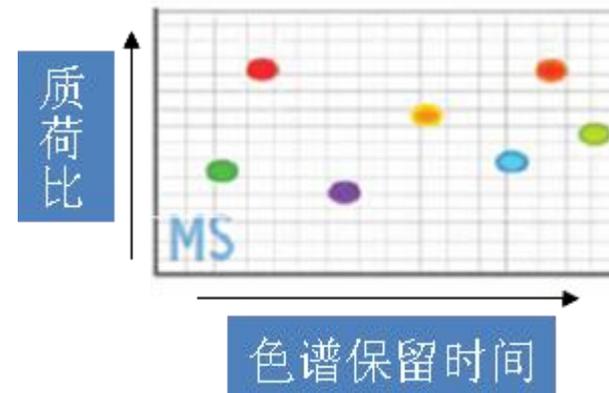
- LC（一维分离 + Intensity）  
2维数据： Intensity  
Retention time of LC

- LC-MS 二维分离 + Intensity

3维数据： Intensity  
Retention time of LC  
 $m/z$

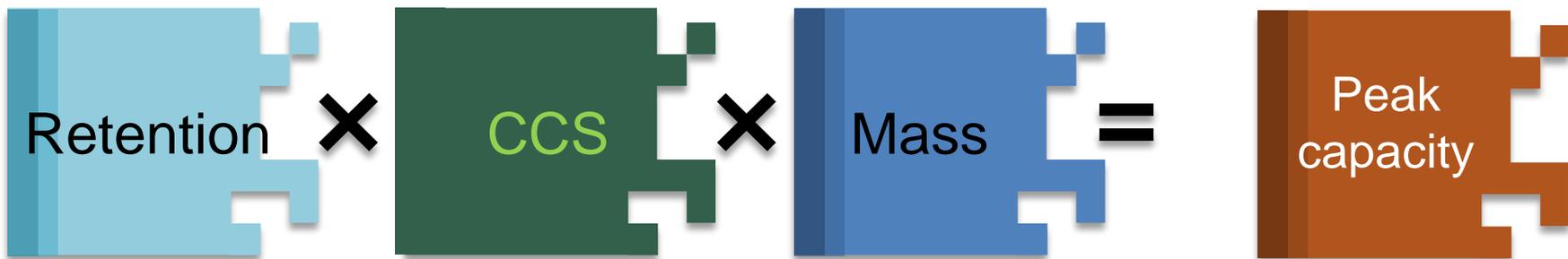
- LC-HDMS 三维分离 + Intensity

4维数据： Intensity  
Retention time of LC  
 $m/z$   
**Drift time (CCS)**



# 分离容量:

淌度分离的加入，增加了样品的分析容量



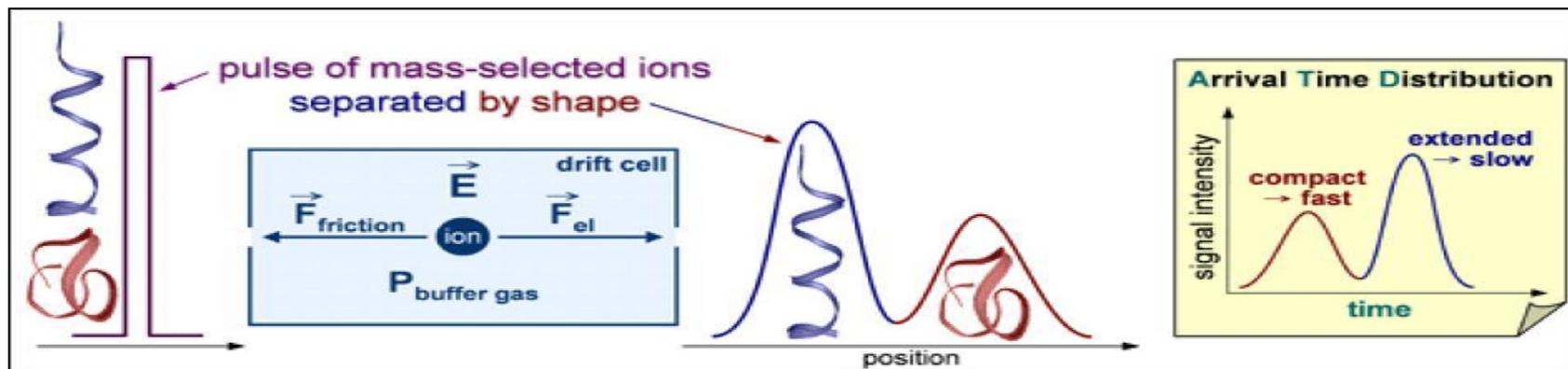
Acquity  
UPLC®

T-WAVE™  
ION MOBILITY  
POWERED

QuanTof

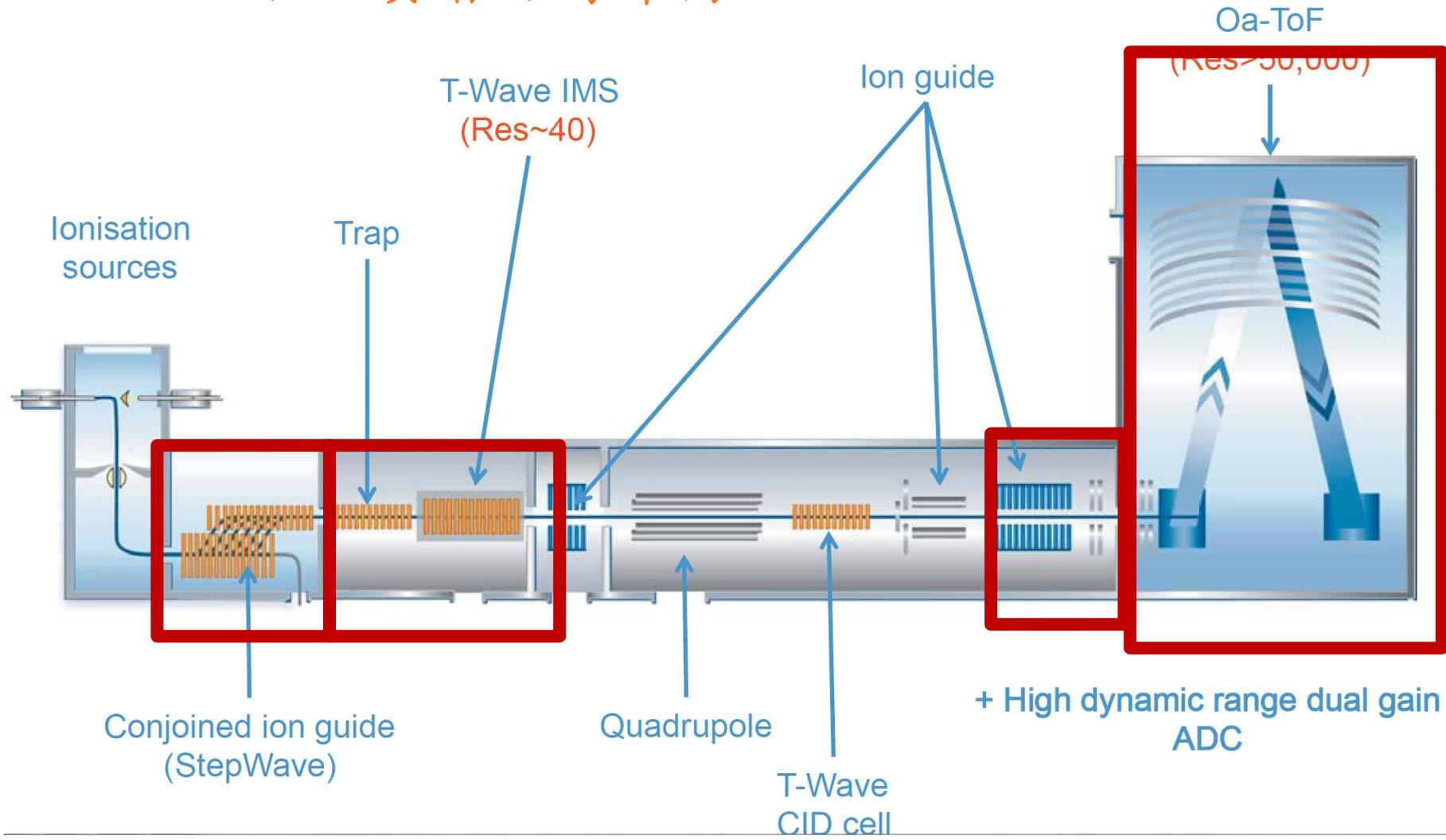
UPLC/HDMS

# 淌度质谱的原理介绍



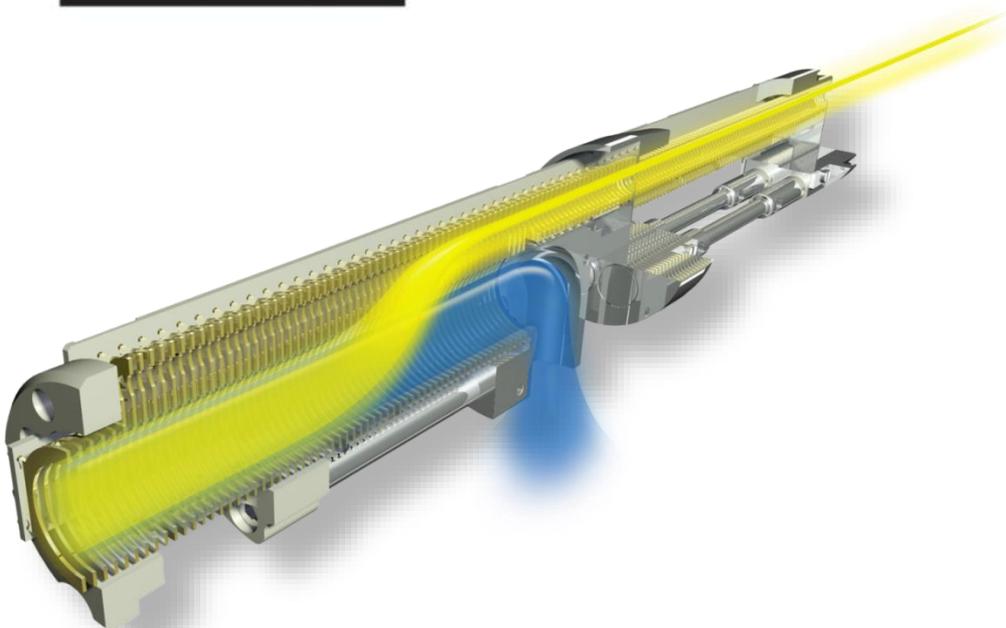
- ✓这个理论在80年前就被提出(C.F Powell ,1932)
- ✓带电离子进入含有淌度气体(氮气)的淌度池,由于质荷比, 分子形状和带电荷数目的不同, 使离子跟碰撞室内的淌度气体的碰撞截面积(CCS)不同而实现分离(漂移时间)。
- ✓经过淌度分离的离子, 可以得到离子的漂移时间和碰撞截面积, 从而进行定性及离子形状的判断

# VION IMS QTof质谱的内部构造



# 专利的StepWave技术-增加灵敏度，提高检测灵敏度

## STEP WAVE™

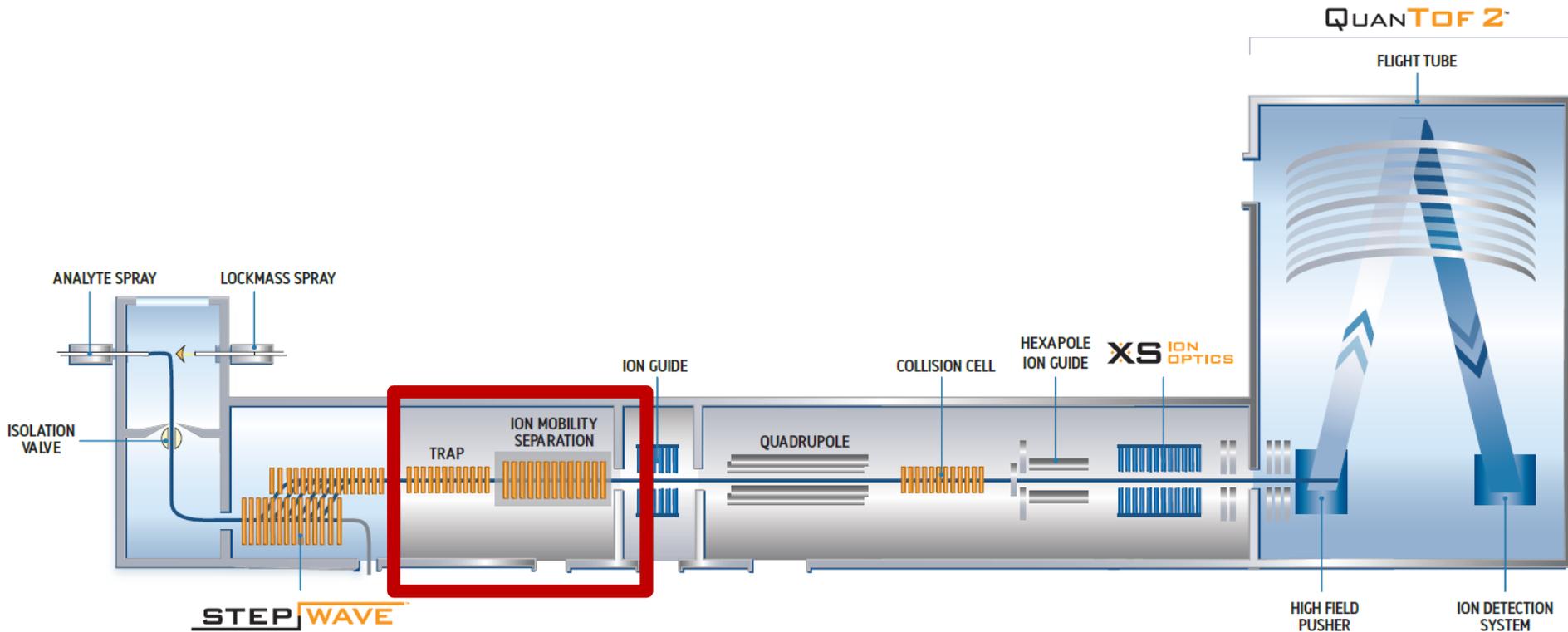


蓝色为中性物质，黄色为带电离子

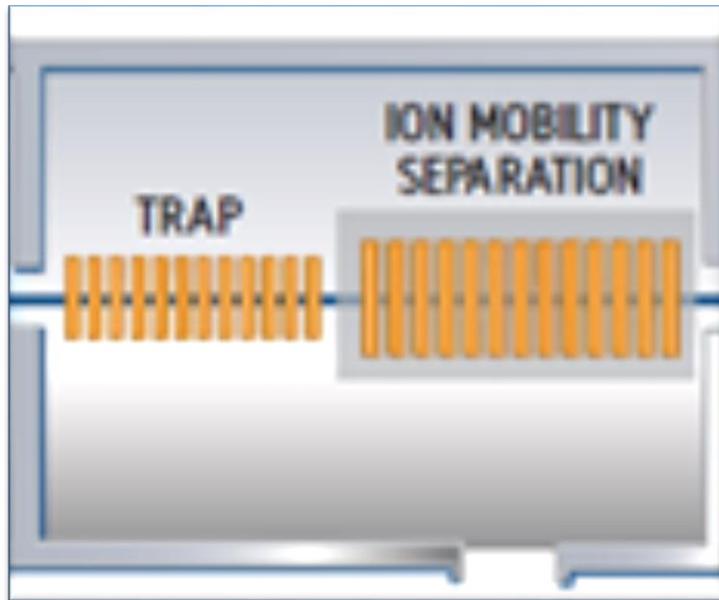
### StepWave技术

- ✓使带电离子在电压的作用下，使离子更好的聚焦（离子束变细），提高信号响应；
- ✓将中性物质用机械泵抽走，降低噪音；
- ✓信号提高，噪音降低，从而提高灵敏度

# VION IMS QToF质谱的内部构造

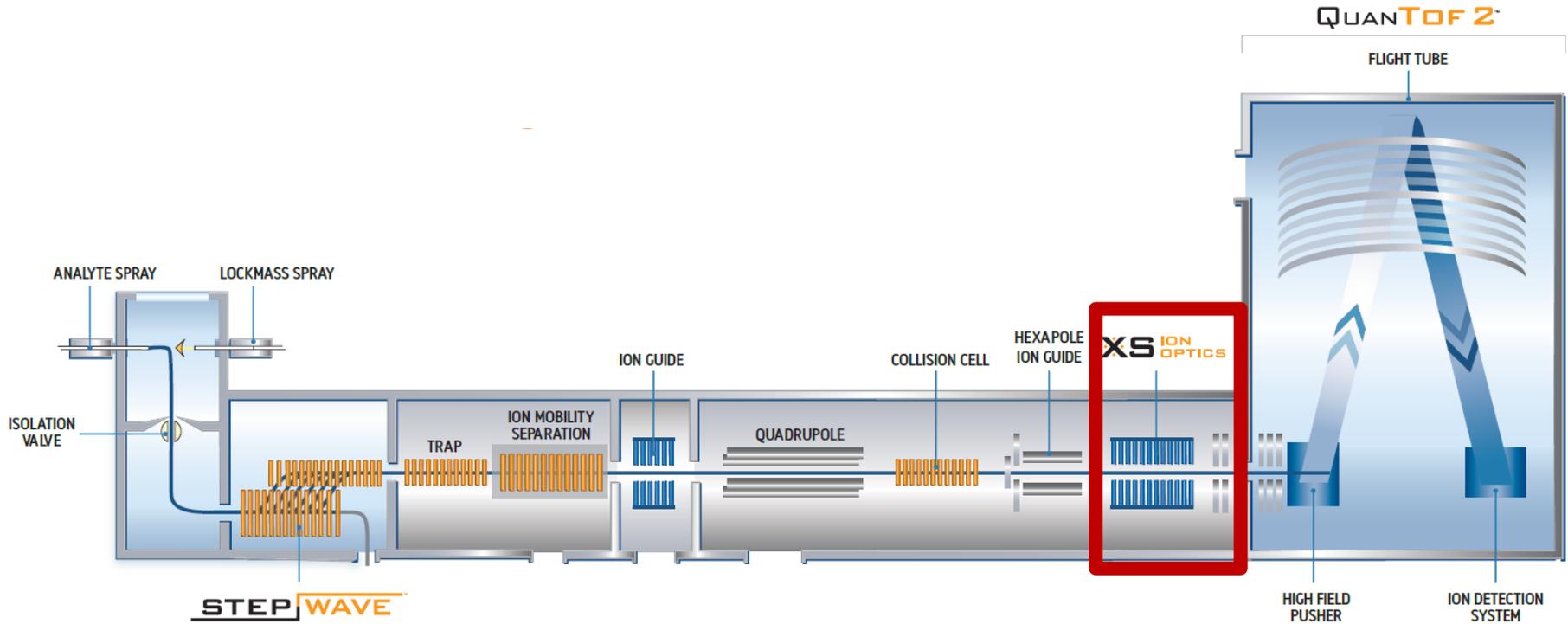


## 压力稳定的淌度分离池, 保证淌度分离的 稳定性和重现性



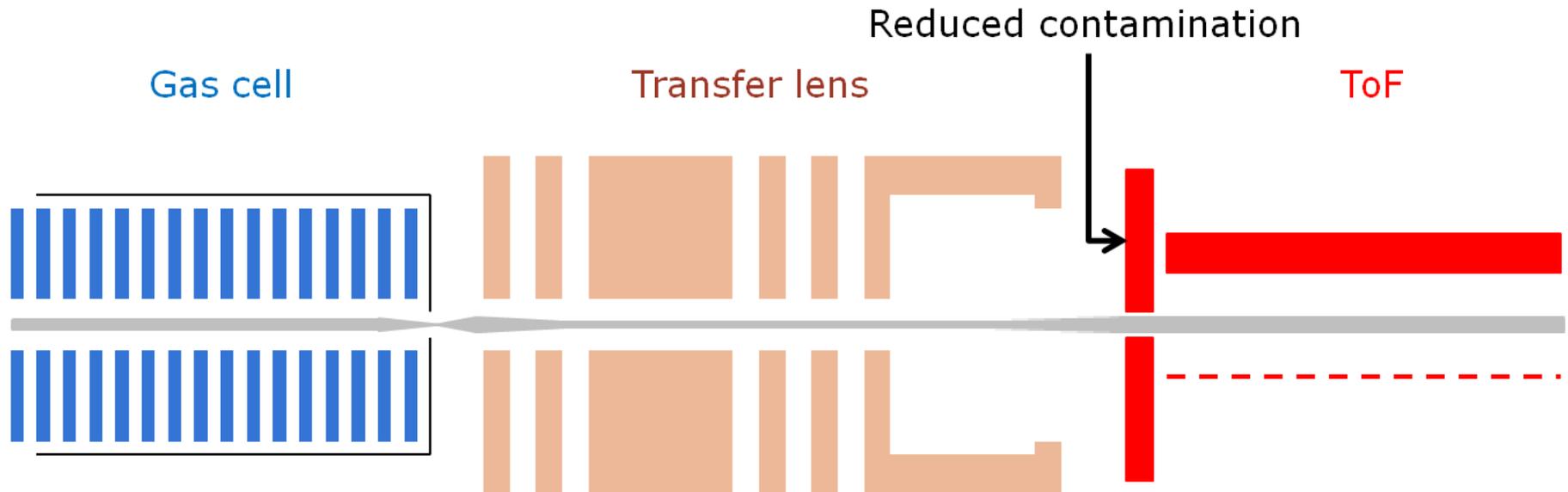
- ✓ 当把淌度管放在离子源后后面时, 梯度压力的变化会影响到离子源压力, 离子源压力的变化会影响淌度管的压力, 会导致导致离子的漂移时间不稳定, 因此会导致CCS值的重现性和稳定性不好
- ✓ 淌度池内有**压力调控器**, 检测压力的变化并进行气体流速的微调, 保证淌度管压力不变; 可使无论是连接液相还是直接进样, 保证**淌度分离的**稳定性和重现性;
- ✓ **T-Wave**技术Waters的专利的离子传输技术, 保证离子的传输速度;

# VION IMS QToF质谱的内部构造

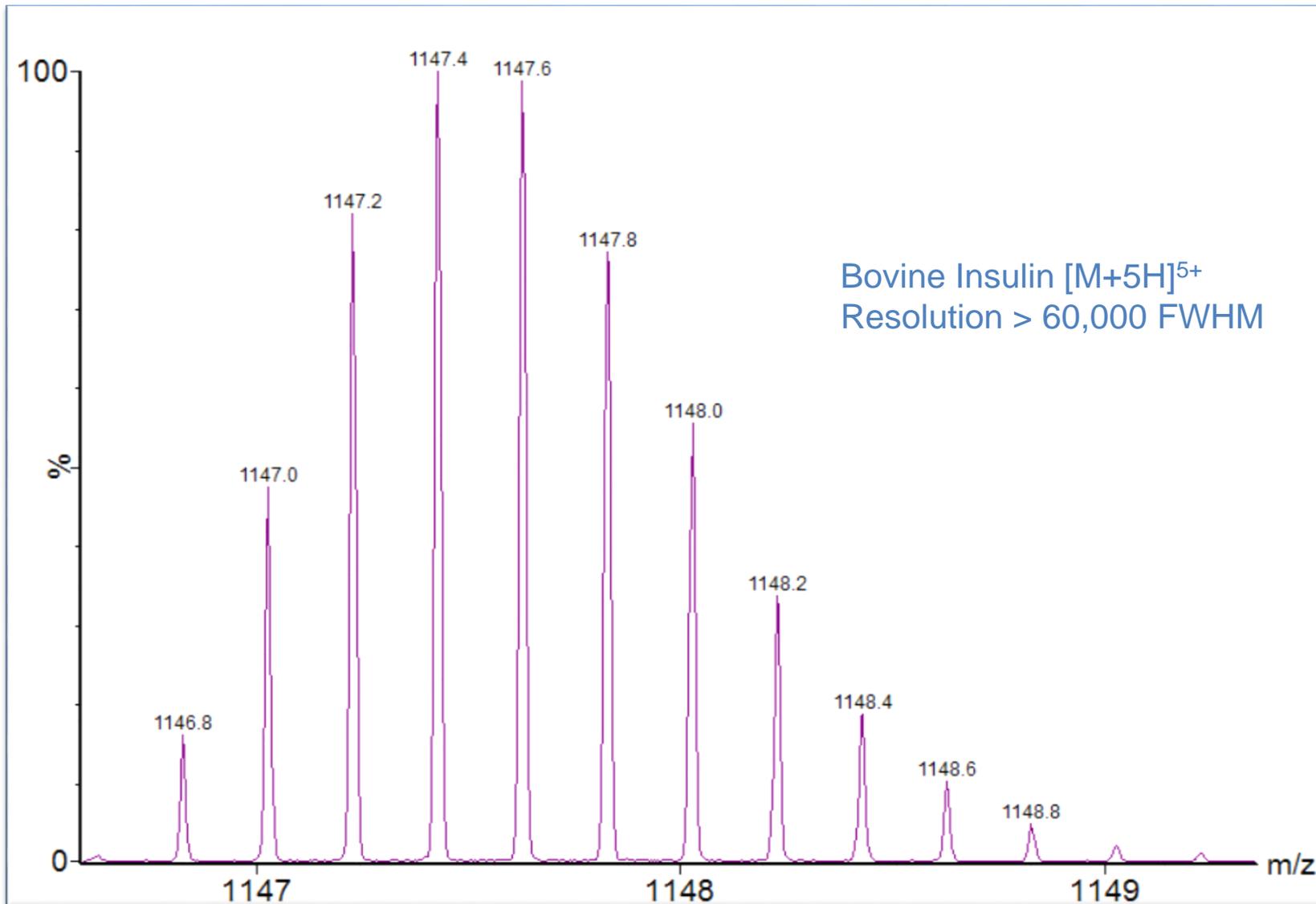


## XS技术使离子束更加聚焦,带来以下好处

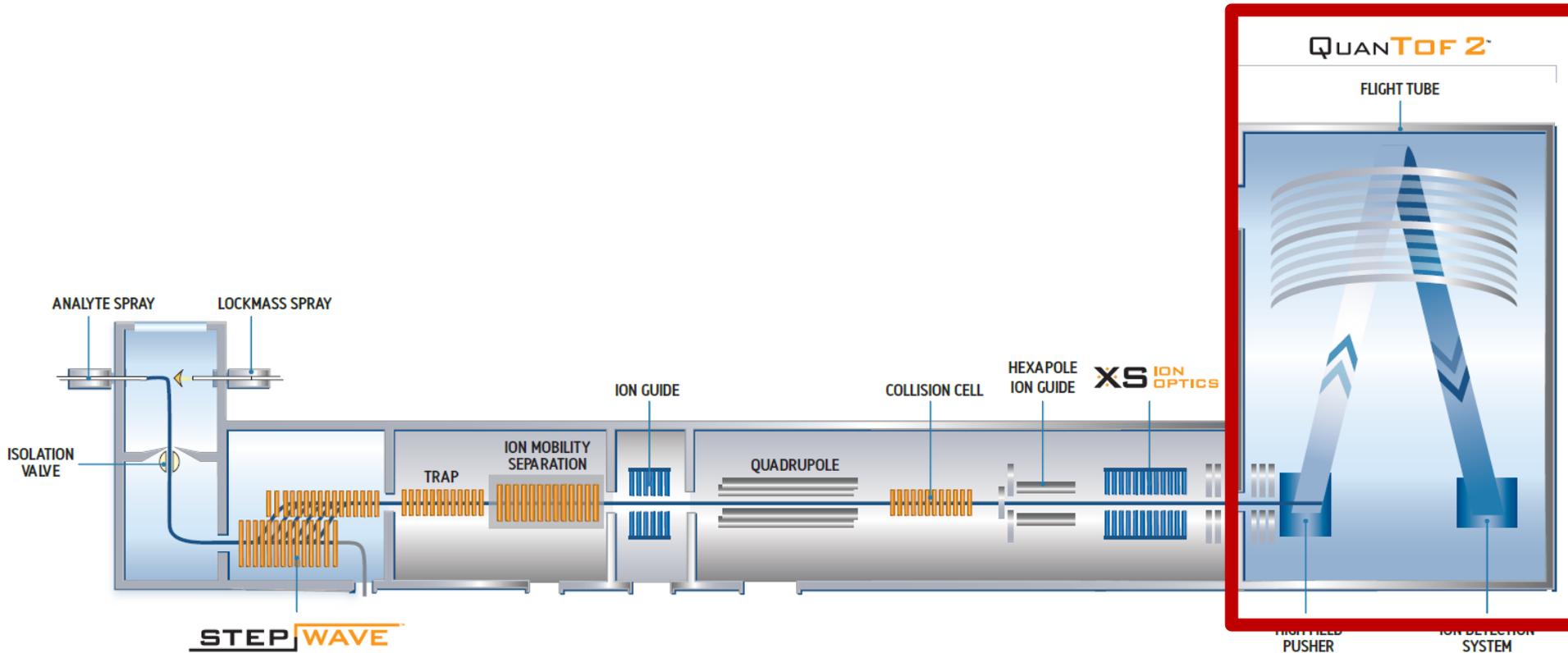
- 增加分辨率,
- 提高灵敏度
- 增加抗污染能力



# XS 带来的分辨率的提高



# VION IMS QToF质谱的内部构造

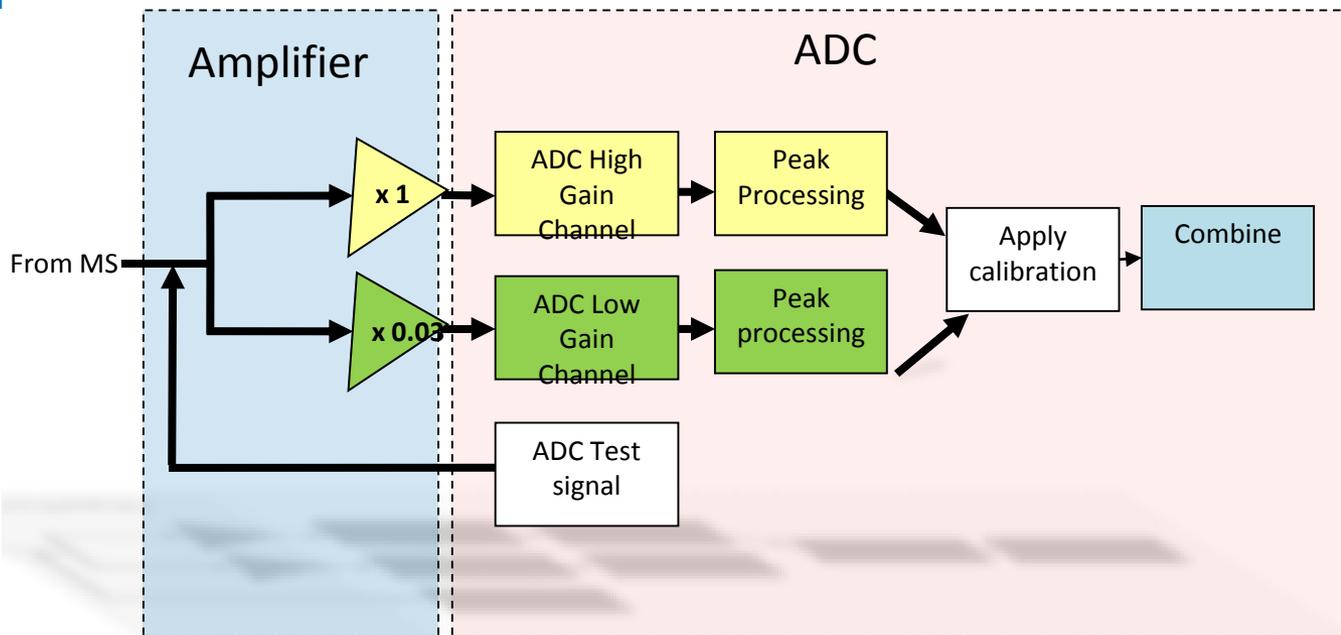


# QuanTof2 Detector

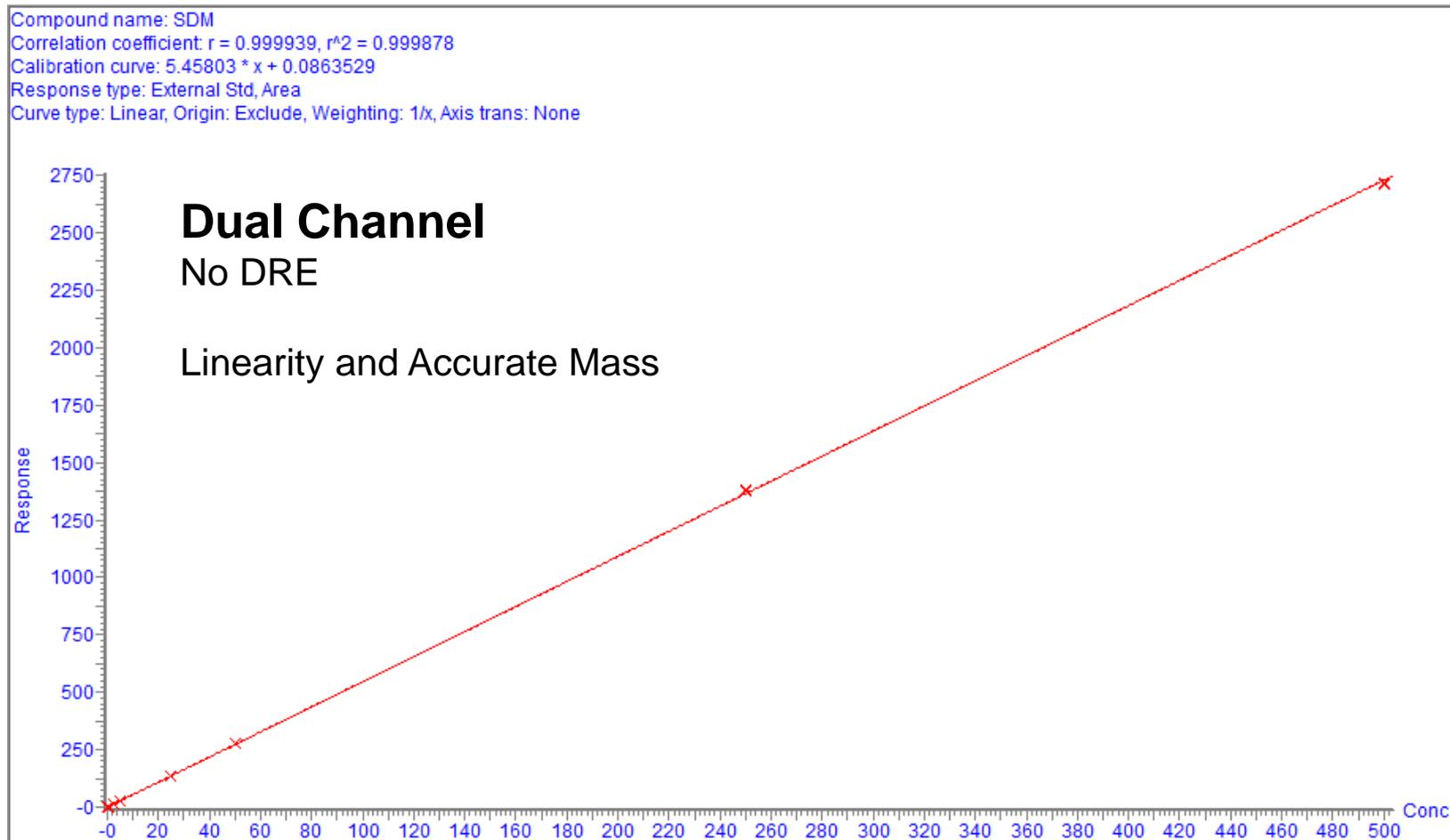
## 保证淌度质谱的线性动态范围

- Dual Channel 7.2GHz (*up-sampled*) 10-bit ADC

# QUANTOF™



# QuanTof2, 提高淌度质谱的线性动态范围



# Vion™ IMS QTof

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

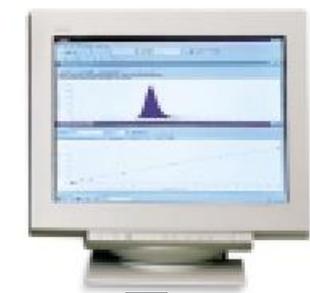
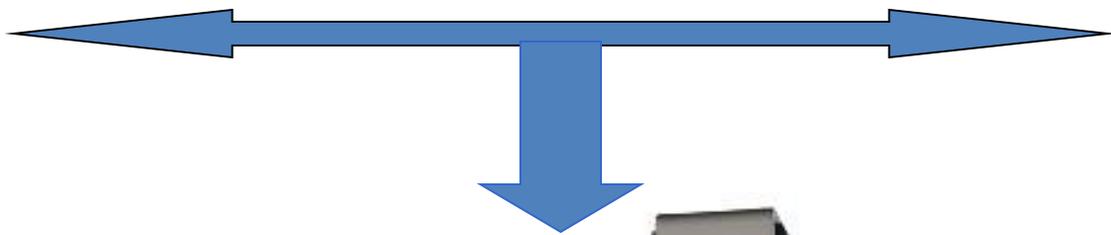
## Beyond Resolution

实现淌度质谱使用的常规化



2015 ASMS

# 什么是液质联用系统？



**Result !**

超高效液相色谱分离  
UPLC Separation Method

## 液相分离溶剂准备

### ■ 常用流动相配备

- A: 0.1% FA in Water (根据需要, 更换其中的添加剂)
- B: ACN
- C: MeOH
- D: Pure Water

- 对于某些需要严格控制pH值的方法, 可以在有机相中也加入相应添加剂
  - 如果使用了含添加剂的流动相, 请及时冲洗色谱柱, 不可以让添加剂在色谱柱中过夜

### ■ 清洗溶液准备

- FL 自动进样器 (Fix Loop, 固定进样环定量进样)
  - Weak wash: 弱洗溶剂, 10% ACN
  - Strong wash: 强洗溶剂, 90% ACN
  - Seal wash: 10% ACN
- FTN 自动进样器 (Flow Through Needle, 流动针式定量进样)
  - Wash: 相当于强洗溶剂, 90% ACN
  - Purge: 相当于弱洗溶剂, 10% ACN
  - Seal wash: 10% ACN

## 液相分离溶剂准备

### ■ 常用流动相配备

- A: 0.1% FA in Water (根据需
- B: ACN
- C: MeOH
- D: Pure Water

1. 纯水需要每天更换
2. 其他溶剂使用到剩下50~100ml时，倒掉残余溶剂，清洗试剂瓶后，再添加新配置的溶剂

### ■ 对于某些需要严格控制pH值的方法，可以在有机相中也加入相应添加剂

- 如果使用了含添加剂的流动相，请及时冲洗色谱柱，不可以让添加剂在色谱柱中过夜

### ■ 清洗溶液准备

- FL 自动进样器 (Fix Loop, 固定)
  - Weak wash: 弱洗溶剂, 10%
  - Strong wash: 强洗溶剂, 90%
  - Seal wash: 10% ACN

当发现进样环节存在交叉污染时，建议在强洗溶剂中添加~5%的IPA；

或添加一定比例的导致交叉污染化合物的适合溶剂

- FTN 自动进样器 (Flow Through Needle, 流动针式定量进样)

- Wash: 相当于强洗溶剂, 90% ACN
- Purge: 相当于弱洗溶剂, 10% ACN

Seal wash: 10% ACN

## ■ 色谱柱的选择

- 四种载体类型：BEH/HSS/CSH/Cortecs
- 化学键合相：C18/C8/Phenyl/.....

- BEH ( Ethylene Bridged Hybrid)
- HSS ( High Strength Silica)
- CSH ( Charged Surface Hybrid)
- Cortecs (solid-core particles)

## ■ 分离条件的选择

- 流动相的种类，ACN还是MeOH？一般从乙腈开始
  - 流动相中是否需要添加剂，需要哪种添加剂？LC与MS相互制衡
    - 添加剂的加入，有时会抑制ESI离子化效率；但是会增加流动相的离子强度，对色谱峰形有利
    - 离子对试剂的使用，大大改善色谱峰的拖尾情况；但是也有较强的离子抑制
    - 以偏碱性化合物为例，
      - 对于MS分析：化合物需要结合正离子，酸性添加剂对提高其MS响应有利；
      - 对于反相LC分离：酸性添加剂使其不易在反相色谱柱上保留，对其色谱分离有不利
- ∴ 应该平衡LC、MS两者的关系，以达到好的检出效果  
(FA、NH<sub>4</sub>OH≤0.1%，甲酸铵≤10mM)

# 液相分离方法的建立

## 常用的溶剂和添加剂:

- 甲醇
- 水
- 乙腈
- 异丙醇
- 甲酸
- 乙酸
- 氨水
- 乙酸铵
- 甲酸铵
- .....

## 不推荐使用的溶剂和样品稀释剂:

- 二氯甲烷
- 氯仿
- 甲苯
- 磷酸盐缓冲液
- EDTA
- 硫酸盐缓冲液
- .....

## 不要添加:

- 三氟乙酸
- 三乙胺
- 三丁胺

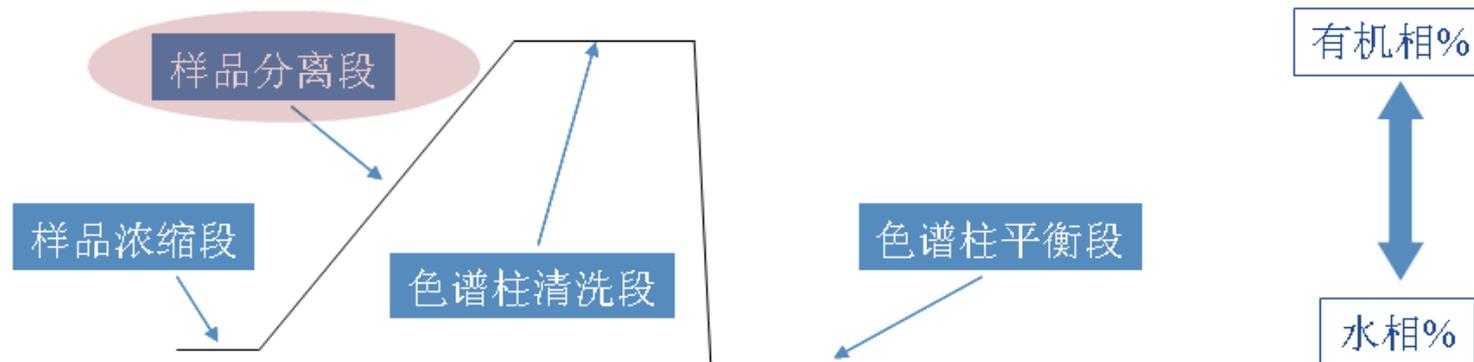


## 液相色谱方法的建立

### ■ 洗脱条件的优化

- 等度洗脱，梯度洗脱？
- 如何设置梯度？

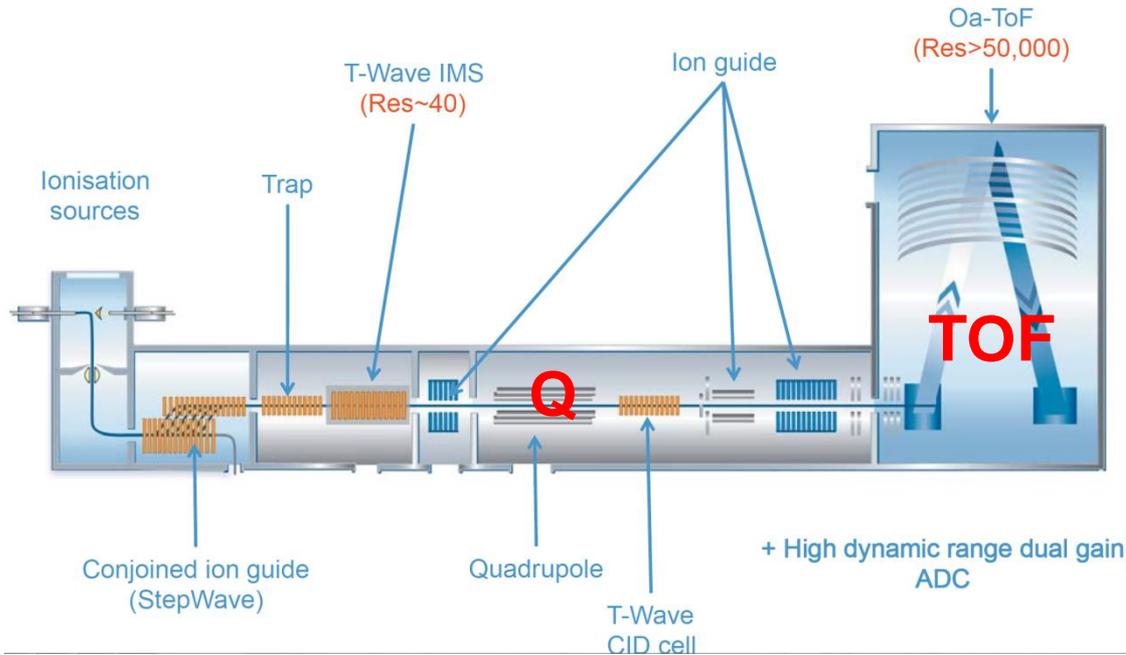
### ■ 色谱梯度分离方法编辑一般原则：



- 从大梯度开始，优化各化合物的保留时间
  - 高水相→高有机相，如90%的水相→90%的有机相
- 优化分离段，调整整个化合物的保留时间
  - 有机相%↑，保留时间↓
  - 梯度慢，有助于相邻化合物分开

# 质谱工作原理

- 1.ESI的原理和特点
- 2.TOF的原理和特点
- 3.质谱校正方式
4.  $MSE^E$  采集模式



# Vion Schematic

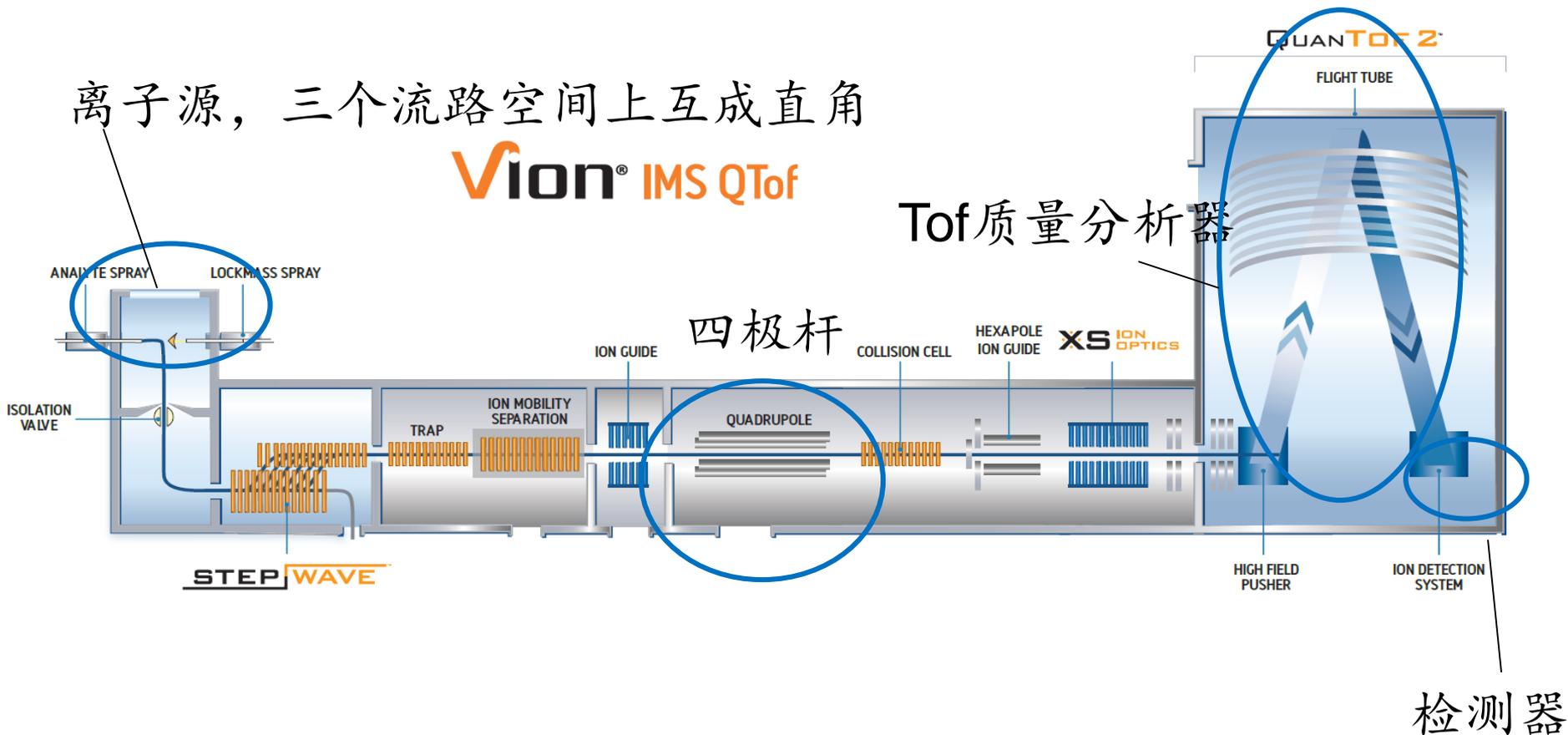
离子源，三个流路空间上互成直角

Vion® IMS QTof

Tof质量分析器

四极杆

检测器



# 什么是质谱仪?

- 核心为高真空系统，检测对象：气态离子



- 质谱仪主要部件:

- 离子源: 将样品 (化合物) 转化成气态离子
- 质量分析器: 将气态离子按质荷比 ( $m/z$ ) 的大小依次排列, 形成质谱图
- 检测器: 记录数据并输出

## 液质联用：大气压离子化技术

### 主要工作：

- 1、气化：把来自液相色谱的液态流动相瞬间气化
- 2、带电：使待测化合物在温和条件下带上电荷变成离子

离子化效率高是是影响信号的灵敏度、稳定性的主要因素



## 液质联用技术的离子源：

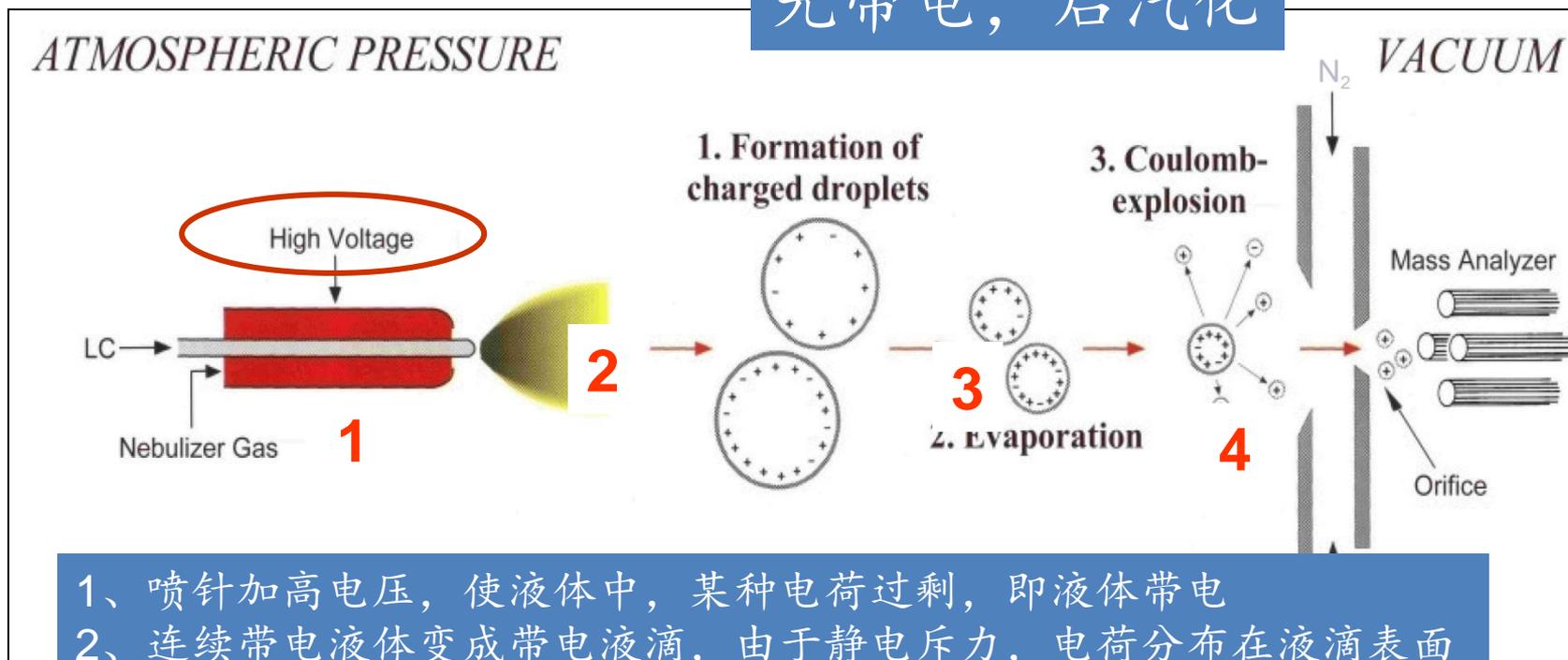
—— 化合物由 液体分子 → 气体离子 的过程

### 两种主要类型：

1. Electrospray Ionization —— ESI, 电喷雾离子化
2. Atmospheric Pressure Chemical Ionization with Heated Nebulizer —— APCI, 大气压化学离子化

# ESI, 电喷雾工作原理

先带电，后汽化



- 1、喷针加高电压，使液体中，某种电荷过剩，即液体带电
- 2、连续带电液体变成带电液滴，由于静电斥力，电荷分布在液滴表面
- 3、大的带电液滴变成小的带电液滴
- 4、溶剂继续挥发，形成离子（或离子逸出，或电荷残留）

**IonSpray™ source: Electrospray Ionization (ESI)**  
softest ionization technique

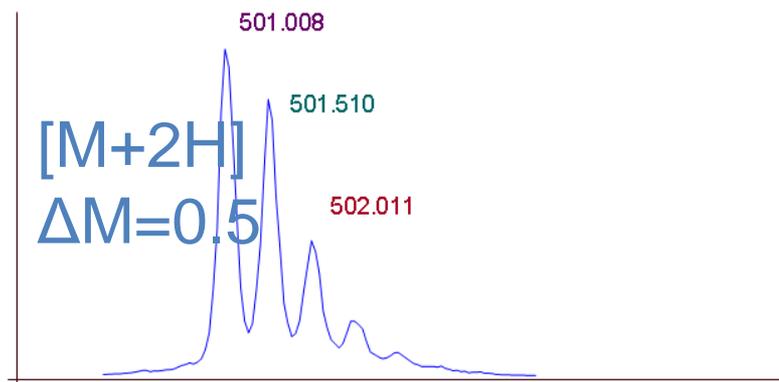
## ESI的电离特点

因为带电过程发生于溶液状态，所以，

### ■ 容易受溶液体系的影响

- 基质效应：因受体系中其他共存化合物的影响（液滴表面离子化竞争），待测化合物离子的信号强度降低（离子抑制）或异常增高（离子增强）的现象

### ■ 容易带多电荷

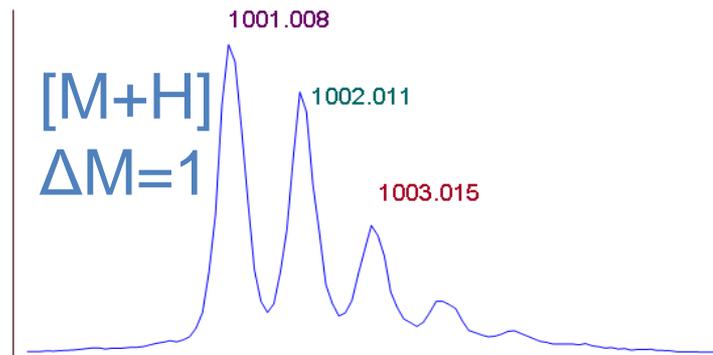


## ESI中的多电荷离子

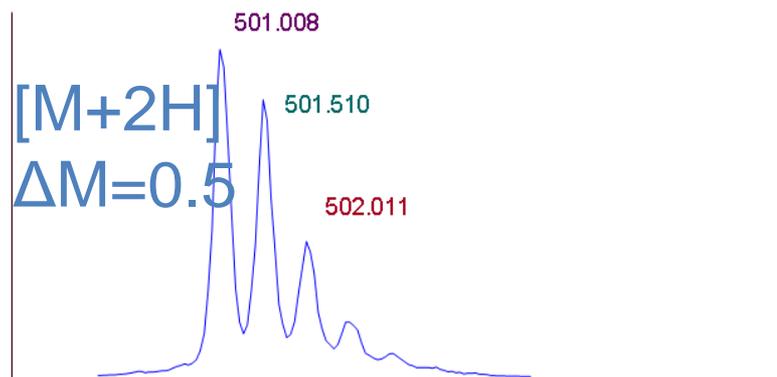
- 质谱测定是基于质荷比 ( $m/z$ ) (以正模式为例)
  - 单电荷离子  $m/z = (M+H)/1$
  - 双电荷离子  $m/z = (M+2H)/2$
  - 多电荷离子  $m/z = (M+nH)/n$
- 多电荷离子的同位素峰的峰间距:  $1/n$  Da
  - 例如, 双电荷离子的同位素间距等于 0.5 Da
- 多电荷离子可以扩展质谱的质量数检测范围

当  $R > 10000$

可由 **单个质谱峰** 同位素峰间距确定离子所带电荷数

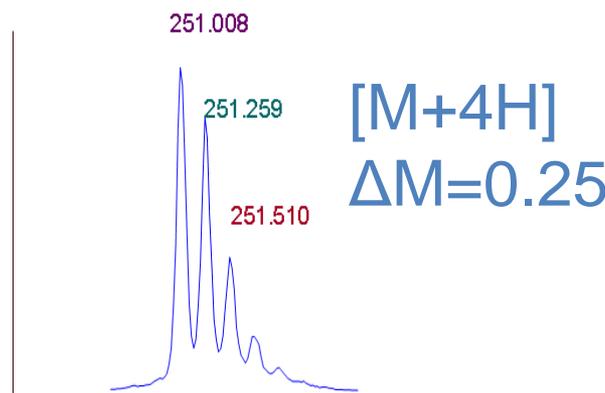
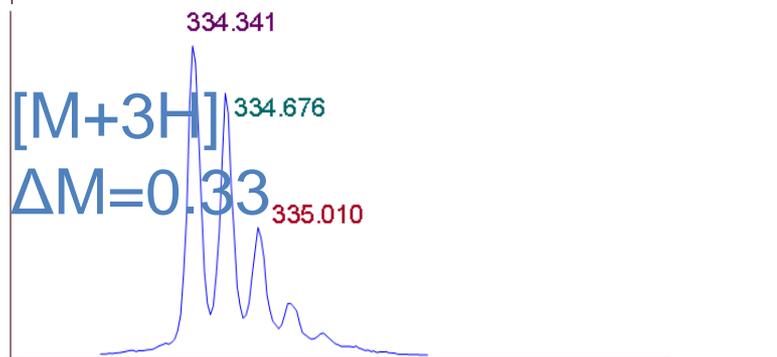


$$m/z = \frac{M + n(H^+)}{n}$$



- 单电荷峰: 同位素峰间距  $\approx 1$  Da
- 双电荷峰: 同位素峰间距  $\approx 0.5$  Da
- 三电荷峰: 同位素峰间距  $\approx 0.33$  Da
- 四电荷峰: 同位素峰间距  $\approx 0.25$  Da

.....



# ESI电离，参数含义与设置：

ES+ Fluidics

Source Voltages

Capillary (kV)

Cone (V)

Source Temperatures

Desolvation Temp (°C)

Source Gas Flow

Desolvation (L/Hr)

Cone (L/hr)

## 电压参数

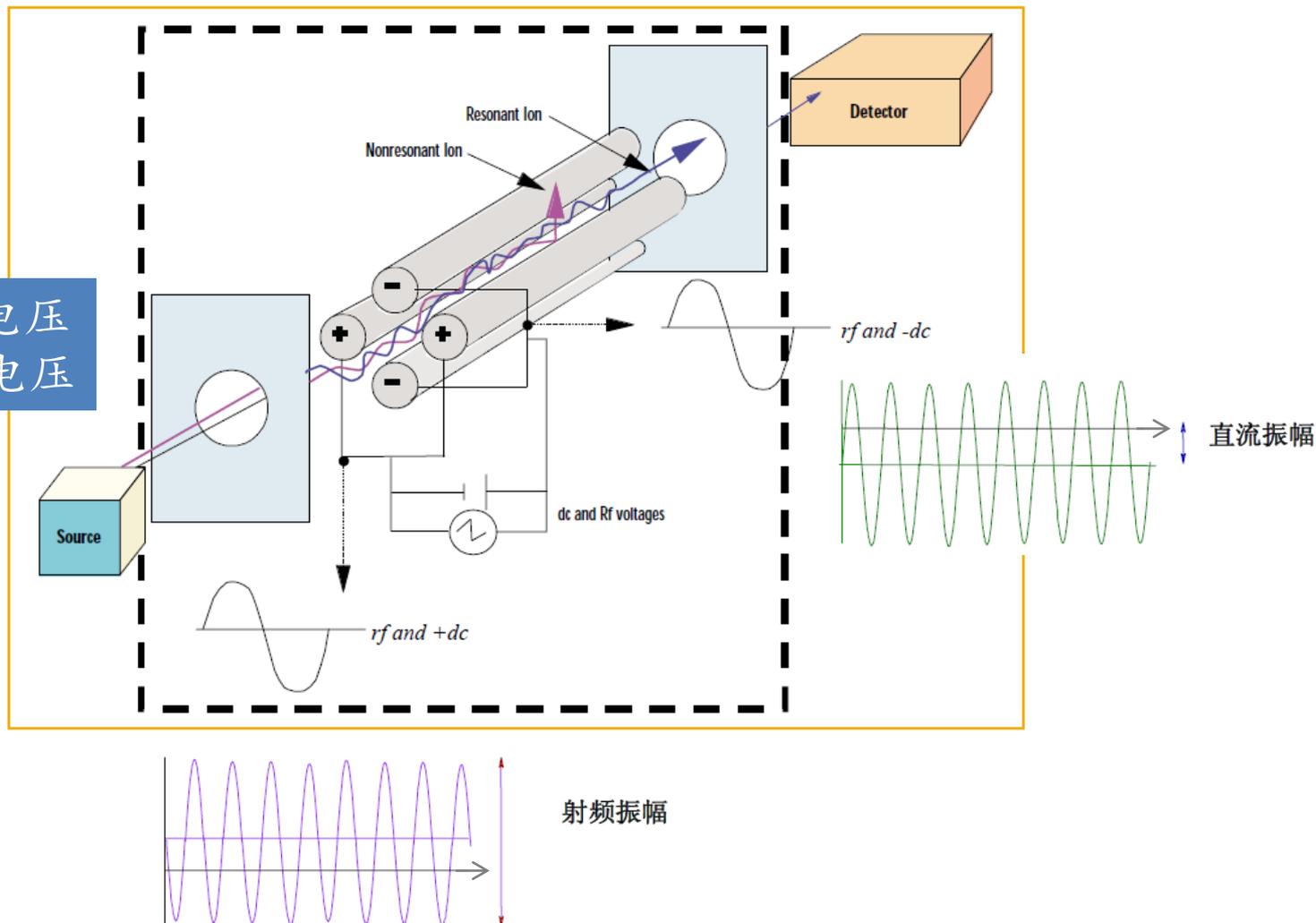
- 1、Capillary: 喷雾电压，一般3.0 for Positive, 2.5 for Negative
- 2、Cone: 锥孔电压，30-50V

## 气化参数

- 1、Desolvation Temp: 气化温度，去溶剂气温度，联LC时，450~550°C
- 2、Desolvation (L/Hr): 去溶剂气流量，联LC时，800~1000
- 3、Cone (L/Hr): 锥孔反吹气，≥ 50

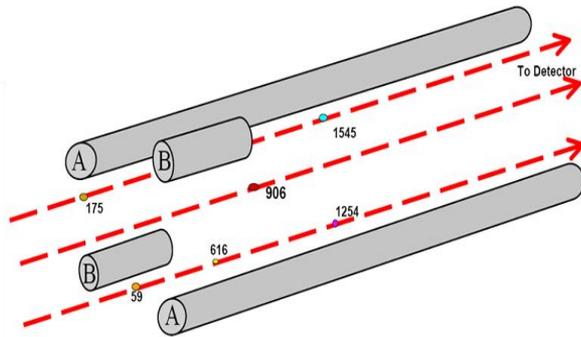
# 四极杆质量分析器

RF: 射频电压  
DC: 直流电压

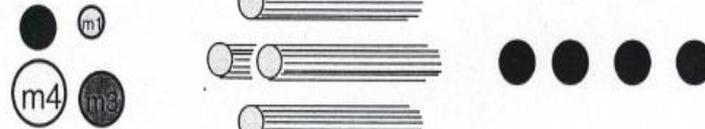


QTOF里，四极杆（Q）主要运行方式：

- 1、RF only，离子通道
- 2、固定RF和DC，离子选择模式



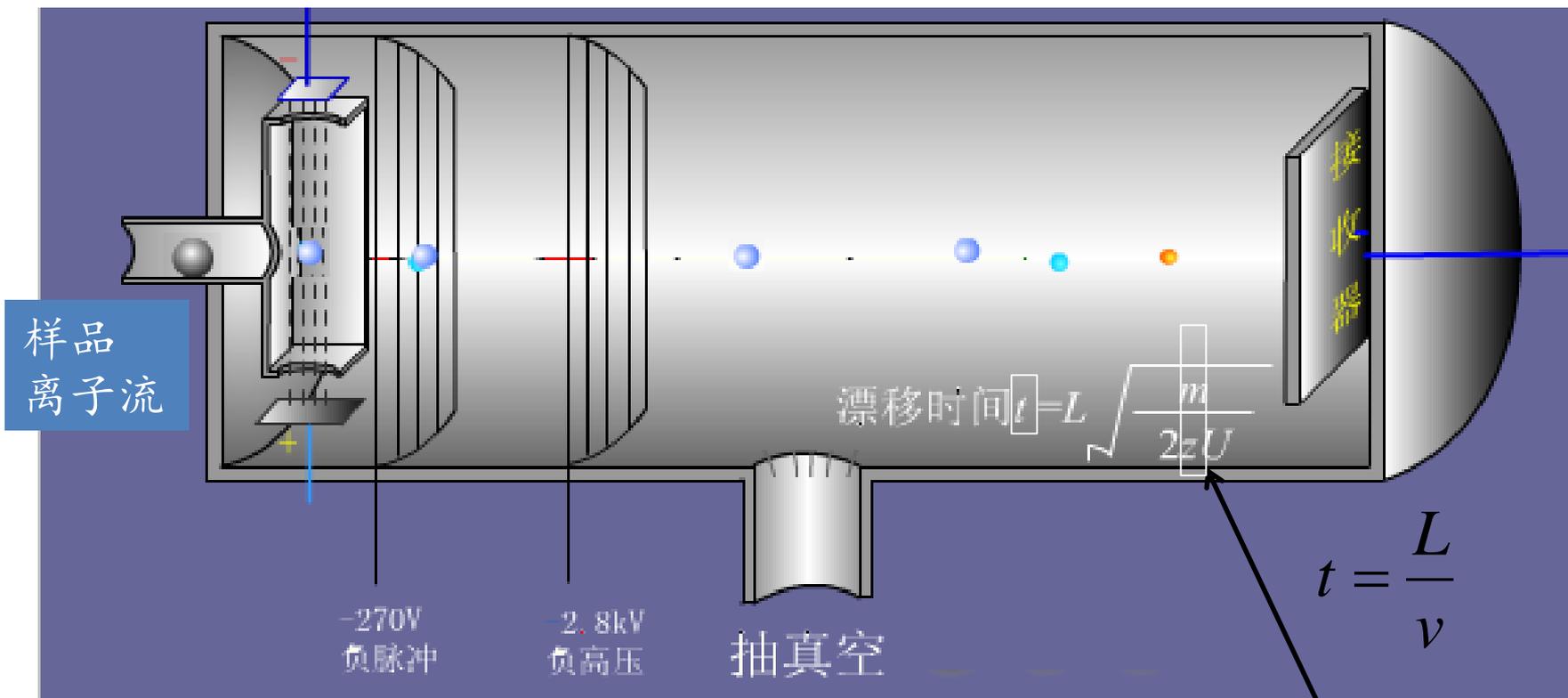
Single mass transmission mode



飞行时间质量分析器  
Time Of Flight, TOF

# 飞行时间质量分析器

飞行时间质谱的核心部分是一个无场、无极的离子自由漂移管



加速后的离子具有相同的动能

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV \rightarrow v = \left(\frac{2zV}{m}\right)^{1/2}$$

## 加速后的离子具有相同的动能

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV$$

$$v = \left(\frac{2zV}{m}\right)^{1/2}$$

◆  $m/z$ 小的离子，漂移运动的速度快，先通过漂移管，到达检测器； $m/z$ 大的离子，漂移运动的速度慢，后到达检测器。根据到达检测时间的长短，区分  $m/z$

◆ 因为离子在漂移管中自由飞行，数据采集时选择离子很难实现，目前的技术只能做全扫描

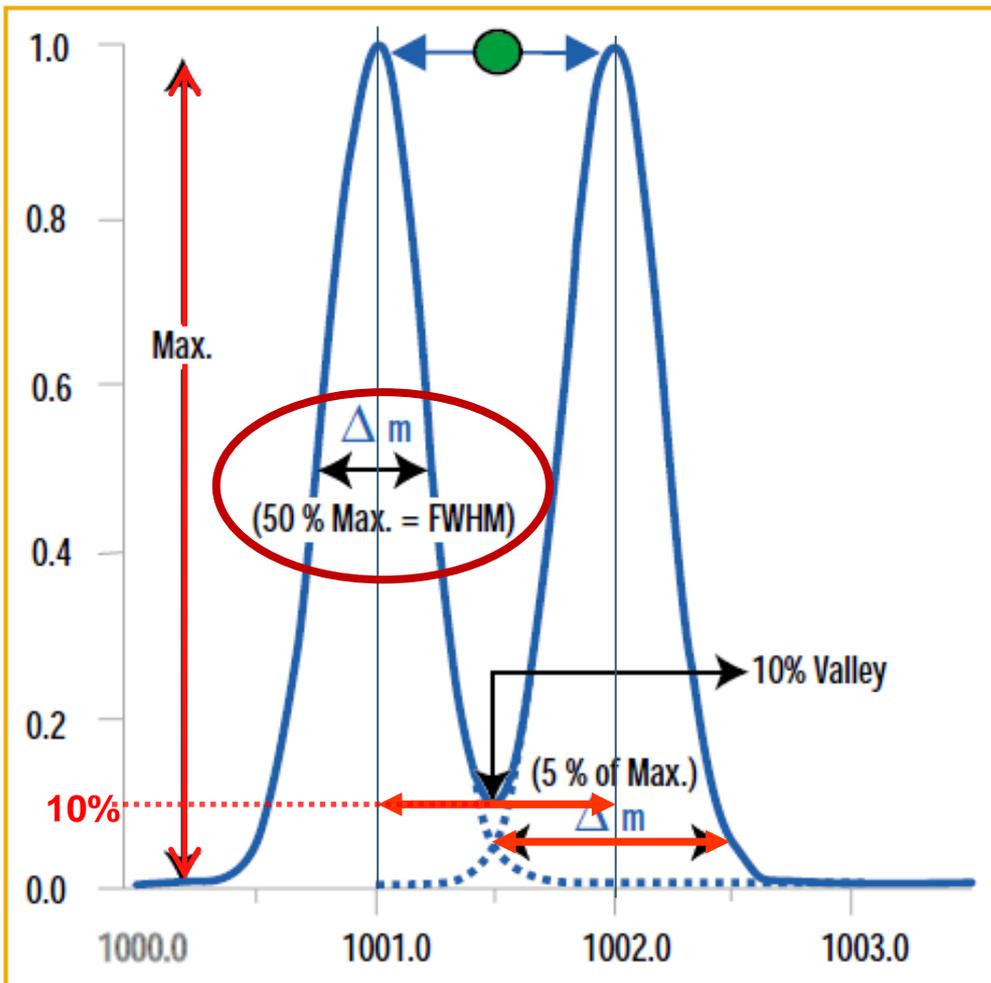
◆  $m/z$ 小的离子，由于检测时间相对短，扩散效应小，表现为质谱峰窄；相应的， $m/z$ 大的离子，质谱峰相对宽一些，分辨率相对来说是常数

◆ 但是当  $m/z$  减小到一定值时，如 200 以下，其峰宽已窄到自然展宽的最小值，不会再变窄，此时计算出的分辨率会迅速下降

◆ 灵敏度高，扫描速度快，结构简单（原理简单）

# 质谱分辨率的计算:

$$R = \frac{m_1}{m_2 - m_1} = \frac{m_1}{\Delta m}$$



而在实际工作中，有时很难找到相邻的且峰高相等的两个峰，同时峰谷又为峰高的10%

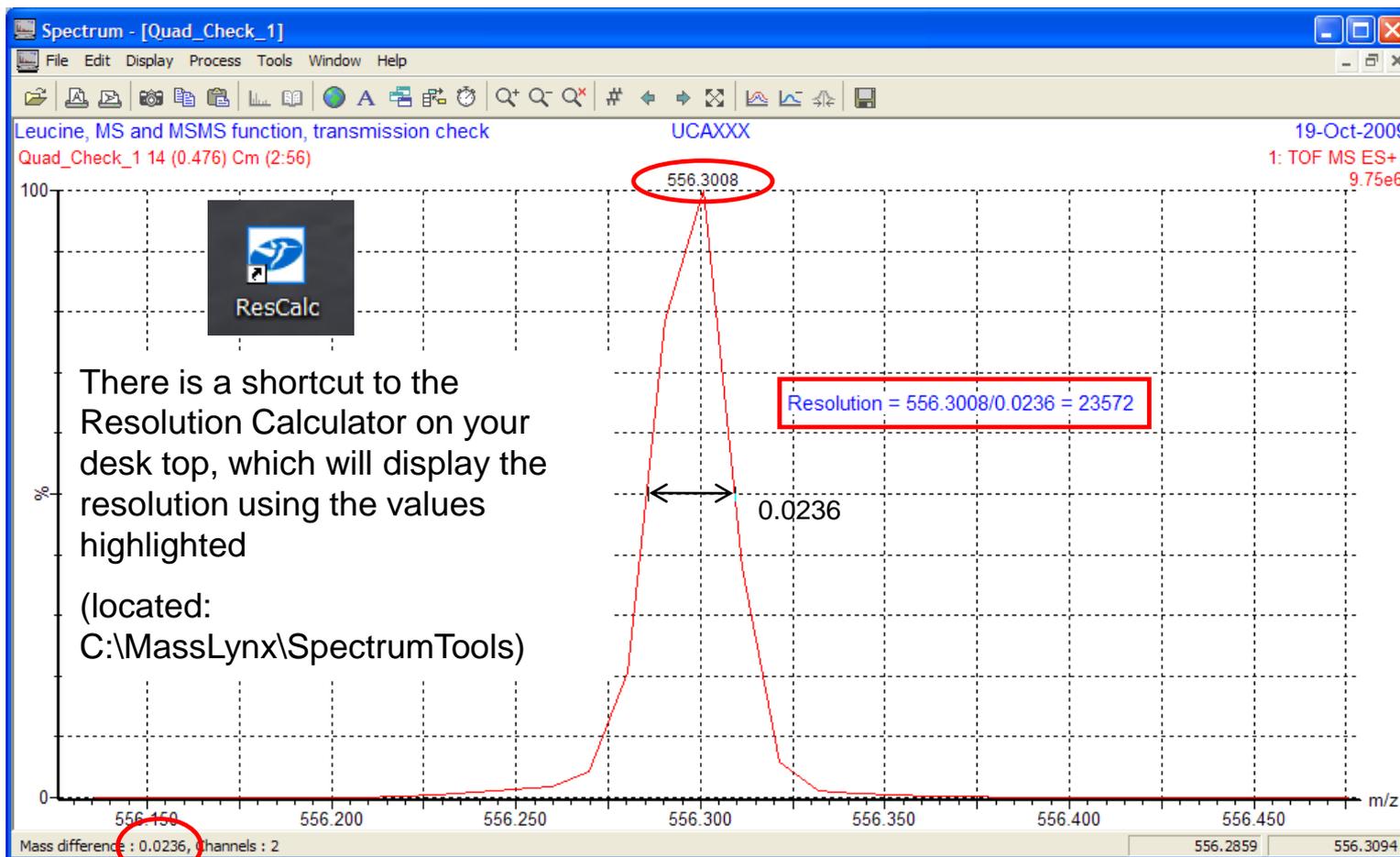
在这种情况下，可任选一单峰，测其峰高5%处的峰宽 $W_{0.05}$ 即可当作上式中的 $\Delta m$ ，此时分辨率定义为：

$$R = m/W_{0.05}$$

如果该峰是高斯型的，上述两式计算结果是一样的

对于TOF型质谱，要求稍宽松些， $\Delta m$ 指50%峰高时对应的峰宽，即半峰宽

# 分辨率的计算



## 什么是精确质量数? .....mDa & ppm

质量数测定的**准确度**, ..... 用质量数的测量误差衡量

■ 绝对误差, AE:

$$- (\text{Mass}_{\text{(测量值)}} - \text{Mass}_{\text{(理论值)}}) \times 10^3$$

- **mDa**  
**(milli Da)**

■ 相对误差, RE:

$$\frac{\text{绝对误差}}{\text{Mass}_{\text{(理论值)}}} \times 10^6$$

- **ppm**  
**(part per million)**

e.g. LeuEnk, ESI (+)

MW (理论值) = 556.2771

MW (测量值) = 556.2778

AE = 556.2778 - 556.2771  
= 0.0007 Da  
= **0.7mDa**

RE = 0.0007 / 556.2771  
= 0.00000108  
= **1.08 ppm**

# 高分辨质谱进行质量数测定时,

分辨率

$$R = \frac{M}{FWHH}$$

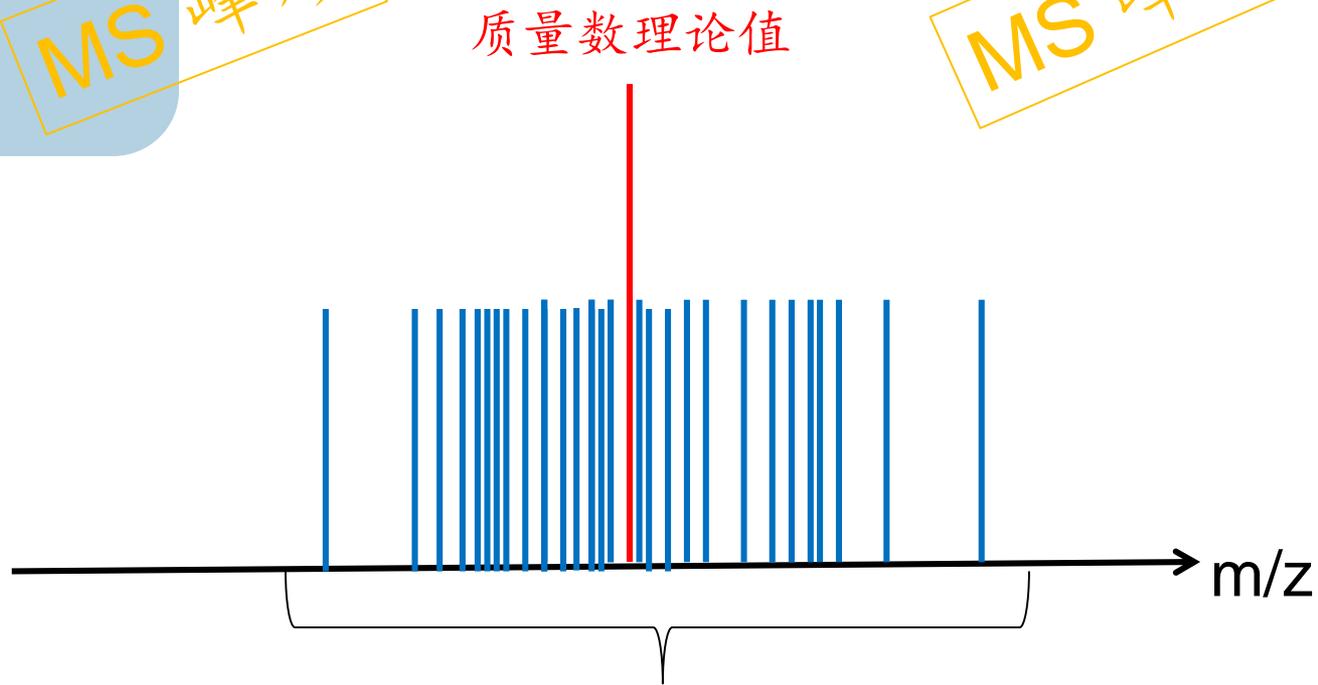

MS 峰形

精确质量数:

- 绝对误差 ( $\Delta M$ ), 单位: mDa
- 相对误差 ( $\Delta M / M$ ), 单位: ppm

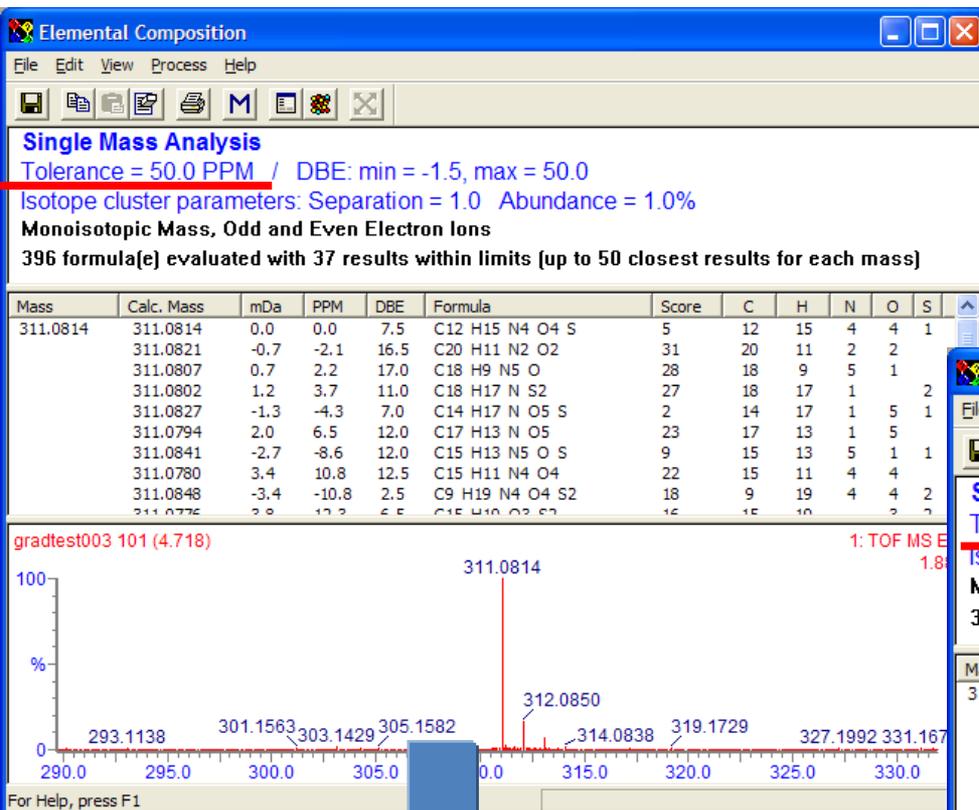
百万分之一

MS 峰位

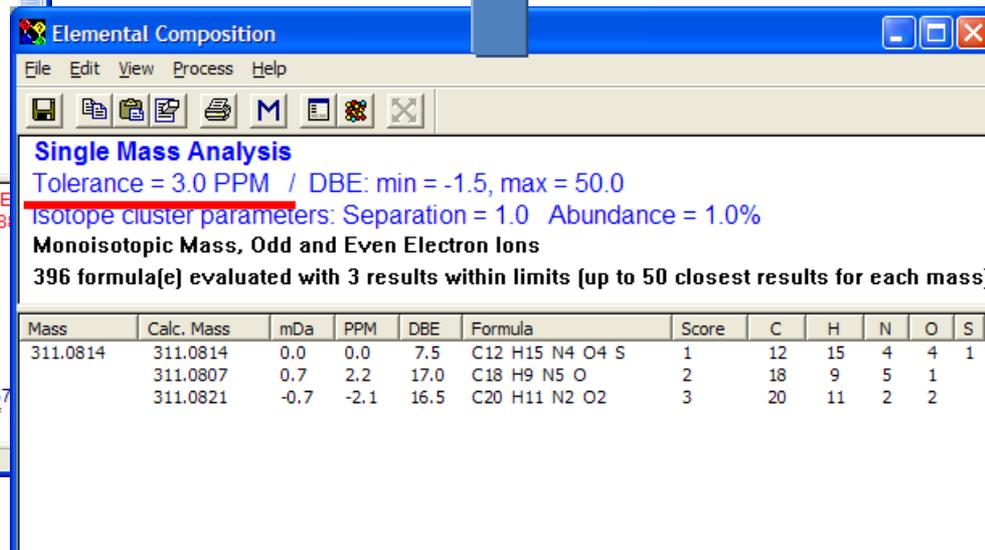


极值误差的范围

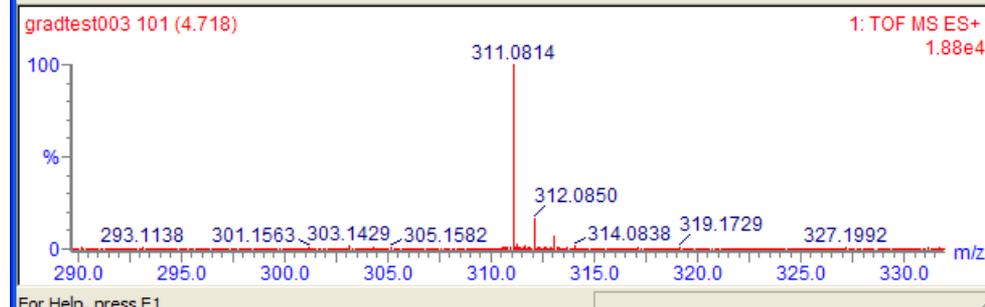
# “Mass Tolerance” 与可能的分子式数目



Mass tolerance: 3 ppm  
分子式有 3 种可能性



Mass tolerance: 50 ppm  
分子式有 37 种可能性



少！

一个质量数 → 若干个分子式  
一个分子式 → 若干个结构式

所以说，

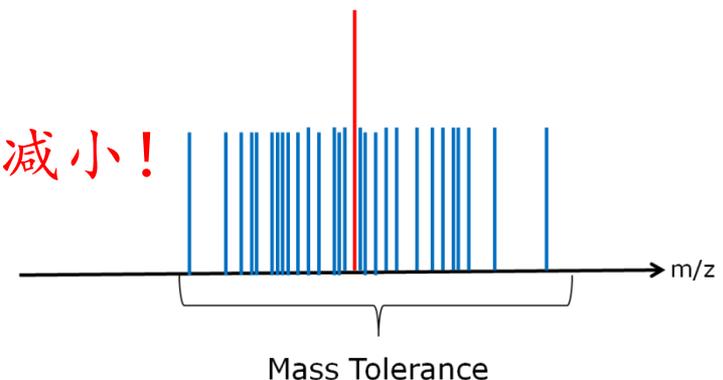
质量数测的越准，

根据质量数来判定可能的分子式时，设置的“Mass Tolerance”可以越小，

获得的可能的分子式的数目越少，

定性工作的难度、工作量将会大大减小！

质量数怎样才能测的准呢？



# Calibration

质量数校正

1. 质量轴校正
2. 实时质量数校正：*实验过程中的质量数微调*

**Waters 专利 Lockmass**



# 1. 质量轴校正

(如: Major Mix IMS[186008113])

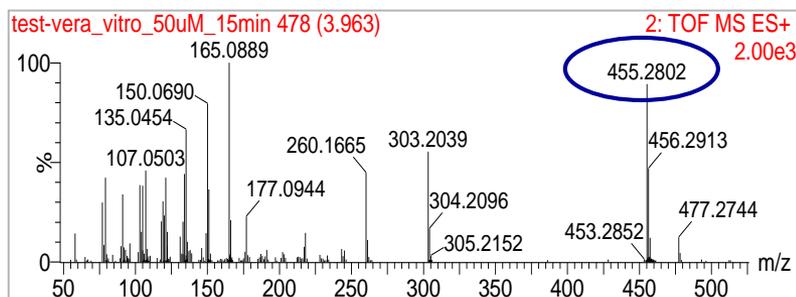
The screenshot displays the Waters LCMS System Instrument Setup interface. The left sidebar shows a navigation tree with 'Vion IMS QToF' and 'Instrument Setup' highlighted. The main area is titled 'Instrument Setup' and shows a 'Running' status with 'Lock Mass Correction Started'. A log of operations is visible, including 'Resolution Optimisation Complete', 'Starting Mass Calibration for Positive.Sensitivity.1000', and 'Starting Mass Calibration for Positive.Resolution.1000'. A 'Plot Data' window shows a mass spectrum with peaks at 0.53, 40416, and 2.691e+4. The x-axis is labeled 'Mass (m/z)' and ranges from 547.0 to 565.0. The y-axis represents intensity. The plot also shows a 'Normalise On' button and a '1: MS' dropdown menu.

- 1, 点击“start”开始自动校正后, 在此界面会出现实时校正的情况
- 2, setup会优化以下参数:  
双通道ADC比值的精确测量, Detector setup,  
优化质谱的分辨率  
在非淌度模式下进行质量数的校正, 1000, 2000  
在淌度模式下进行CCS值的校正, 1000, 2000

## 2、实时质量数校正（微调）

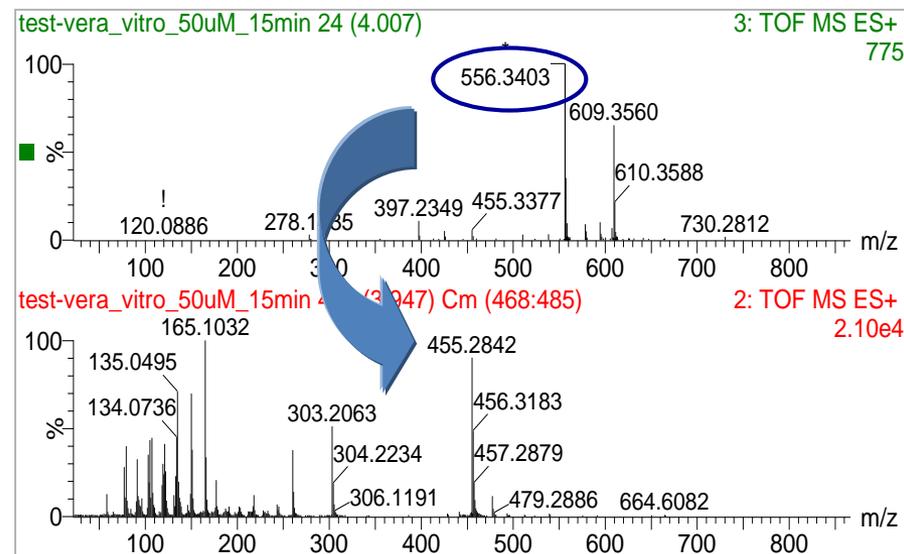
### ■ 内标法校正：

- 利用一张质谱图中的已知质量数，来调节校正其他质量数的方法
- 实时性好，校正试剂与实际样品离子同时采集，质量数准确度高
- 但是，由于样品与校正试剂同时采样：
  - 离子抑制
  - 校正试剂与样品相互作用，校正试剂需具有化学惰性
  - 图谱复杂，校正试剂纯度要求高，昂贵
  - 不能对**MSMS**进行校正



### ■ 外标法校正

- 不同质谱图之间的质量数校正
- 没有，或较少：
  - 离子抑制
  - 校正剂与样品相互作用
  - 图谱复杂
- 对MS、MSMS皆适用
- 校正试剂相对便宜、易找
- 但是，由于实时性差
  - 校正质量数的准确性较差

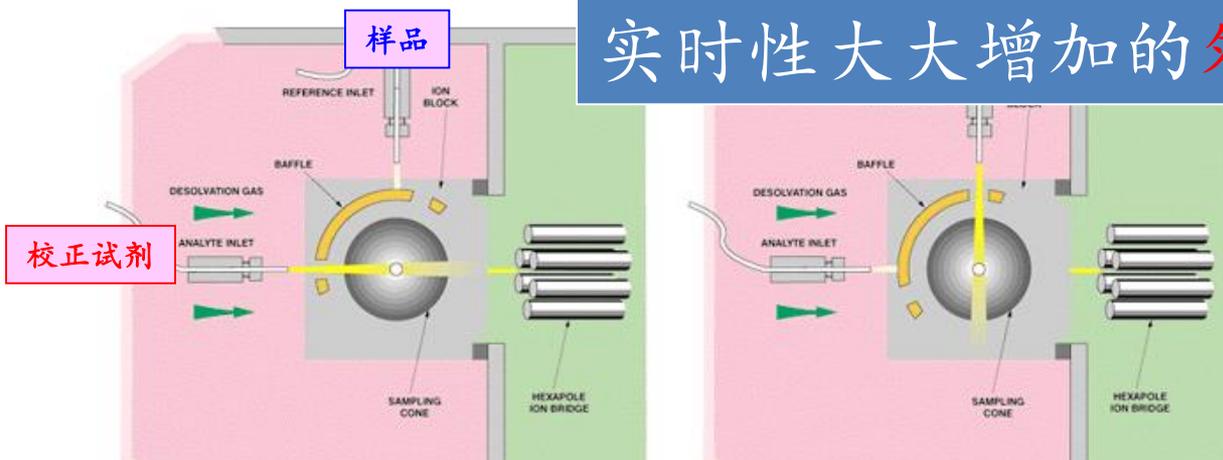


# Waters 专利 LockSpray 技术

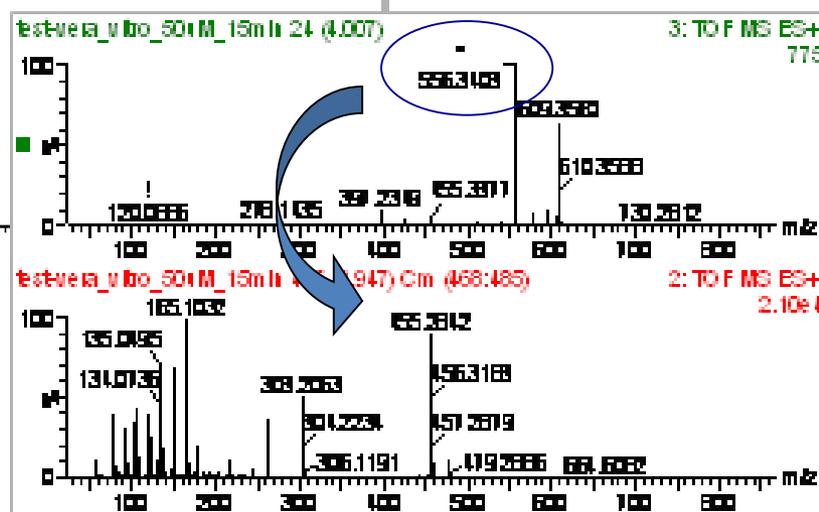
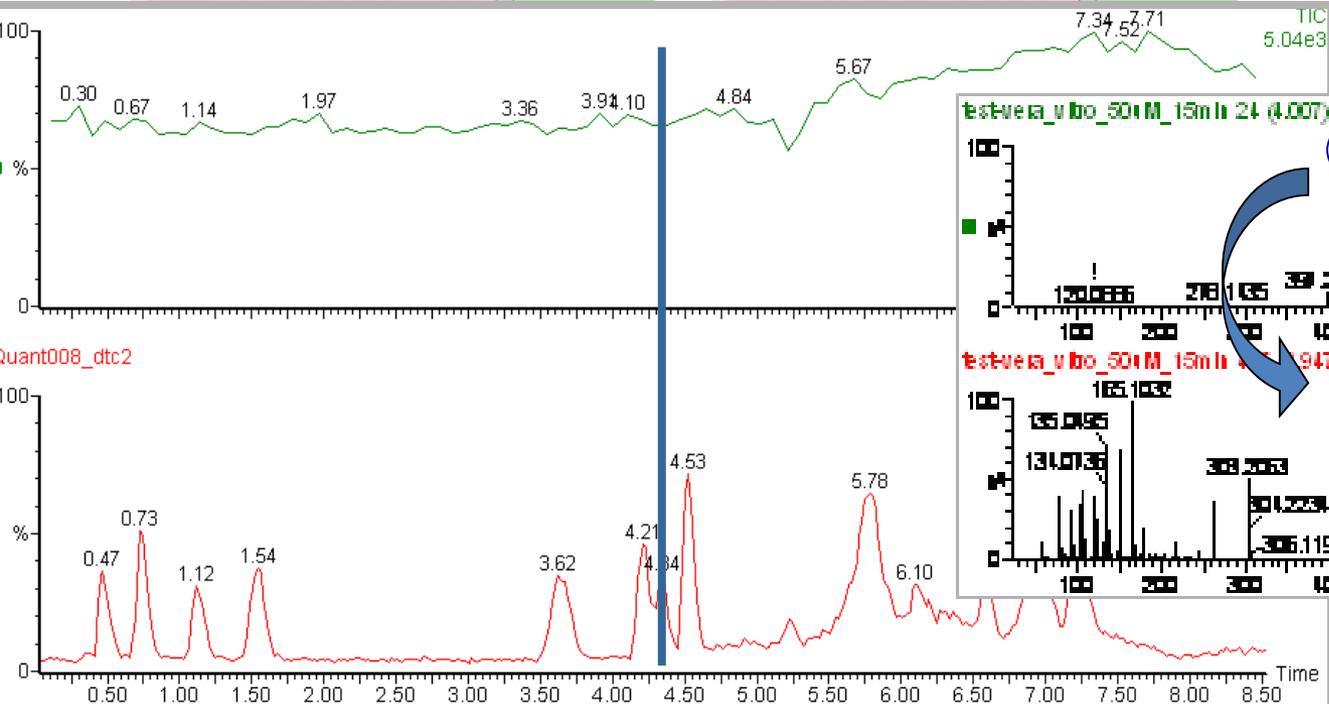
——双 ESI 喷针离子源设计

Waters  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

实时性大大增加的外标法校正技术



- 确保信号的稳定性
- 2. 软件控制挡板旋转频率
- 3. 分别采集样品、标准品的质谱信号
- 信号无相互干扰



# MS<sup>E</sup> Function

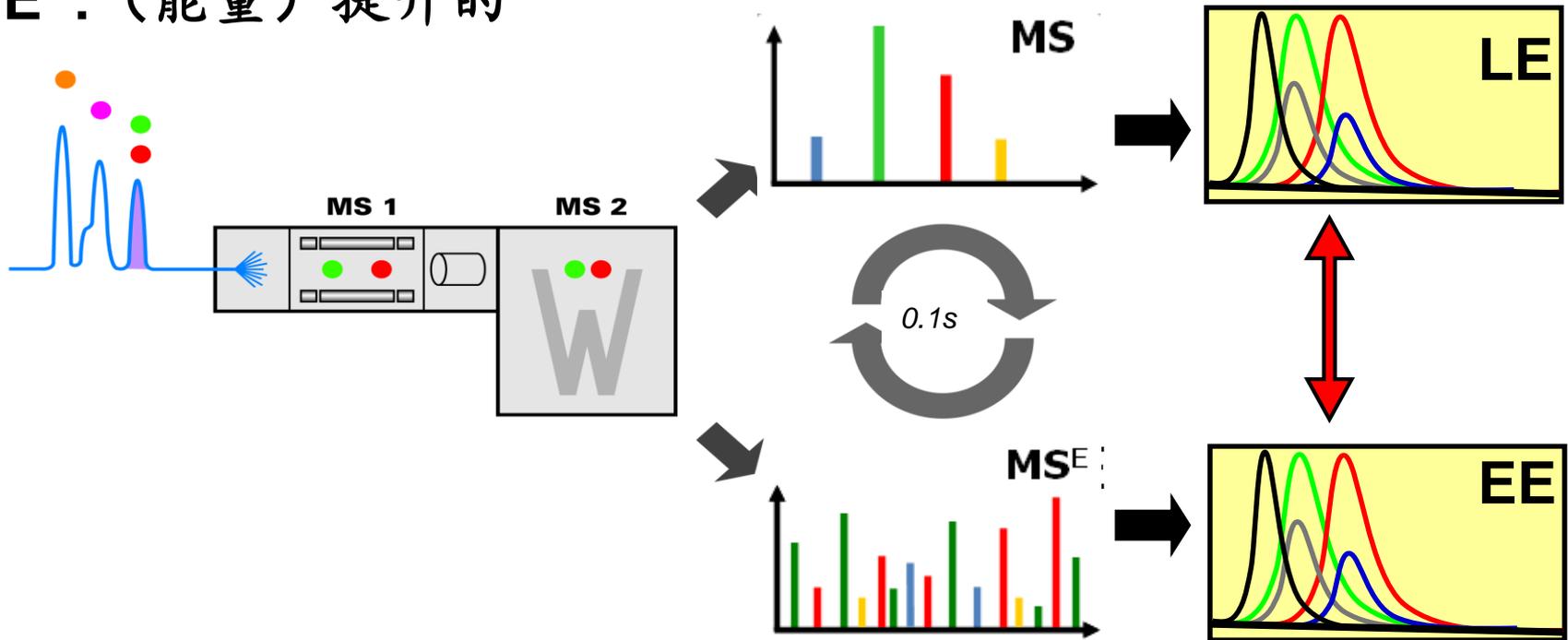
两个功能相互切换:

**Function 1: Low CE spectrum: Parent ions**

**Function 2: High CE spectrum: Fragment ions**

# Waters推荐全时段全信息数据采集：LC-MS<sup>E</sup>

“E”：（能量）提升的



两个功能相互切换：

Function 1, LE : Low CE spectrum, **parent ions**

Function 2, EE : High CE spectrum, **fragment ions**

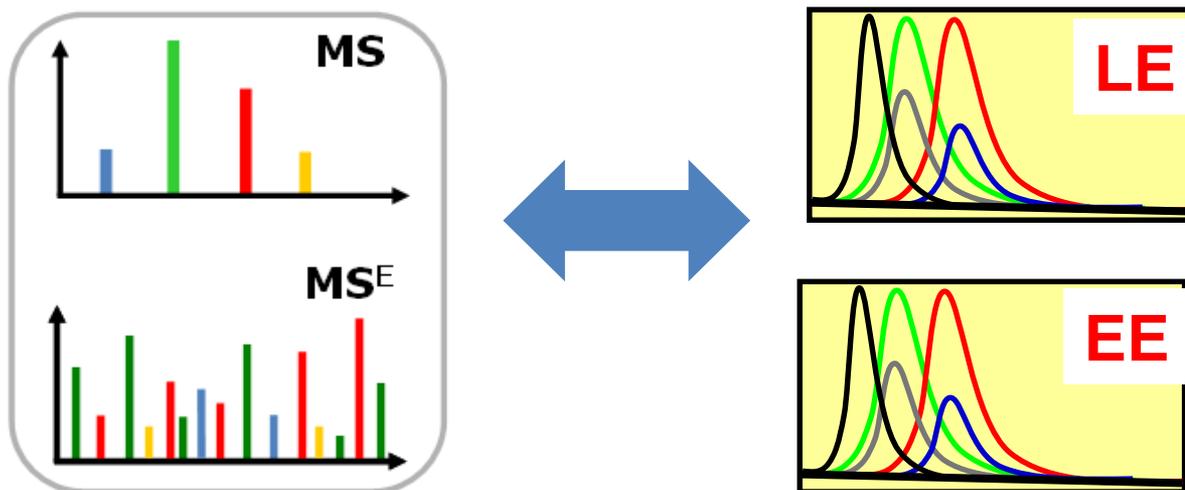
# What is MSE...

基本解析原理： (Waters Patented...)  
母离子与其碎片离子应该具有相同的色谱表现

两个功能相互切换：

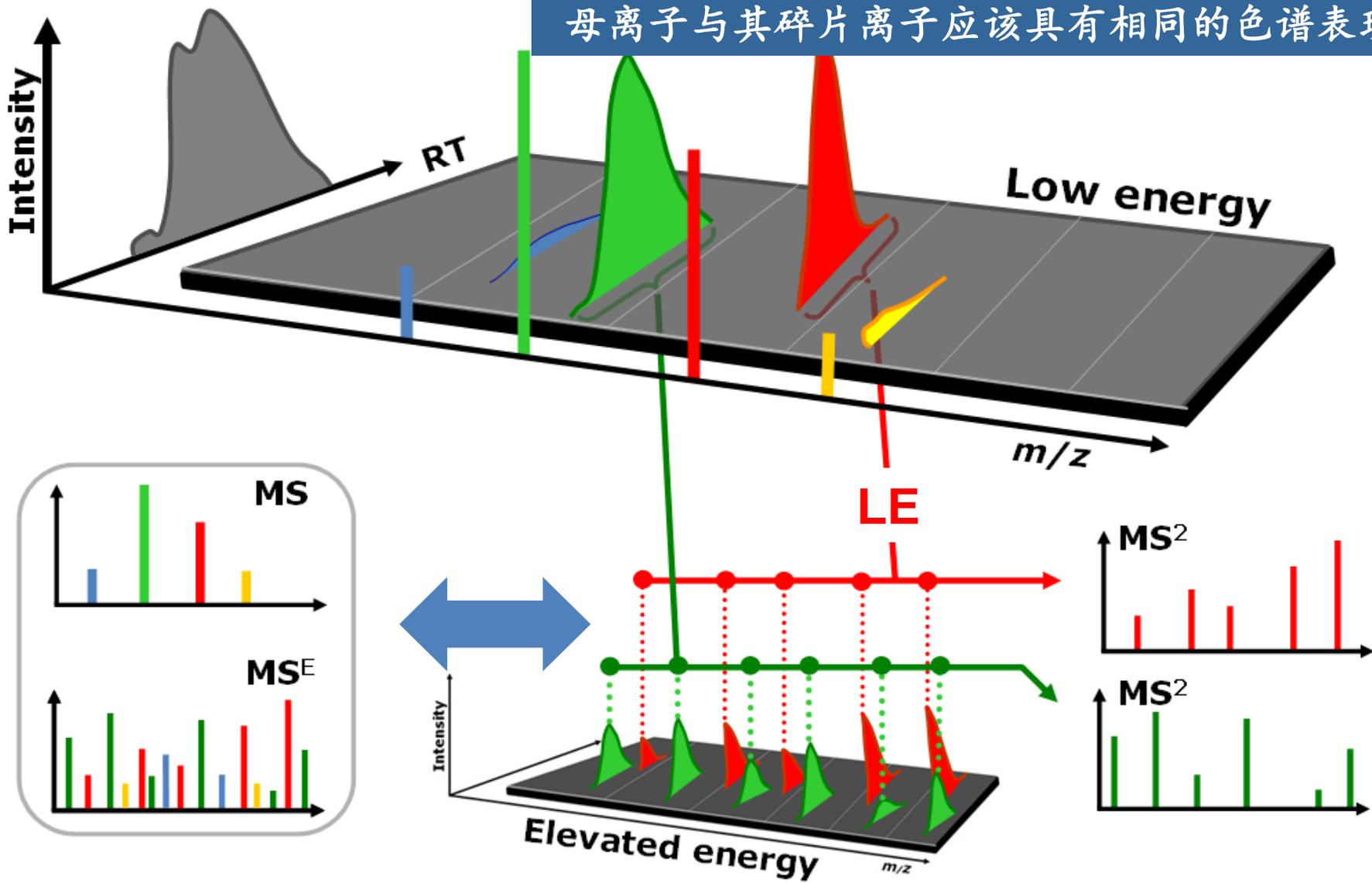
Function 1: Low CE spectrum: parent ions

Function 2: High CE spectrum: fragment ions



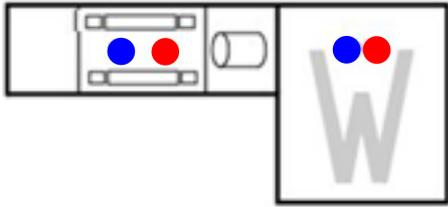
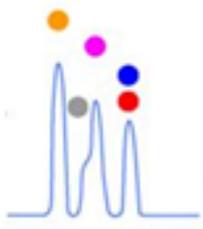
# What is MS<sup>E</sup>...

基本解析原理： (Waters Patented...)  
母离子与其碎片离子应该具有相同的色谱表现

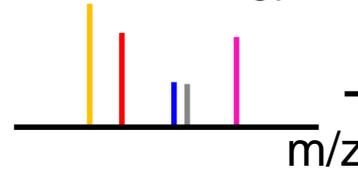


## Ion Mobility enabling: **Synapt/Vion**

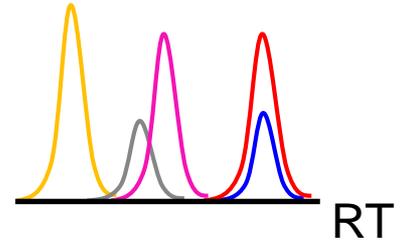
liquid phase separation



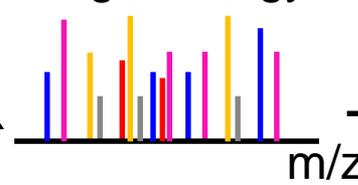
Low Energy



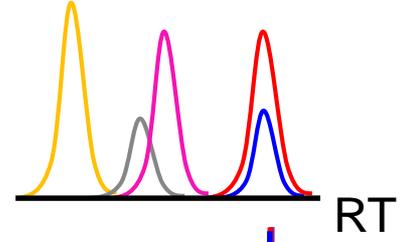
XIC →



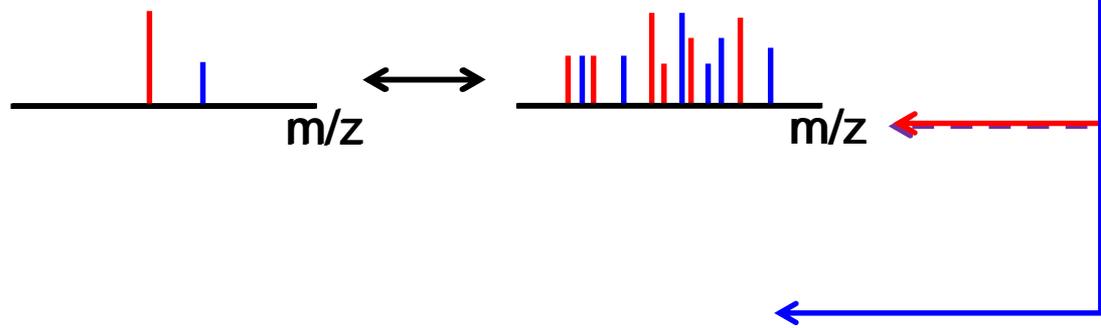
High Energy



XIC →

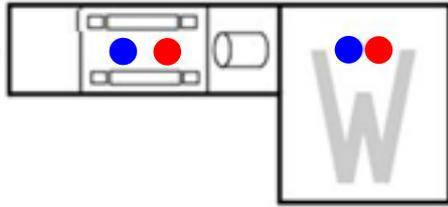
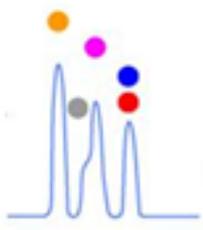


**Drift time**

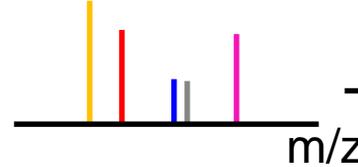


## Ion Mobility enabling: Synapt/Vion

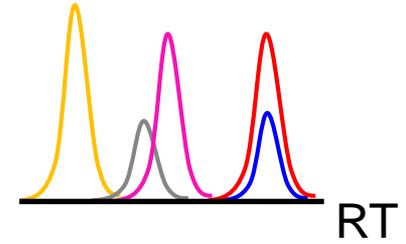
liquid phase separation



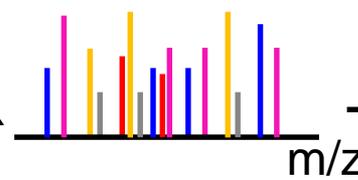
Low Energy



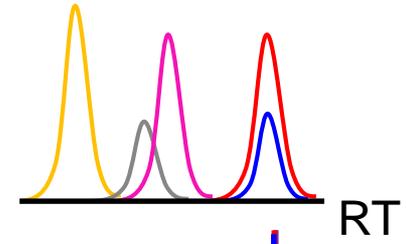
XIC →



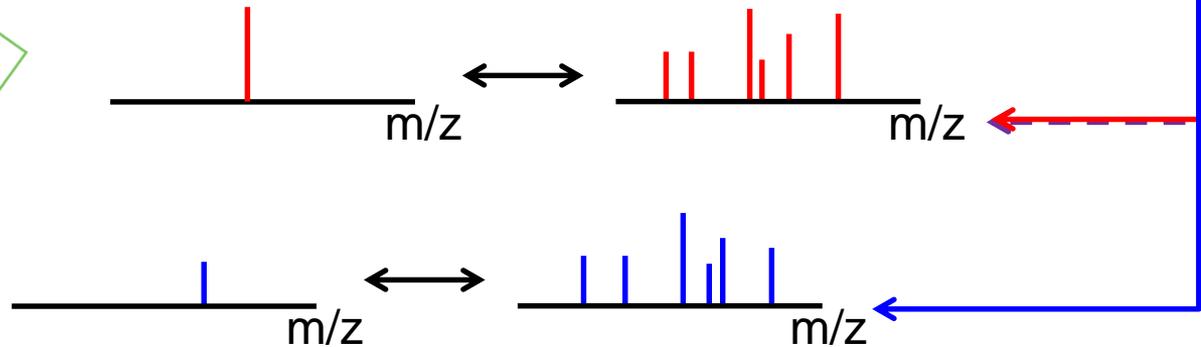
High Energy



XIC →

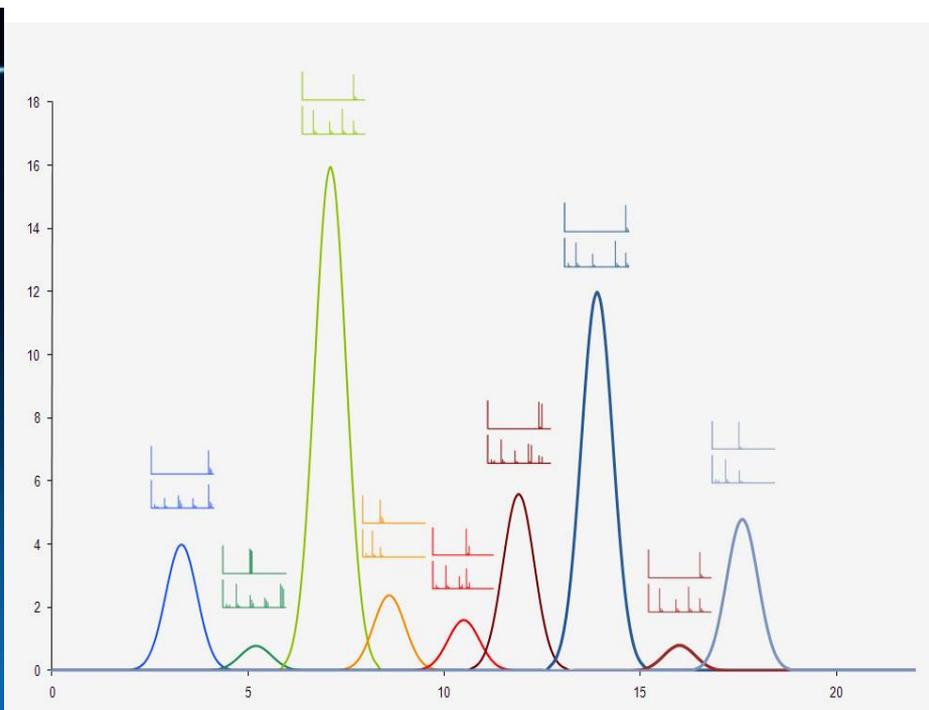
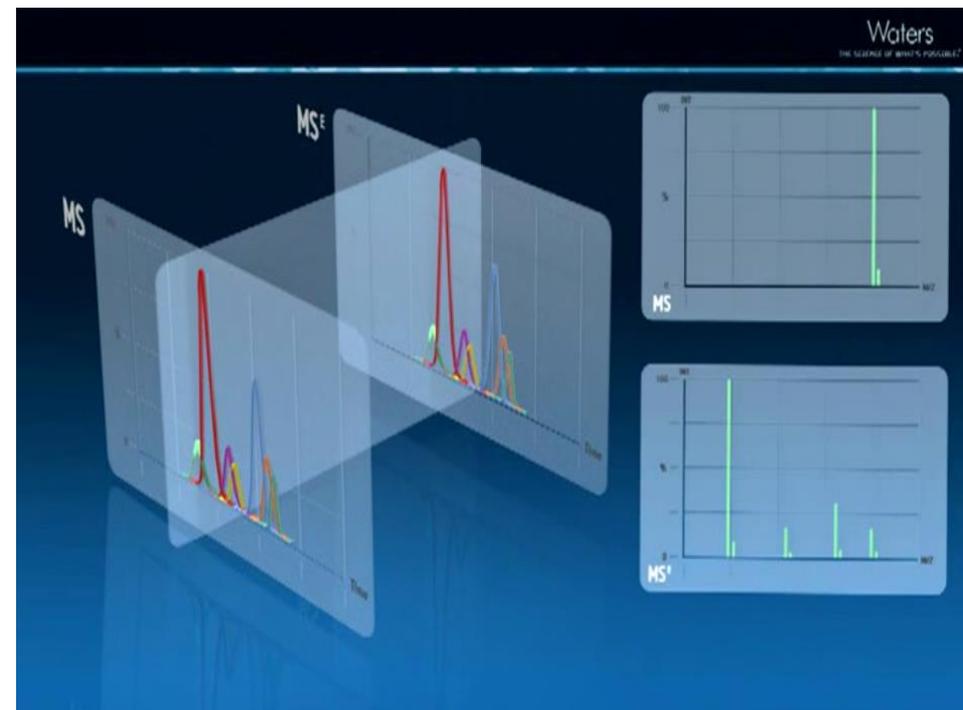


Drift time



## MSE 质谱采集技术特点

- MSE是一种简单实用的专利技术，它可以实现样品进样一次同时得到一级质谱图和丰富的离子碎片信息，其中包括了母离子扫描、子离子扫描和中性丢失扫描的结果，并且避免了信号丢失。



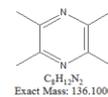
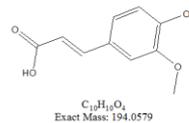
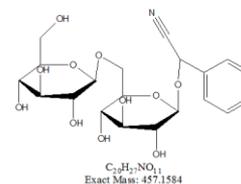
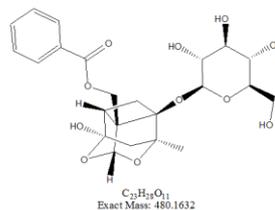
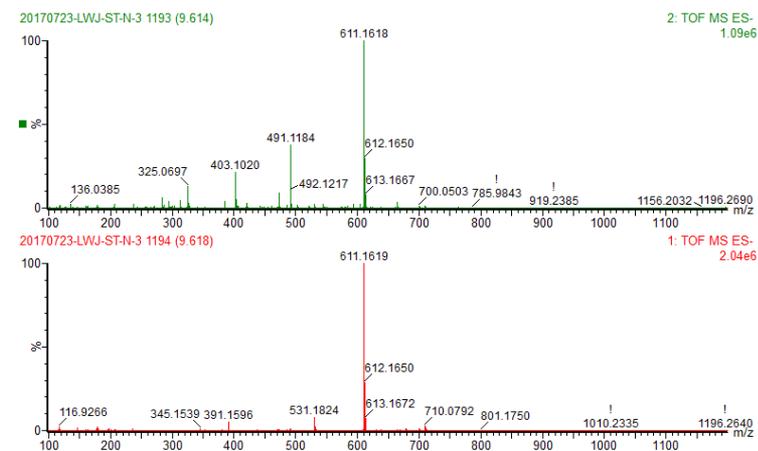
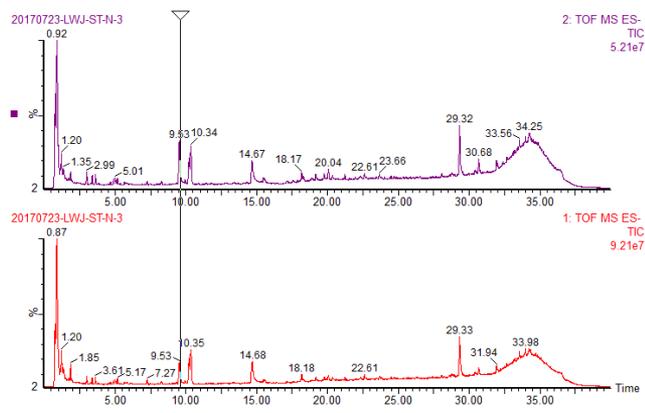
- 1.ESI的原理和特点      气态、离子
  - 2.TOF的原理和特点      高分辨率
  - 3.质谱校正方式      实时外标法质量数校正
  - 4. MS<sup>E</sup> 采集模式      高、低能量切换
- 精确质量数
- 全信息的质谱数据采集

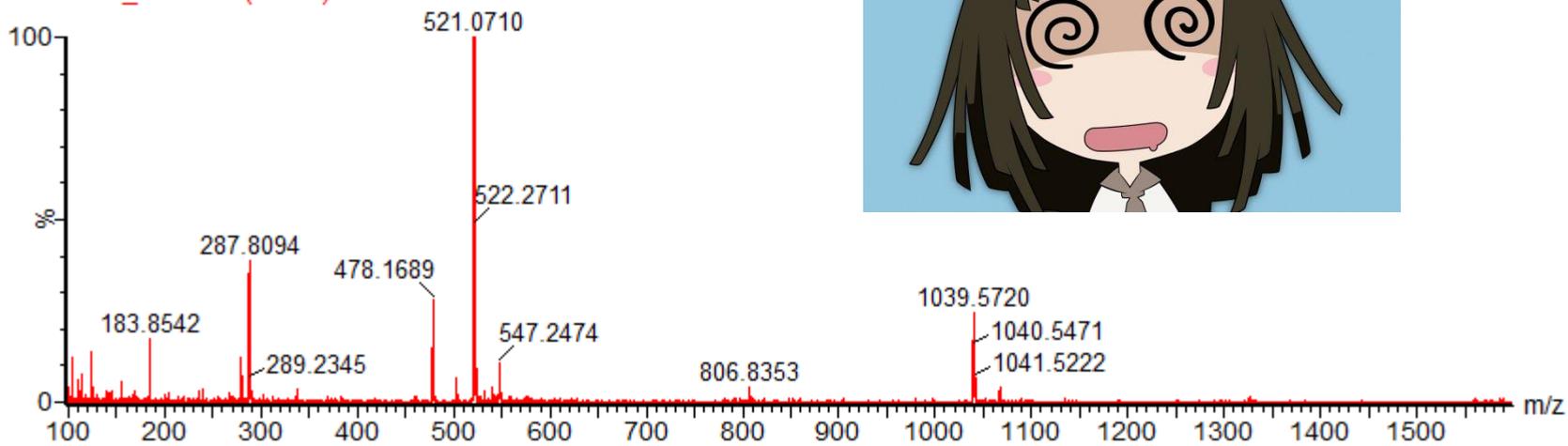
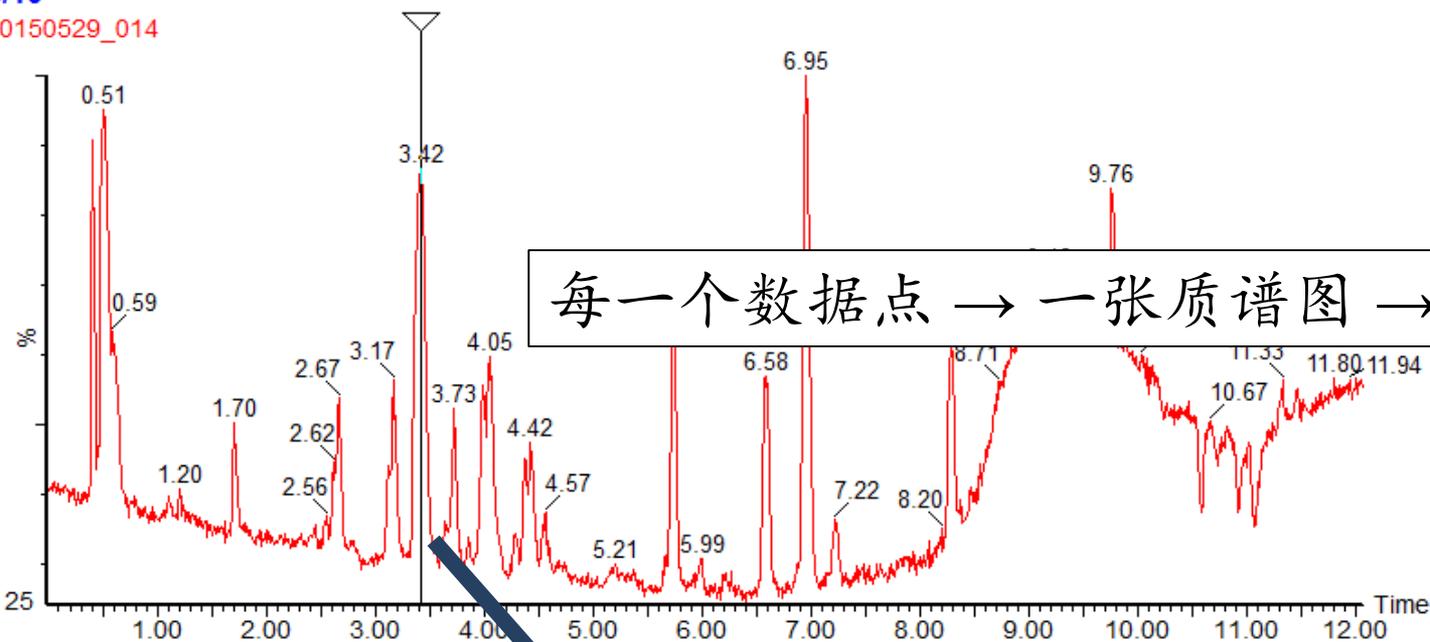
具有精确质量数的**母离子**，可以推测化合物可能的**分子式**  
具有精确质量数的**碎片离子**，可以预测、匹配化合物的**结构式**

用于定性分析、结构解析



# 数据处理





## 复杂体系中化合物的定性分析:

- **目标化合物的定性确认**
  - 知道待分析化合物的列表
  - 而且，拥有每一种化合物的标准品
- **半目标化合物的定性确认**
  - 知道待分析化合物的列表，但是没有标准品
- **非目标（未知）化合物定性鉴定**
  - 不知道待分析化合物的具体信息
  - 需要进行结构鉴定

单位分辨率质谱  
串联四极杆，MRM

高分辨串联质谱系统，全扫描  
配合软件进行数据分析



## 如何进行复杂体系中化合物的定性分析？

- 1、质量数全扫描方式采集数据
- 2、找到感兴趣的m/z 已知、未知
- 3、软件协助寻找，并处理数据

研究、分析的目的

# 如何进行复杂体系中化合物的定性分析？

## 软件协助找到感兴趣的m/z

### ■ 复杂体系中，是否存在某个，或某些已知化合物？

- 药物（农药、兽药、生物毒素...）残留分析
- 添加剂分析
- 中药非法添加分析
- 中药有效成分分析 .....

筛查分析类(Screening)

### ■ 复杂体系中，跟某个化合物相关的一系列化合物？

- 药物的代谢产物鉴定分析
- 化合物的降解产物鉴定分析
- 化合物的杂质在线分析.....

代谢物鉴定类(Met ID)

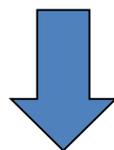
### ■ 不同复杂体系中，统计学方式，寻找差异组分

- 代谢组学研究
- 不同水质分析
- 不同产地的植物差异分析：道地药材...
- 故障产品的错误诊断

代谢组学类  
(Metabolomics)

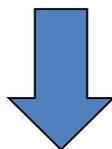
## 化合物定性分析的一般流程

找到了感兴趣的  $m/z$ ,

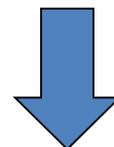


元素组成/分子式

已知: Confirm

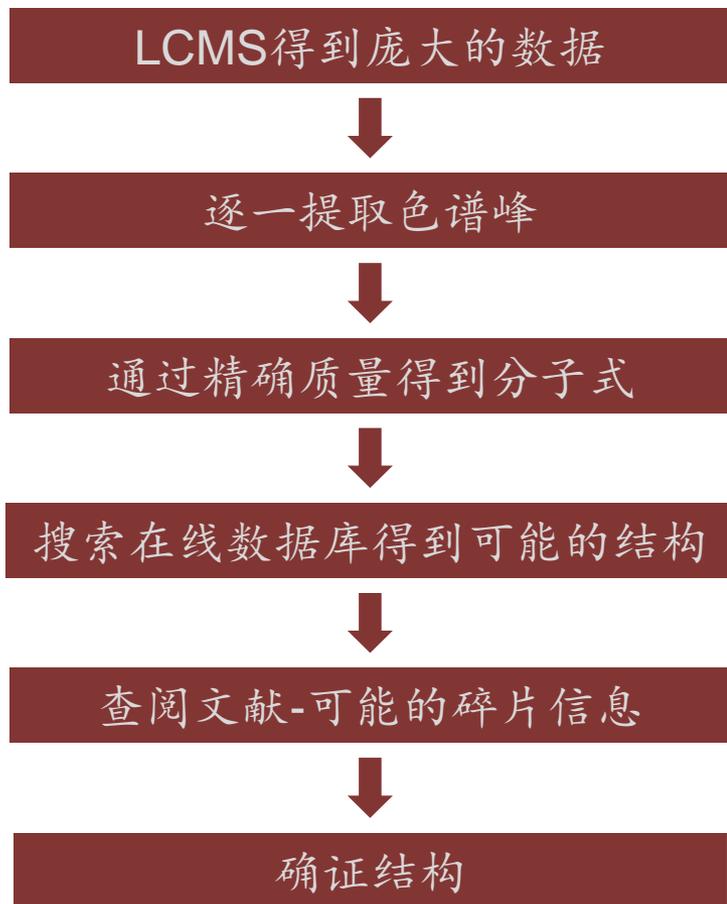


未知: Identify

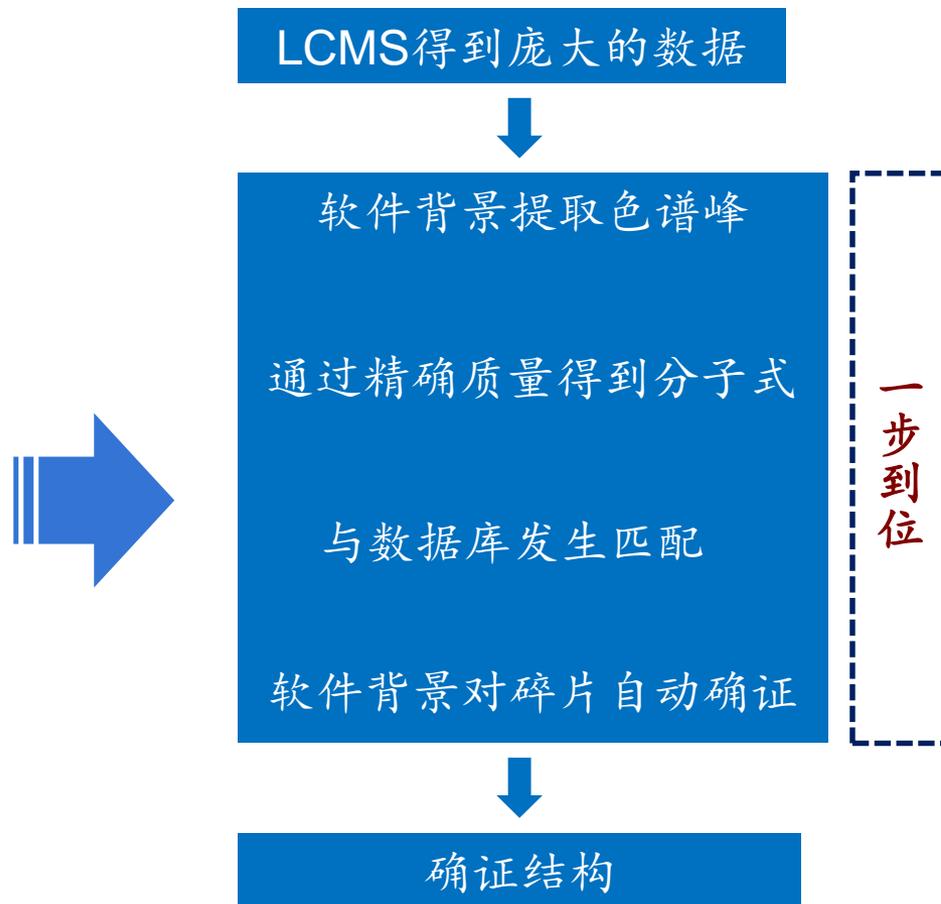


结构式/化合物

## 传统的研究思路



## UNIFI成分谱分析解决方案



# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®