

文件编号: WU-ISCMS-QM 2024C574

版本号: V1.0

受控状态:

分发号:

分子科学公共实验平台

质量管理文件

超高效液相色谱四极杆 飞行时间质谱仪 Agilent 1290 Infinity II-6546 标准操作规程

2025 年 03 月 10 日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 质谱实验室安全管理规范	2
4.1. 进入或离开实验室规定	2
4.2. 实验操作规定	2
4.3. 气瓶使用规定	3
5. 质谱实验室仪器设备管理规范	4
5.1. LC-QTOF (1290 Infinity II-6546)预约与使用	4
5.2. 预约制度	4
5.3. 培训考核制度	6
6. 实验内容	6
6.1. 样品要求	6
6.2. 流动相准备	7
6.3. 仪器认识	7
6.4. 进样前准备	14
6.4.1 液相色谱准备	14
6.4.2 质谱校准	18
6.5. 运行仪器	21
6.5.1 新建液质方法	21
6.5.2 新建采样序列	27
6.5.3 打开并加载液质方法	31
6.5.4 运行采样序列	33
6.6. 数据处理	35
6.6.1. 数据查看	35
6.6.2. 谱图提取及处理	35
6.7. 定性分析	40
6.7.1 计算分子式	40
6.7.2 分子式计算器	41

6.7.3 质量计算器	42
6.8. 报告输出	43
6.9. 实验结束处理	44
7. 相关/支撑性文件	44
8. 记录	44
附件一：Q-TOF 质谱采集方法编辑	45

分子科学公共实验平台

1. 目的

建立超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪(1290 Infinity II-6546)使用操作规程,使其被正确、规范地使用。

2. 范围

本规程适用于所有使用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪(1290 Infinity II-6546)的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况应及时汇报实验室技术员。

3.2. 实验室技术员: 确保操作人员经过相关培训, 并按本规程进行操作。

3.3. 文章致谢格式:

根据学校指导意见, 使用各校级平台仪器设备表征产生的科研成果必须致谢平台。如果您在文章成果中使用了光谱、色质谱、磁共振波谱以及其他属于分子科学平台的仪器设备, 请务必在文末致谢分子科学公共实验平台。

英文文章致谢:

① Acknowledgement: The author thanks (Dr. XXX from) Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences at Westlake University for (the assistance/discussion/supporting in) ... measurement/data interpretation.

② Coauthorship on the resulting publications would be appreciated if our staff make technical contributions (including but not limited to critical sample preparation, novel experiment designation and comprehensive data analyzation).

Affiliation address: "Key Laboratory of Precise Synthesis of Functional Molecules of Zhejiang Province, School of Science, Instrumentation and Service Center for Molecular Sciences, Westlake University, 18 Shilongshan Road, Hangzhou 310024, Zhejiang Province, China."

中文文章致谢:

① 致谢: 感谢西湖大学分子科学公共实验室平台 XXX 博士(或者 XXX 老师)在.....表征或数据分析上提供的帮助。

② 共同作者: 如果分子科学平台老师在您课题组样品表征或文章发表上有重要技术贡献(包括但不限于关键样品制备、新型实验设计和深度数据分析), 我们

感谢您将相关老师列为共同作者, 作者单位地址如下: 西湖大学, 分子科学公共实验平台, 功能分子与精准合成浙江省重点实验室, 杭州, 310030, 浙江。

4. 质谱实验室安全管理规范

4.1. 进入或离开实验室规定

- 4.1.1. 进入实验室之前必须通过学校、中心和平台的安全考试或考核, 严格遵守本实验室的各项安全警示标识。
- 4.1.2. 进入质谱实验室, 请仔细阅读本实验室的安全管理规定。
- 4.1.3. 进入实验室需穿戴实验服, 严禁穿拖鞋、高跟鞋进入实验室, 长发请束发。
- 4.1.4. 进入实验室应了解消防器具与紧急逃生通道位置, 实验室通道及消防紧急通道必须保持畅通。
- 4.1.5. 严禁将自己授权的门卡转借他人, 一旦发现将进行禁用处理。
- 4.1.6. 禁止将实验无关人员带入实验室。
- 4.1.7. 严禁在实验室饮食、吸烟或随意走动。
- 4.1.8. 夜间实验, 需提前告知仪器管理人员, 测试须两人在场, 禁止进行非常规或危险性实验。
- 4.1.9. 为保持实验室内环境温度及湿度稳定, 进入实验室后保持实验室门窗关闭。实验结束后, 实验人员必须进行清场。最后离开实验室人员需检查水、电、门窗等。
- 4.1.10. 严禁戴手套接触门把手或电梯。禁止随意丢弃实验废弃物。
- 4.1.11. 实验室应保持整洁, 严禁摆放与实验无关的个人物品。
- 4.1.12. 空压机及 UPS 所处房间应使用空调, 要保持室内空气干燥, 在潮湿的季节应该除湿。至少每周一次检查除湿机有无积水。

4.2. 实验操作规定

- 4.2.1. 实验室内均为大型科研设备, 有专人负责管理, 未经培训的人员严禁擅自上机使用。
- 4.2.2. 送样或自主上机的用户, 均需使用大仪系统进行系统预约。
- 4.2.3. 请严格按送样要求进行制样。由于样品问题造成色谱柱损坏或仪器配件更换, 无论独立上机或是委托测试, 费用将由用户所在课题组承担;

- 4.2.4. 请严格按仪器操作规程进行操作。实验过程中有任何不确定必须联系技术员, 自主上机因操作错误造成设备或色谱柱等损坏的, 该用户课题组也需承担相关费用。
- 4.2.5. 实验过程中如发现仪器设备发生异常状况、仪器报错、报警等, 务必立即联系仪器负责人严禁擅自处理、调整仪器主要部件, 凡自行拆卸者一经发现将给予严重处罚。
- 4.2.6. 色谱类仪器, 必须根据样品分离方法和要求, 选择合适的色谱柱或设置柱升温程序等, 因用户本人选择色谱柱或柱升温程序设置错误, 导致仪器故障或色谱柱耗材损坏的, 所有费用由课题组全权负责。
- 4.2.7. 仪器均为高压设备, 使用仪器需严格遵守用电安全规定, 严禁擅自更改电路或切断仪器电源等相关危险操作。
- 4.2.8. 实验室内的药品、试剂必须存放药品柜, 并做好使用登记。
- 4.2.9. 使用化学试剂或药品前, 必须了解其物理化学性质、毒性及防护方法, 使用时必须配戴护目镜、手套等, 做好个人防护。
- 4.2.10. 非常规实验测试须技术员同意并指导方可进行。实验数据须通过学校数据中心进行下载, 禁止将个人 U 盘、移动硬盘等易带入病毒的存储设备与各色质谱仪器工作站连接拷贝数据。
- 4.2.11. 垃圾、废液必须严格按标识进行分类, 禁止将锐器、玻璃丢弃在常规垃圾箱中。
- 4.2.12. 自主上机用户须在预约时间内须使用本人的账号登陆基理系统进行仪器使用; 使用结束应做好仪器使用等级, 如实记录仪器使用状态。

4.3. 气瓶使用规定

- 4.3.1. 首次使用实验室气瓶, 须经实验室技术员培训指导。
- 4.3.2. 请按实验室气瓶标识选择正确的气源。
- 4.3.3. 打开气瓶, 先确认管路已连接稳妥, 禁止未接气路或气路未连接稳妥, 开气瓶减压阀。
- 4.3.4. 更换气瓶, 首先确保减压阀关闭, 且管路中气压排空归零, 先用扳手拧松后, 再用手旋下管路。换气瓶, 确认气瓶螺纹吻合后, 先手紧气体管路, 再用扳手拧 1/8 圈左右。

- 4.3.5. 开气瓶或更换气瓶, 禁止站在减压阀出气口正前方。
- 4.3.6. 测试过程中, 请根据需要及时更换气瓶。使用者应根据气瓶使用情况, 变更气瓶使用牌状态“满瓶”“使用中”“空瓶”等。
- 4.3.7. 气瓶应保持正立并固定。

5. 质谱实验室仪器设备管理规范

5.1. LC-QTOF (1290 Infinity II-6546)预约与使用

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则, 面向校内所有教学、科研单位开放使用; 根据使用机时适当收取费用; 并在保障校内使用的同时, 面向社会开放。

该仪器的使用实行预约制度, 请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”(以下简称大仪网)进行预约, 并按照规定要求登记预约信息。

1. 委托测试

- ① 送样前与仪器负责人沟通样品信息、测试需求及可能的测试方法。
- ② 请在大仪网进行送样预约并将制备好的样品交给仪器负责人。
- ③ 测试结果请自行在数据中心进行下载。
- ④ 样品如需回收请在送样时告知, 并在测试后尽快取回, 一周未取回平台将作化学废弃物处理。

2. 自主上机

- ① 质谱仪器培训通常需要两小时, 申请培训前先与仪器负责人联系。
- ② 请在大仪网预约培训机时, 并提前阅读 SOP, 培训时请携带纸质版仪器培训申请表。
- ③ 技术员进行现场培训。
- ④ 培训后两周内, 用户可在技术员指导下用实际样品进行上机测试, 并按自主上机计费; 根据自身掌握情况, 用户需在两周内进行上机考核, 考核通过的用户即获得自主上机权限, 原则上一星期复考; 未考核或考核不通过的用户, 需重新接受培训。获取自主上机权限, 但超过三个月未进行使用的用户, 上机应联系管理员协助测试或者重新考核。

5.2. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作, 根据测试内容与时间的不同, 实验室仪器需进行网上预约制度。超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪(1290 Infinity II-6546)自主上机用户需根据预约制度登陆大仪共享网站最少提前 30 分钟预约机时, 包括周末; 寒暑假及法定节假日请关注实验室实时通知。特殊实验, 应提前告知技术员, 并在其指导下完成测试。

请严格遵守预约时间使用仪器, 以免浪费机时。如需调换时间段, 在技术员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者, 请提前 30 分钟取消预约并通知技术员。恶意预约机时或有多次无故不遵预约时间的用户, 实验室将进行批评教育、通报批评或取消上机资格等处罚。

预约时段		预约时间	测试内容
周一至周日	09:00 至 22:00	不限制	液质分析

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训, 考核合格后方可上机使用;
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记, 结束后如实记录仪器状态; 如仪器出现故障, 应立即通知技术员, 并在第一时间将故障及错误提示信息截屏, 并保存在桌面“Error Report”文件夹中, 截屏文件命名请按照“导师名-用户名-样品名-故障时间(具体到分钟)”; 在《仪器设备使用记录本》的备注栏做简单说明。
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障, 使用者须及时通知技术员, 以便尽快维修或报修, 隐瞒不报者将被追究责任, 加重处理;
- (4) 因人为原因造成仪器故障的 (如硬件损坏), 用户课题组须承担维修费用;
- (5) 本实验室所有原始数据不允许在仪器工作站上删改, 禁止用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。用户应根据要求通过学校数据服务器 Storage 传送下载原始数据至本地电脑, 以保存并做数据处理; 实验数据在本实验室电脑中至少保留 2 年。
- (6) 用户应保持实验区域的卫生清洁, 测试完毕请及时带走样品, 技术员不负责保管。

使用者若违犯以上条例, 将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3. 培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请, 由技术员安排时间进行培训, 培训内容包括仪器使用规章制度、送样须知及安全规范、基本硬件知识、标准操作规程(自主测试)及相应数据处理。

培训结束后, 两周内培训者需管理人员监督下进行 5 次左右操作, 培训者根据自己的掌握程度, 联系技术员进行上机考核。初级考核合格后, 可在管理人员监督下上机操作, 一周后复考。

本仪器为高精密设备, 为保障用户人身安全和仪器规范操作, 考核后超过一个月无使用记录的自主上机用户, 上机前需提前联系技术员进行上机协助或视情况进行复考。

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后, 给予培训者授权在所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果因为人为操作错误导致仪器故障者, 除按要求承担维修费用之外, 给予重考惩罚、培训费翻倍。

对接受培训人员的核心要求:

- (1) 了解超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪(1290 Infinity II-6546)的基本原理及其应用的多学科背景知识;
- (2) 熟练掌握 Control Panel 软件系统, 严格按照标准操作规程操作, 防止因人为操作不当造成仪器故障, 认真做好仪器的使用及故障记录。

6. 实验内容

6.1. 样品要求

- (1) 去盐: 因质谱离子源不耐盐, 严禁测试含无机盐、缓冲溶液、无机强酸强碱的样品, 否则不仅影响仪器性能, 增加设备硬件故障的风险, 而且会导致样品不被检出。除盐方式, 不清楚的请优先咨询技术员。
- (2) 样品溶剂: 乙腈/甲醇/水或以上两种混合溶剂, 建议使用 LC-MS/HPLC 级别的试剂或者超纯水。禁止用二氯甲烷、氯仿、DMSO、DMF、THF 等特殊有机溶剂; 样品中禁止含三苯基膦、表面活性剂、离子液体类化合物。
- (3) 严禁用核磁的样品溶液直接上样;

- (4) 小分子样品测试, 请提前除去大分子蛋白、核酸及聚合物; 蛋白样品测试, 需提前明确蛋白可能分子量, 以免色谱柱选择不合适
- (5) 样品浓度: 1-2 ppm (1 ppm=1 μ g/g);
- (6) 样品量: 0.5-1.5 ml;
- (7) 最终上机样品溶液需进行 0.22 微米滤膜过滤; 不适合进行过滤的样品, 请进行超速离心处理 (11000 rpm, 20 min)。在吸取上清液时避免沉淀物污染;
- (8) 样品瓶: 标准液相色谱 2 ml 小瓶; 待测溶液不足 0.5 ml, 建议使用内衬管+2ml 样品瓶组合装样方式;
- (9) 使用预开口的样品盖;
- (10) 其他: 需要进行液相分离的样品, 实验室只提供通用性好的常规色谱柱, 如不符合样品分离要求, 建议用户自行购买, 且须做到专柱专用, 禁止与其他仪器共用。

注意: 由于用户的样品问题导致仪器异常或配件更换, 所有责任将由用户及所在课题组或单位承担。

6.2. 流动相准备

自主上机用户, 测试前请提前联系仪器管理员, 确认仪器状态、样品条件、色谱柱和流动相。洗针液及常规流动相请参见以下成分及比例:

- (1) 水相: 超纯水, 管路标签为A1/A2;
- (2) 有机相: LC-MS级别乙腈或者甲醇, 常用乙腈, 管路标签为B1/B2 (系统耐超高压1300 bar);
- (3) Seal wash泵: 一般为10-20% IPA或CH₃OH, 用于柱塞杆密封件润湿。
- (4) 常用的流动相 pH 添加剂: 甲酸、乙酸 (浓度不超过 0.2%)、甲酸铵、乙酸铵 (浓度不超过 20mM)、氨水。
- (5) 禁止使用磷酸、磷酸盐缓冲溶液、离子对试剂;
- (6) 禁止使用三氟乙酸、三乙胺。

6.3. 仪器认识

***基理系统登陆

接入大仪网的仪器操作电脑均需要登陆基理锁屏界面。

- (1) 如图 (a), 如界面显示“一卡通用户”, 请在 Account 输入预约者的一卡通账户,

Password 栏输入相应账户密码, 点击 Submit;

注意: 如账号或密码输入错误, 请按键盘 Delete 键进行删除, 再重新输入; 禁止点击 Cancel, 否则仪器会自行关机。

如不能正常登录, 请核对预约仪器、登录账号、密码以及登录的时间是否在预约时间内, 如以上均无误, 请联系负责的老师。

(2) 如图 (b), 如界面显示“LIMS User”, Account 显示 Administrator, 请与相关老师联系。



6.3.1. 软件认识

超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪有两个常用软件: Qualitative Analysis 10.0软件和Control Panel软件。软件图标参见图6-1, 一般放于电脑桌面。

相关软件介绍如下:

- Qualitative Analysis 10.0为数据分析定性软件, 可以进行数据分析处理、结果导出等。
- Control Panel软件主要功能: 仪器控制、方法编辑、数据采集与保存等, 因此仪器运行及测试主要使用Control Panel软件。



图6-1 操作软件 (左) 及定性软件 (右)

- Control Panel软件界面分布:

Control Panel软件界面显示参见图6-2, 软件右下角有三个选项: Instrument, Projects以及Administrator。Project为项目文件, 本质上为一个大的文件夹, 包括方法文件、结果文件、标曲等。

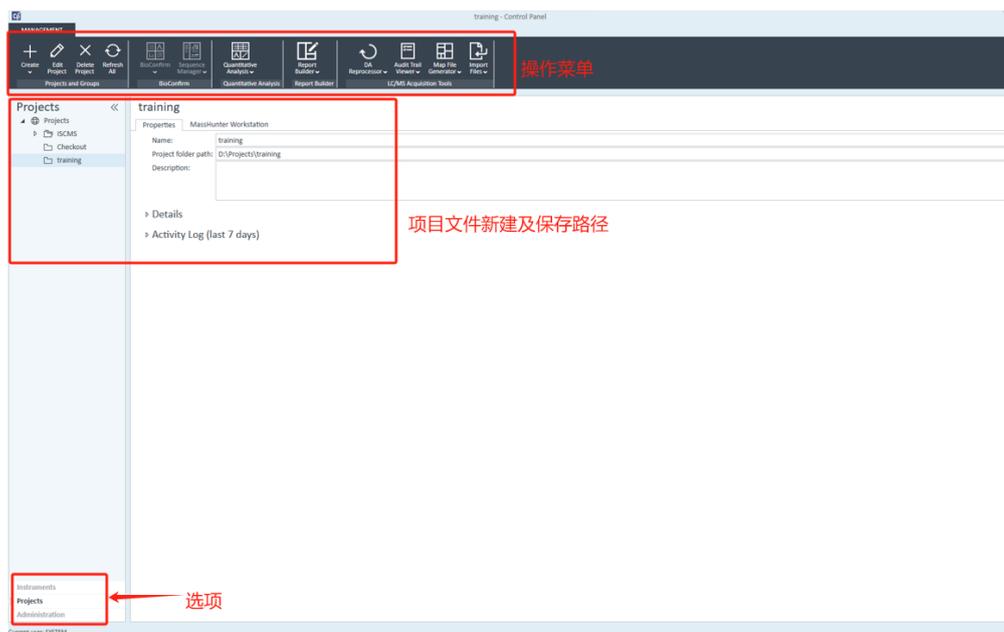
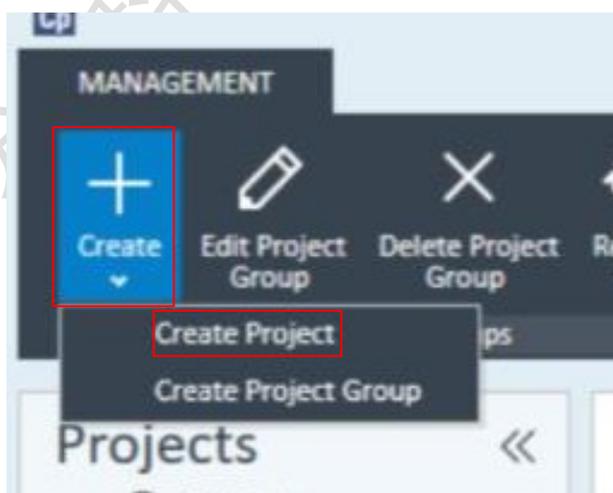


图6-2 Control Panel软件界面显示

➤ 新建项目文件：

新用户首先新建项目/组：软件右下角选择Projects，点击右上角Create---Create Project, 在Name中输入项目名称, 并在Project folder path 点击Browse浏览, 选择存储路径。本仪器的数据存储路径为：
D:\Agilent_LC-Q-TOF_data\ISCMS\iscmsbackup-iscmsbackup；勾选 MassHunter Station，点击OK。



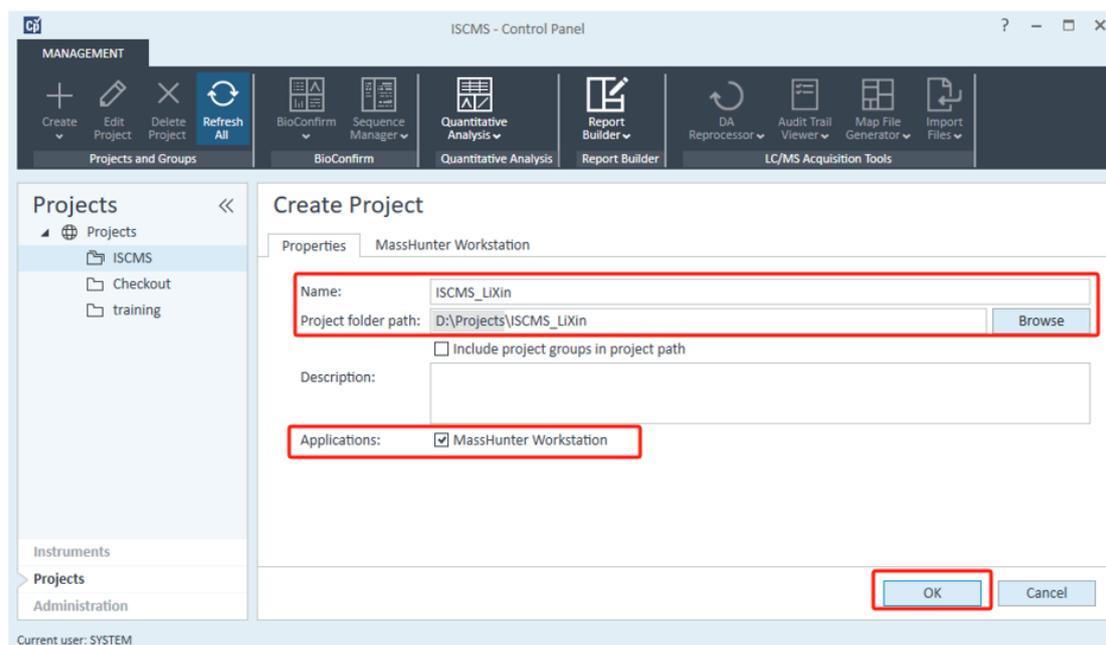


图6-3 新用户创建项目组及项目

6.3.2. 仪器硬件组成

如图 6-4 所示, 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱仪由液相色谱、飞行时间质谱、电脑、泵组等组成, 此外还包括外置的 UPS 电源和气瓶保证仪器正常运行。液相色谱由液相泵模块、自动进样器模块和柱温箱模块组成。

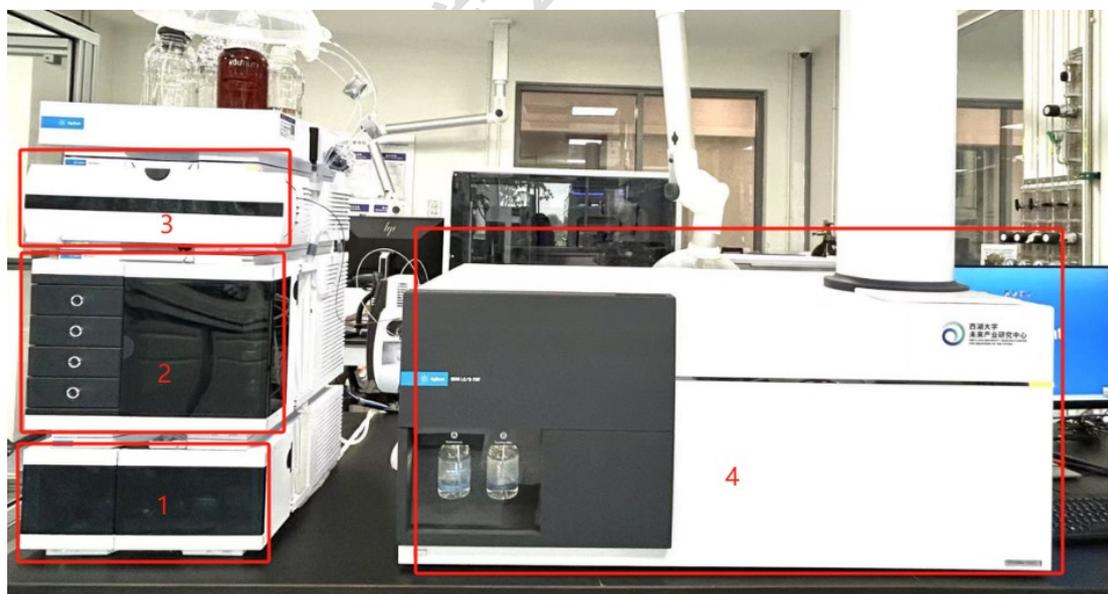


图6-4 仪器整体构造

6.3.2.1. 液相色谱----二元泵①

➤ 流动相A (管路标签A1/A2): A为水相, 使用超纯水, 一般一天一换, 最长

不超过两天;

- 流动相 B (管路标签 B1/B2): B 为有机相, 建议使用进口品牌 (Fisher/Merck/Honeywell等) LC-MS级的乙腈或者甲醇。通常使用乙腈, 具体需考虑样品体系。体积足够的情况, 一般可保存20天以内。
- Seal wash泵: 进行柱塞杆、密封圈润湿, 一般为高比例的水, 加入10-20% IPA 或CH₃OH。
- 洗针液: 洗针液分为A-S1、B-S2、C-S3, 用来清洗针外壁; 洗针液一般为高比例有机相, 比如H₂O:有机相=10: 90, 有机相可为乙腈、甲醇或者异丙醇。

注意:

(1) 流动相酸碱添加剂: 通常为高纯的 (建议用 LC-MS) 甲酸、乙酸 (浓度不超过 0.2%, 通常为 0.1%) 或者甲酸铵、乙酸铵 (浓度不超过 20 mM) 或者氨水。酸碱应考虑实际样品体系选择性添加。禁止使用磷酸、磷酸盐等无机盐缓冲溶液、离子对试剂; 禁止使用三氟乙酸、三乙胺;

(2) 更换流动相操作须带手套并做好个人防护, 移出的所有管路不要落地或接触台面;

(3) 更换流动相需对瓶子进行涮洗, 不要在剩余流动相中加入新流动相。配置流动相需要超声 5 分钟左右进行脱气;

(4) 准备好的流动相应瓶子做好标记。标注成分、日期和姓名。

6.3.2.2. 液相色谱----自动进样器②

自动进样器用于放置样品和仪器自动进样, 自动进样器共包含4个样品室, 每个样品室可容纳2个样品盘。计量泵为20微升, 最大进样体积20微升, 常规样品进样体积为2 μl。自动进样器温度范围为4-40 °C。温度不敏感的物品, 可不设置温度; 温度敏感的物品, 建议设置为10 °C或者15 °C。

- 开样品室: 正常情况下, 样品室门显示白灯, 将样品室的门轻轻往里推, 门便自动弹开, 再用手往外轻拉样品室即可。
- 样品盘编号: 如图6-5 (b) 所示, 自下而上, 从外 (靠近样品室门) 到内, 8个样品盘的依次为P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8。自动进样器的垂直方向还有 STD 1-5的标准品位置。
- 样品盘说明: 样品盘实物图参见图6-5(c), 标配的样品盘位5行*9列, 行标A-F,

列标1-9, (字母及数字在实际样品盘上有显示), 共54个样品位。

- 放回样品盘: 按上述说明, 图中黄色五角星的位置为A1, 放回样品盘, 须确保实际的A1位置与样品盘底座A1位置一致(图6-5(d)), 另外要确保样品盘完整的放进了底座, 没有突出或者倾斜。

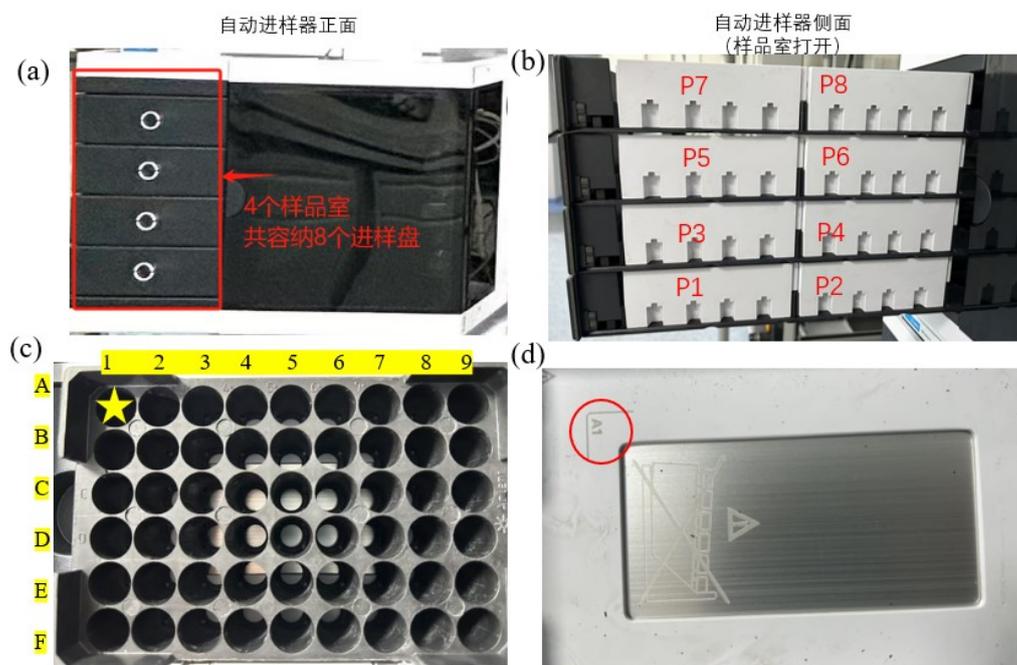


图6-5 自动进样器样品盘

6.3.2.3. 液相色谱----柱温箱③

柱温箱用于放置色谱柱, 设置固定温度后, 保证样品在恒定的温度条件下洗脱。如图6-6, 轻轻往里摁一下黑色半圆开关, 即可打开柱温箱的门, 内部显示如下图所示。本柱温箱可以容纳多根色谱柱, 有两个进样位置: Position 1 (左) 和Position 2 (右)。左右两个柱温箱可独立控温, 温度范围: 0-80 °C (本仪器柱温箱可以降温)。

连接色谱柱应先手拧快速连接接头和色谱柱一端, 关闭卡扣进行锁定, 再去连接另一端。更换色谱柱, 务必联系管理员现场指导。注意色谱柱入口方向远离六通阀, 参见图6-6。

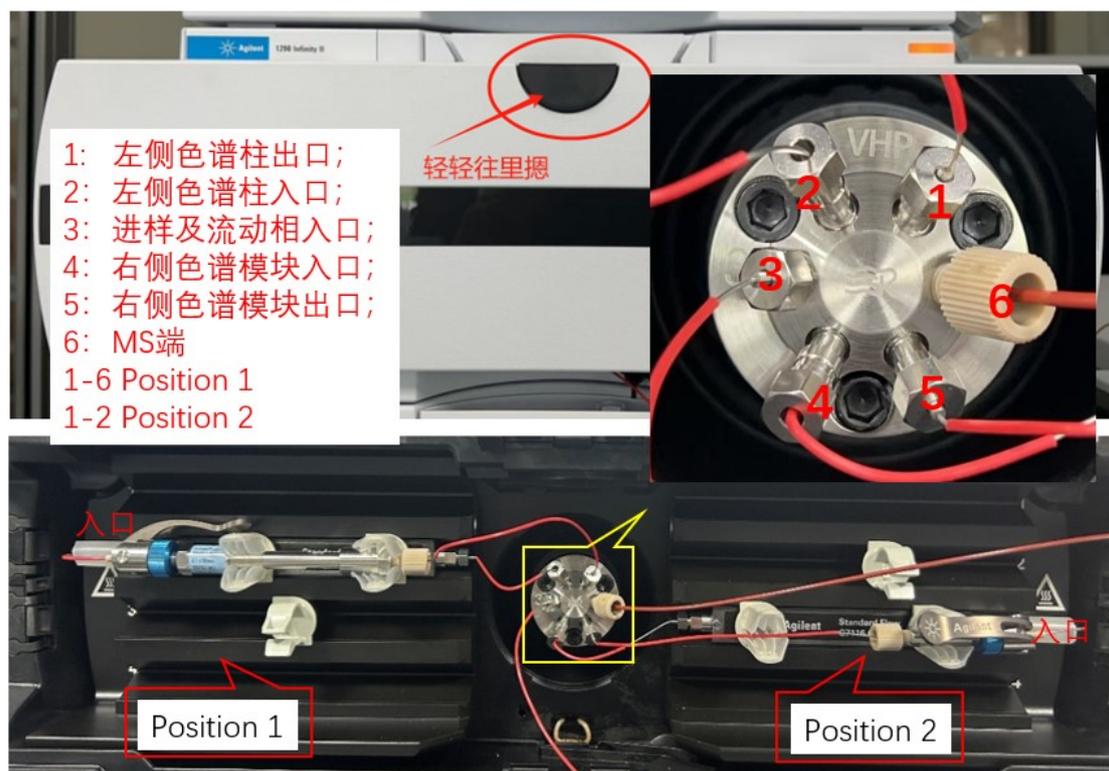


图6-6 柱温箱实物图

6.3.2.4. 质谱④

图6-7为质谱仪构造示意图及实物图。

如图6-7 (a)：调谐液(B瓶)，质谱调谐或校准的时候用到的溶液，校正整体质量轴；参比液(A瓶)：质谱标准物质溶液，样品测试时，该参比溶液与样品溶液同时进入质谱，起到实时校正的作用，以获得更好质量精度的测试结果。

Q-TOF仪器的主要组成及各部分的作用，说明如下：

- 离子源：将分析物中的中性化合物离子化，将产生的离子在电场的作用下传输进入离子毛细管。本仪器标配的是电喷雾离子源（ESI），另外还增配了大气压化学电离源（APCI）。
- 离子传输毛细管：离子导入通道，将离子源产生的离子传输进入质谱。同时，隔离外部的常压与质谱内部的真空系统。
- 离子光学组件：包括Skimmer，八极杆以及Lens1和Lens2。进一步除去溶剂和中性分子，并聚焦随机运动的离子进入四极杆。
- 四极杆：质量过滤器，双曲线的四极杆优化离子传输和质谱分辨率。可以选择让某些质荷比的离子依次通过或者所有的离子全通过，
- 碰撞池：六极杆设计具有线性加速度的碰撞在极短的停留时间仍可消除交叉

干扰。有助于捕获碎片离子。

- 离子束整形器：将随机运动的离子压缩为一个薄层，进入飞行管。减少离子在纵向的扩散，提高分辨率。
- 脉冲发生器：产生高频的进间电压，使离子纵向加速进入飞行管。
- 飞行管：离子在飞行管内纵向飞行，不同离子的质荷比通过飞行时间的不同而区分，
- 检测器：包括微电路板、闪烁器和光电倍增器。高增益，寿命长，线性范围宽。

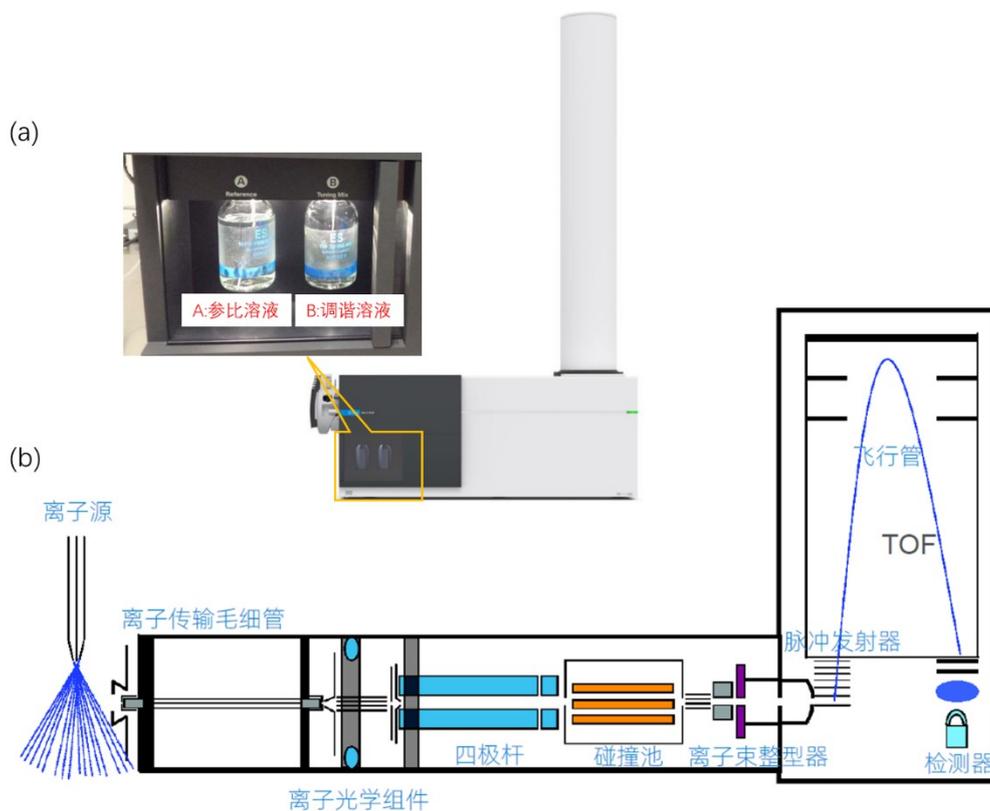


图6-7 质谱仪构造示意图

6.4. 进样前准备

测试前，除了按要求准备好样品、放样并更换流动相外，还需要进行液相和质谱的准备工作，具体说明如下：

6.4.1 液相色谱准备

1. 如图6-8，双击桌面图标打开Openlab Control Panel(软件默认是打开状态)---在Control Panel中右下角选择Instrument，然后选择自己新建的Project---点击Launch，打开采集工作站。如图6-9所示，打开采集工作站显示界面左上角

显示Home, Acquisition和Tune选项。在Acquisition选项, 可以进行液相色谱相关的准备工作、方法新建、方法打开以及仪器状态(如系统压力)查看。如果不能选择自己的Project文件, 请参考步骤2详细说明, 断开仪器与当前其他用户的项目文件, 重新打开。

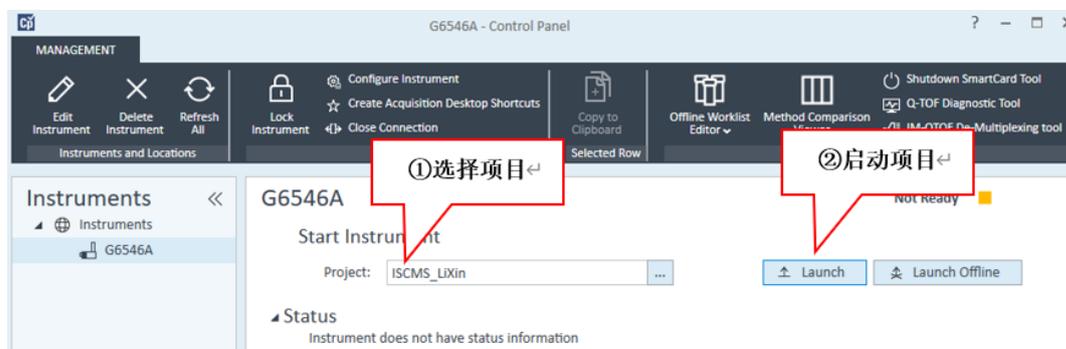


图6-8 Project-Launch启动项目操作

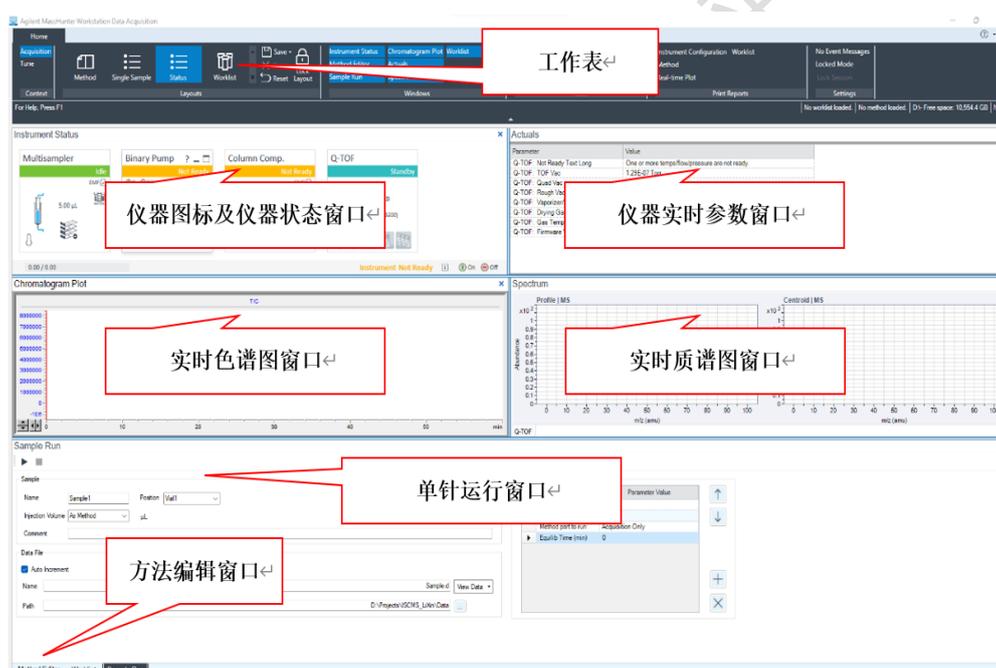
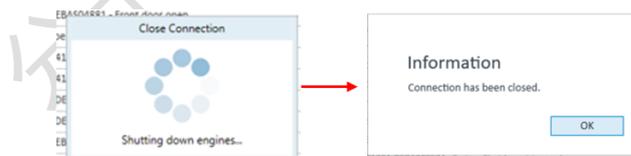
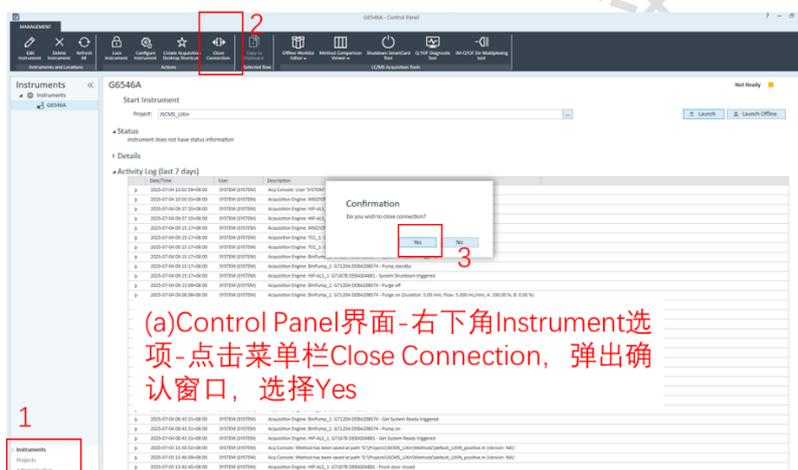
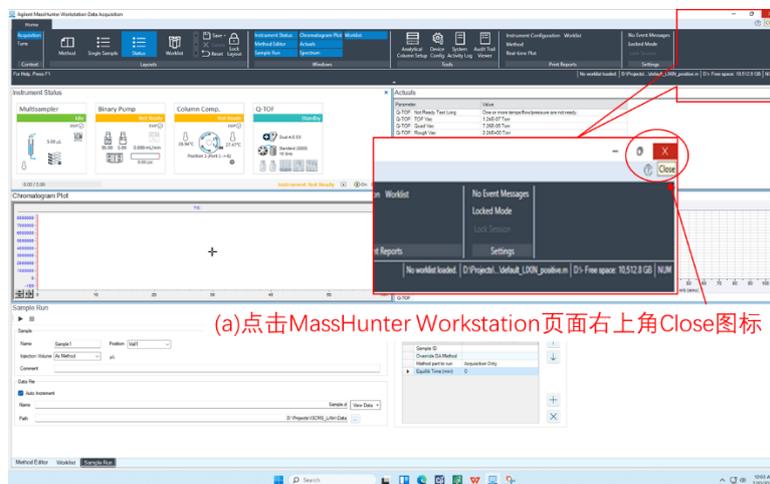


图6-9 采集工作站显示界面

2. 如果不能选择自己的 Project 文件并成功 Launch 到 Masshunter Workstation, 需要先断开仪器工作站与当前其他用户的项目文件, 重新打开, 操作参见图 6-10: (a) 确认仪器为非运行待机状态, 点击 MassHunter Workstation 页面右上角 Close 图标; (b) 回到 Control Panel 界面, 选择右下角 Instrument 选项后, 点击菜单栏 Close Connection, 弹出确认关闭连接确认窗口, 选择 Yes。(c) 随后软件启动关闭进行连接进程, 请耐心等待过程

结束, 不要点击其他界面, 直至弹出 Information 窗口-Connection has been closed; (d) 同步骤 1, 在 Control Panel 中右下角选择 Instrument---选择自己新建的 Project---OK 之后, 点击 Launch, 打开采集工作站。



(c)耐心等待进程结束至连接断开完成。

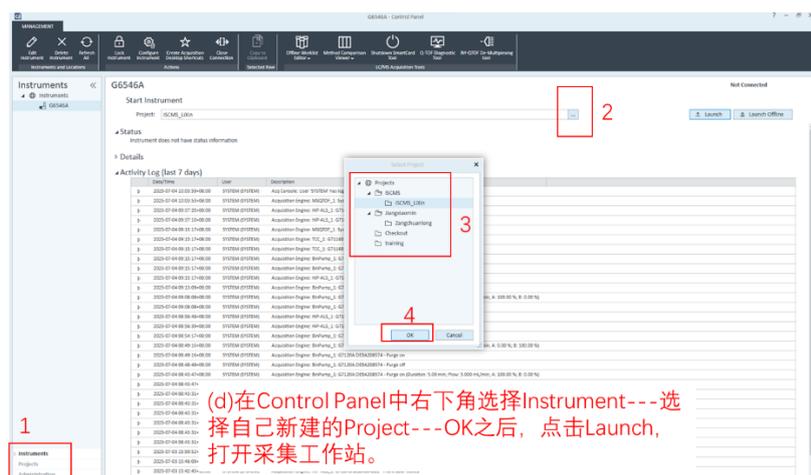


图6-10 断开项目文件连接

3. 灌注: 如图6-11, 选择Binary Pump图标 (请注意瓶子上的流路代号, A1/A2,B1/B2,如果不是自己所用的流路, 可点击Switch Solvent Selection Valve A/B进行更换) -右键---Prepare Pump---Purge界面设置排空泵速5 mL/min, A:B=50%:50%比例, 灌注10 min (若更换新液, 100%A和B依次排空, 各5min); 若有气泡: 可依次进行Conditioning---Start; 结束后Prime---Start; 最后再设定Purge---Start。

注: 1) Prepare Pump: 用于排掉管路中的气泡, 或者更换不同的流动相时使用。2) Purge: 用于日常的流动相排气泡, 在更换流动相或者每天刚开机的时候使用。3) Conditioning: 用于减小系统的压力波动, 使用液相方法, 流动相会通过液相流路及色谱柱。4) Prime: 用于比较剧烈的冲洗, 如果系统中有明显的气泡, 在做Purge无法除去时建议使用。5) Seal Wash Prime: 冲洗柱塞清洗流路。柱塞清洗使用10%的异丙醇水溶液。在1290 infinity II系统中, 柱塞杆清洗默认打开, 且不可循环使用异丙醇清洗液。

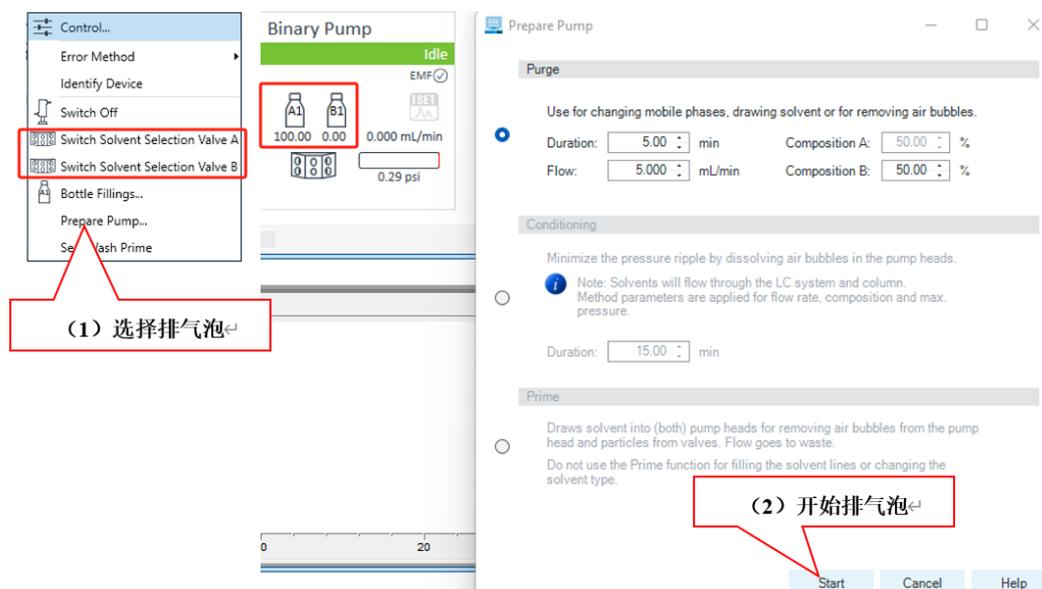


图6-11 液相色谱灌注流动相操作

6.4.2 质谱校准

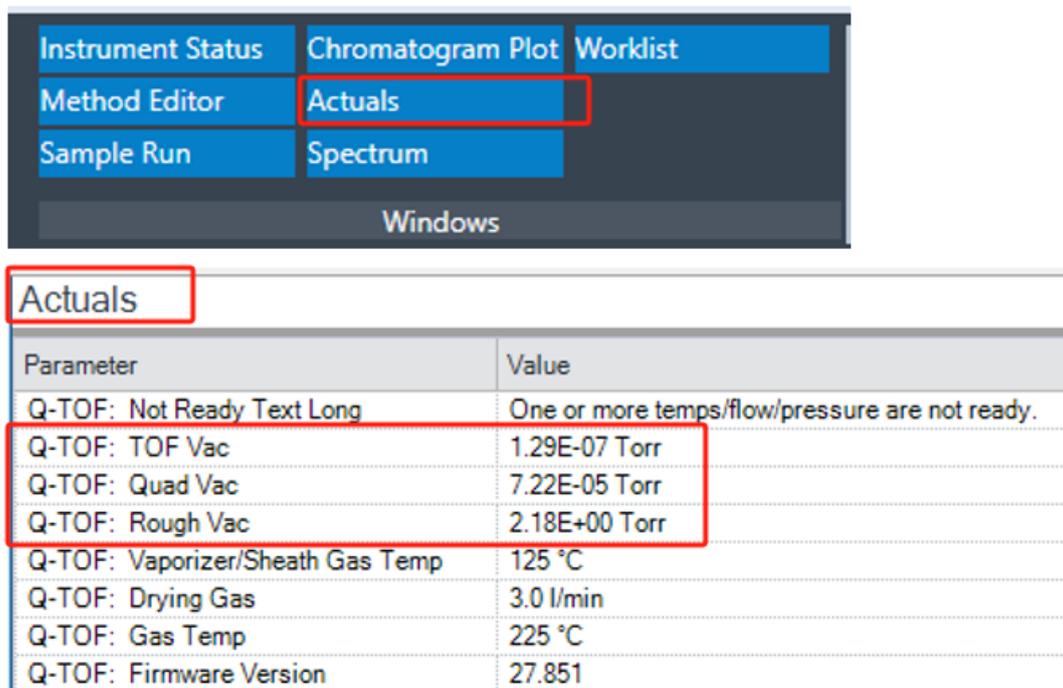
本部分内容一般由仪器负责人完成，不作为用户自主上机考核内容。实验前请联系老师进行校正。

飞行时间质谱随温湿度等环境变化测试精度变化较为明显，建议每天进行仪器校正，具体校正步骤说明如下：

1. 请检查质谱指示灯是否为绿色，氮气流量正常（普氮：墙上左二出口，7 bar；高纯氮气：气体钢瓶0.15 MPa）；质谱真空度正常（点击工作站上层Actuals选项，TOF Vac为 10^{-7} torr，Quad Vac为 10^{-5} torr数量级，参见图6-13）



图6-12



Parameter	Value
Q-TOF: Not Ready Text Long	One or more temps/flow/pressure are not ready.
Q-TOF: TOF Vac	1.29E-07 Torr
Q-TOF: Quad Vac	7.22E-05 Torr
Q-TOF: Rough Vac	2.18E+00 Torr
Q-TOF: Vaporizer/Sheath Gas Temp	125 °C
Q-TOF: Drying Gas	3.0 l/min
Q-TOF: Gas Temp	225 °C
Q-TOF: Firmware Version	27.851

图6-13

- 在Control Panel界面左上角, 点击Tune选项切换到质谱调谐界面切换到Tune界面。打开质谱, 等待质谱进入Ready状态5分钟以上; 选择将要校准的极性, 选择TOF, 并点击Mass Calibration/Check; 点击Start TOF Mass Calibration开始校准; 完成后将自动生成报告, 报告存储在D:\Masshunter\Tune\QTOF\Reports\Stage里, 报告中的Corrected Residuals应小于1 ppm, 校正有效。



③选择要校准的极性: 正离子或负离子
---TOF---Mass Calibration/Check

④点击开始校准

⑤弹出质谱调谐结果

Theoretical	Actual	Time	Abundance	Calibration Abundance	Resolution	Primary Residuals	Corrected Residuals
118.086255	118.086255	32.409966	722.963	430.634	12.571	-3.26	0.00
322.048121	322.048113	52.868922	1,294.733	429.825	19.515	-1.19	-0.03
622.028960	622.029010	73.084716	1,062.515	412.193	27.078	0.04	0.08
922.009798	922.009748	88.760980	1,347.304	416.941	28.200	0.18	-0.06
1221.990637	1221.990591	102.033427	1,168.008	404.271	30.401	0.20	-0.04
1521.971475	1521.971479	113.754177	987.406	388.584	32.922	0.15	0.00
1821.952313	1821.952453	124.366311	656.104	442.613	33.340	0.12	0.08
2121.933152	2121.932996	134.135189	969.711	396.893	34.393	-0.11	-0.07
2421.913990	2421.914119	143.234703	833.288	384.412	35.038	-0.02	0.05
2721.894829	2721.894789	151.786080	904.004	457.012	34.916	-0.06	-0.02

图6-14质谱校准

切换到Acquisition界面，仪器状态确定对话框中选择Yes；再次确定；点击Yes保存调谐文件。

⑤点击 Yes

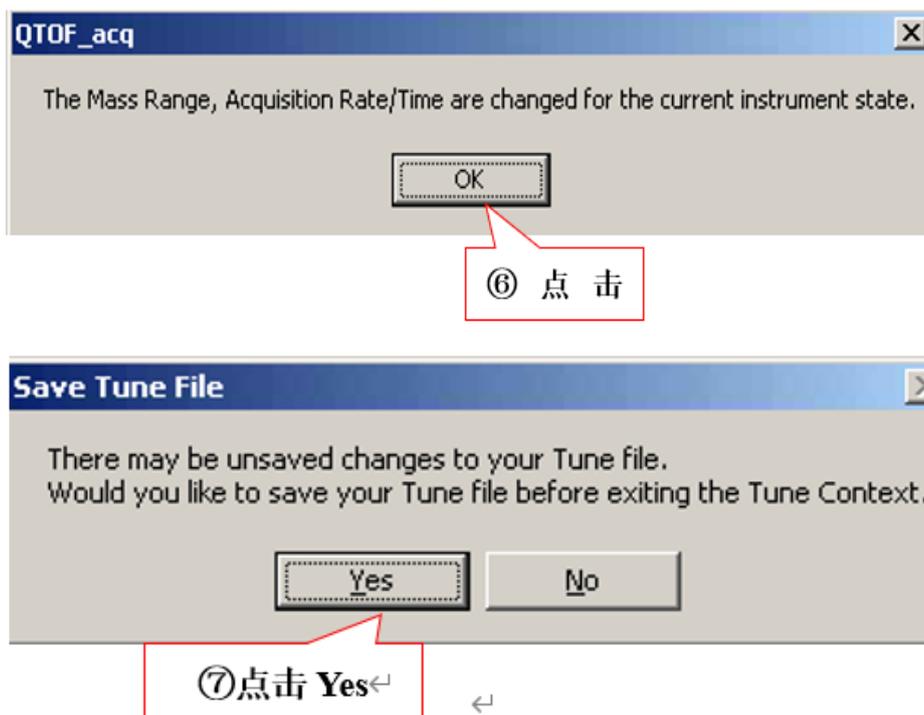


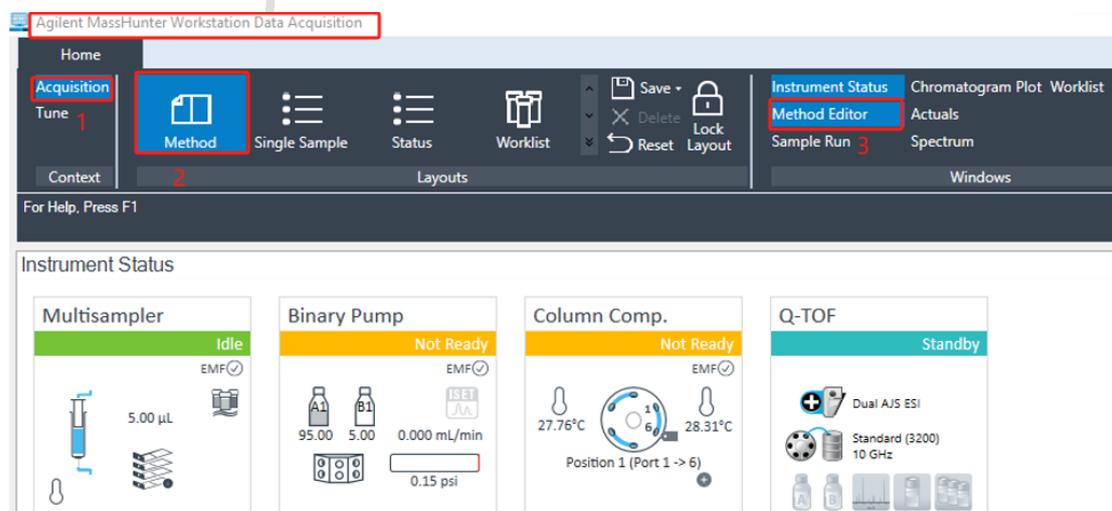
图6-15 保存调谐文件

实验思路: 准备新鲜流动相→确认色谱柱类型→准备样品(稀释过0.22微米滤膜)→灌注A/B→调用方法发送给仪器→等待系统平衡→质谱校正→新建采样序列→运行采样序列→数据处理及导出

6.5. 运行仪器

6.5.1 新建液质方法

Step1. 在 MassHunter Workstation 界面 Acquisition 模式下, 选中 Method---Method Editor, 点击 , 新建方法;



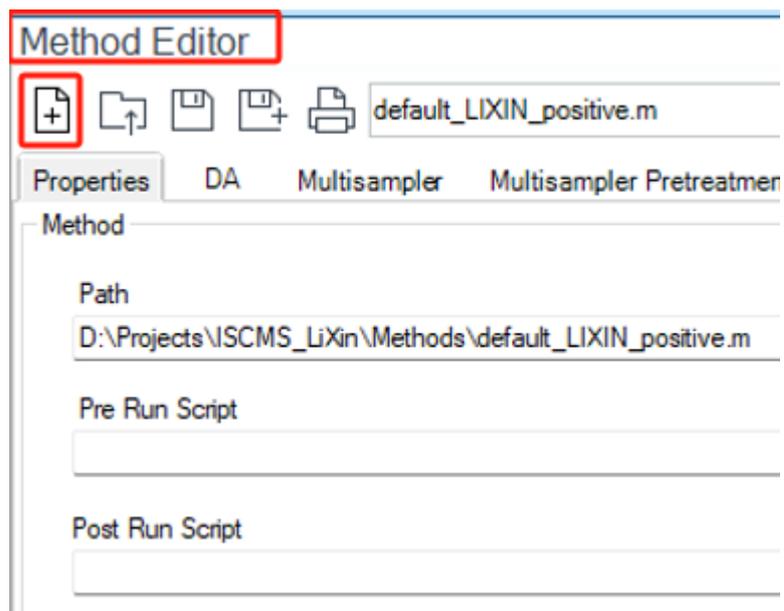


图6-16

- Step 2. 依次设置 Properties, DA, Multisampler, Multisampler Pretreatment, Binary Pump, Column Comp 以及 Q-TOF 等, 以下依次说明:

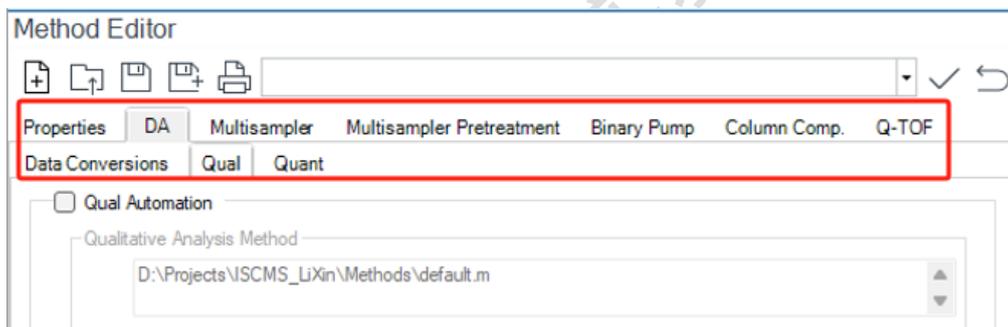


图6-17

- (1) **Properties:** 主要设置Path方法保存的路径和方法运行时间。保存路径, 可以在最后一步方法保存中指定路径, 在Properties设置中进行跳过。一般保存在用户文件夹Method子文件中。方法运行时间会包括上样时间, 软件自行填充, 无需人为设置。

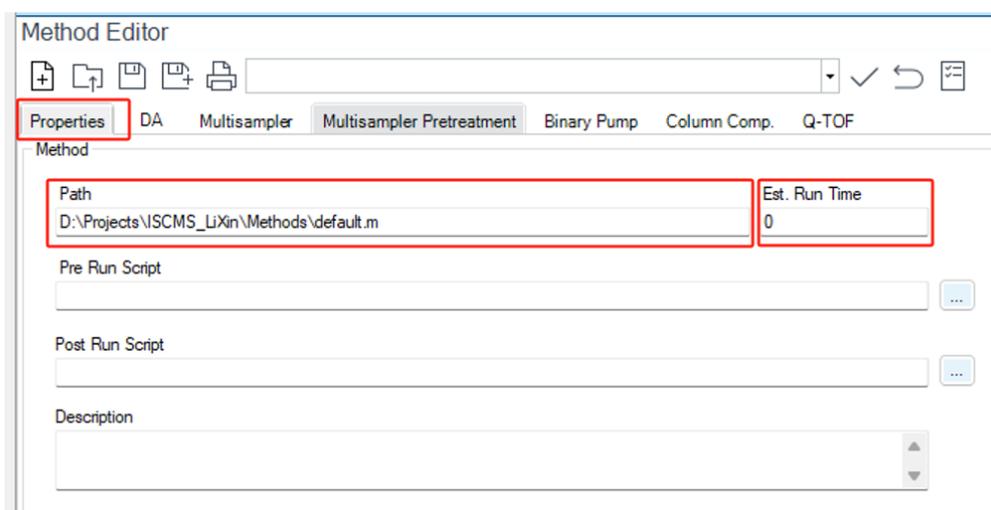


图6-18

- (2) **DA:** 请勿设置。主要用于数据转化或者利用已采集的特定方法进行定性定量数据处理，一般无需设置。如需进行设置，必须确保数据处理方法无误，否则运行序列会报错。

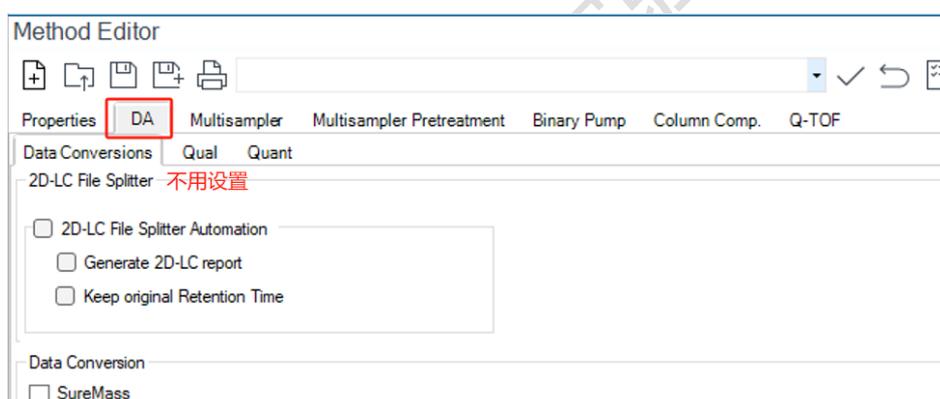


图6-19

- (3) **Multisampler:** 默认即可，无需设置。主要用于设置进样速度、洗针、进样体积，进样体积可在表格中灵活处理。
- (4) **Multisampler Pretreatment:** 默认即可，无需设置。主要用户在线衍生或其他在线其他处理。
- (5) **Binary Pump:** 根据色谱柱设置流动相流速，一般为0.4 ml/min 或者0.3 ml/min（超高压色谱柱，长度>10 cm）；选择A, B流动相流路。勾选B, A+B=100%，可以通过修改B的比例来调节A的比例变化。**注意：反相洗脱，从高比例水相到高比例有机相，平衡一段时间，回到初始比例，柱后平衡至少2分钟。非特殊色谱柱，禁止用100%水相。**

- (6) Pressure Limits: 设置报警压力200-15000 psi;
- (7) Stop time: 色谱停止运行时间为液相梯度总时间;

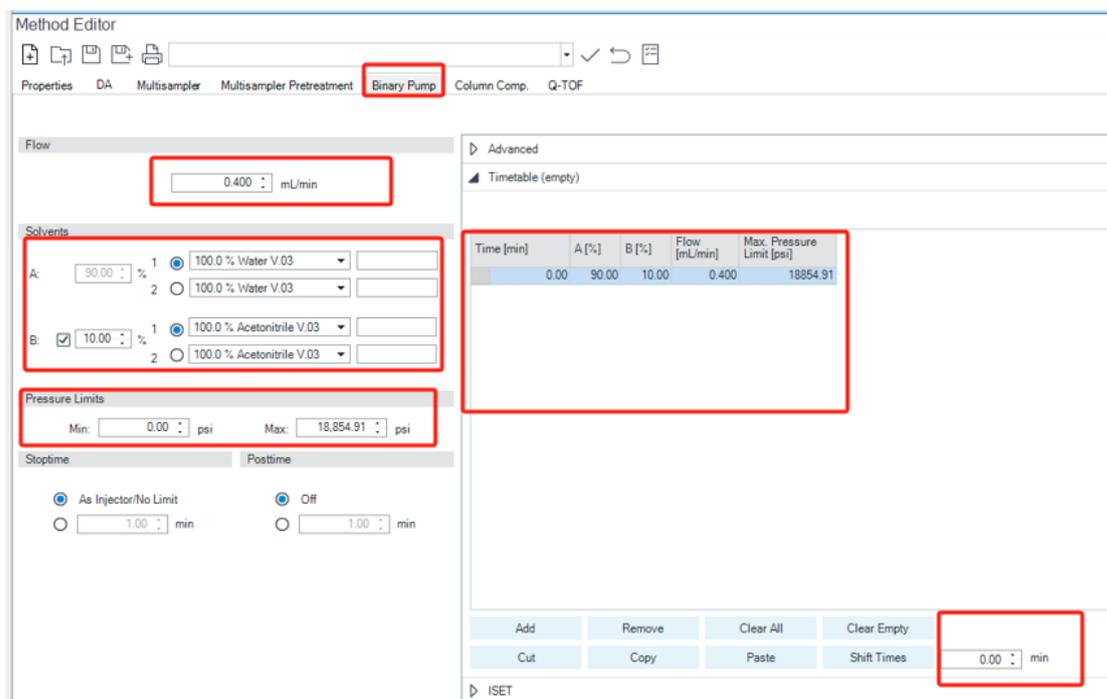


图6-20

- (8) Column Comp.: 设置色谱柱柱温箱温度及进样阀的位置（可参考图6-6示意图），设置范围0-80 °C，请根据样品性质、色谱柱温度耐受和实际需要进行合理设置。请根据实际需要，设置进样阀的位置，Position 1为左侧色谱柱和左侧柱温箱，Position 2为右侧色谱柱和右侧柱温箱。不使用的柱温箱，请设置至到Not Controlled，以免色谱柱填料长期在高温环境下破坏。

Temperature

Left:

Not Controlled

°C

As Detector Cell

Unchanged

Right:

Not Controlled

°C

As Detector Cell

Unchanged

Combined

Valve Position/Column

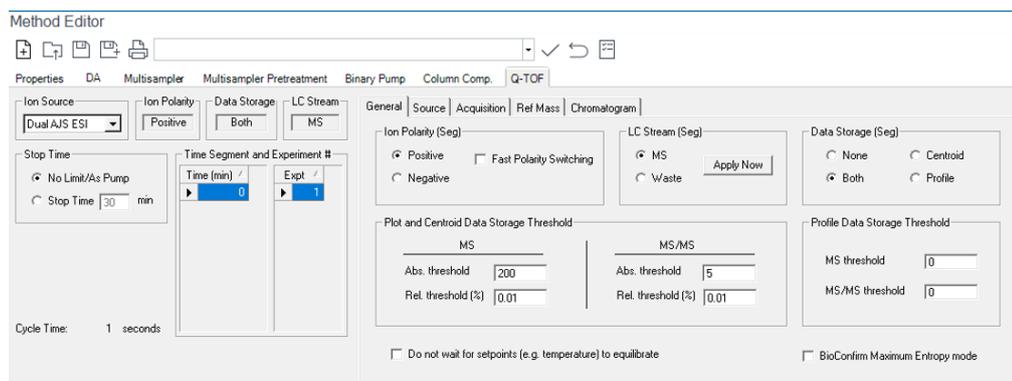
Use Current Column / Position

Use Selected Column / Position




图6-21

(9) LC-QTOF: 设置质谱采集方法。由于质谱运行方法设置较多，具体参见附件一Q-TOF质谱采集方法编辑，详细进行说明。



The screenshot shows the 'Method Editor' interface with the 'Q-TOF' tab selected. Key settings include:

- Ion Source:** Dual AJS ESI
- Ion Polarity:** Positive
- Data Storage:** Both
- LC Stream:** MS
- General:** Ion Polarity (Seg) set to Positive.
- Acquisition:** Ion Polarity (Seg) set to MS.
- Chromatogram:** Data Storage (Seg) set to Both.
- Plot and Centroid Data Storage Threshold:** MS Abs. threshold: 200, Rel. threshold (%): 0.01; MS/MS Abs. threshold: 5, Rel. threshold (%): 0.01.
- Profile Data Storage Threshold:** MS threshold: 0, MS/MS threshold: 0.

图6-21

(10) Ref Mass: 实时校正应用, 勾选Enable, Use bottle A, 校正离子121和922。

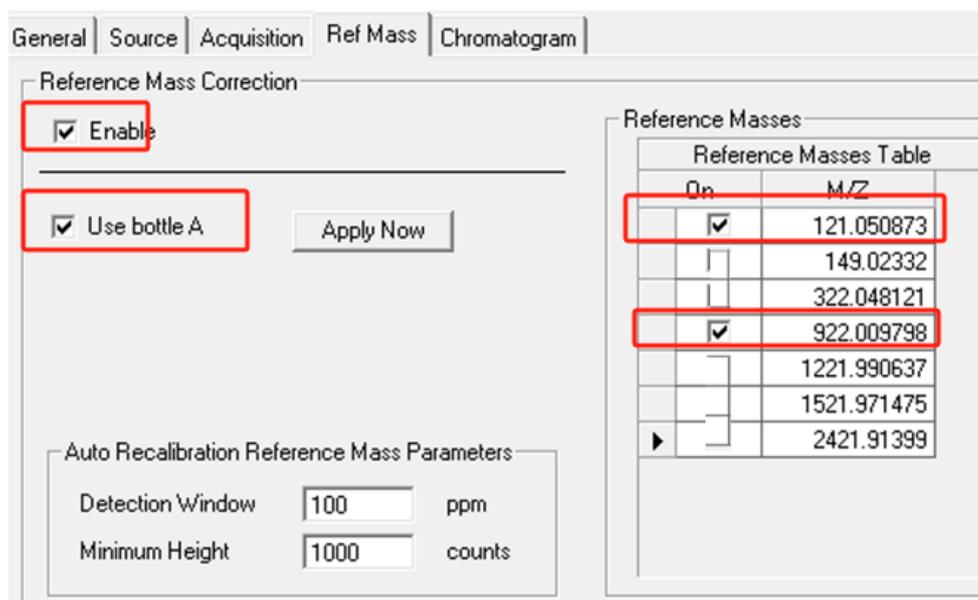


图6-22

(11) Chromatogram: 色谱图下来选择TIC。

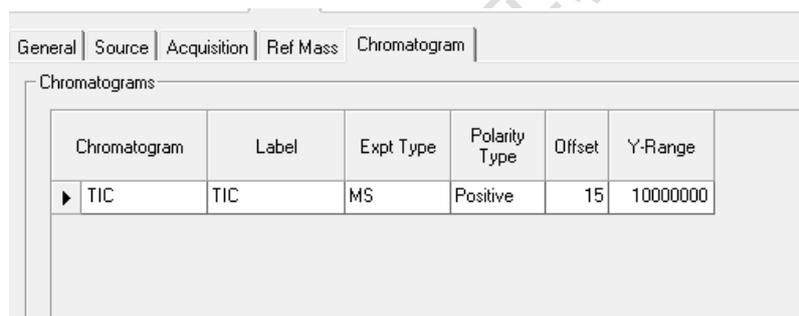
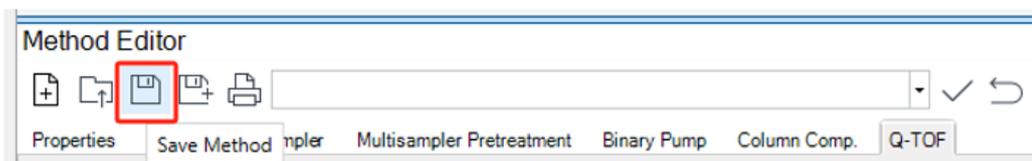


图6-23

Step 3. 保存方法: 方法检查确认无误后, 点击  方法保存, 并将保存路径设置到对应Project文件Method子文件。文件名建议包括用户-色谱柱-长度-时间-质谱采集信息, 比如 LX-C18-10min-MS_Pos_20250808。



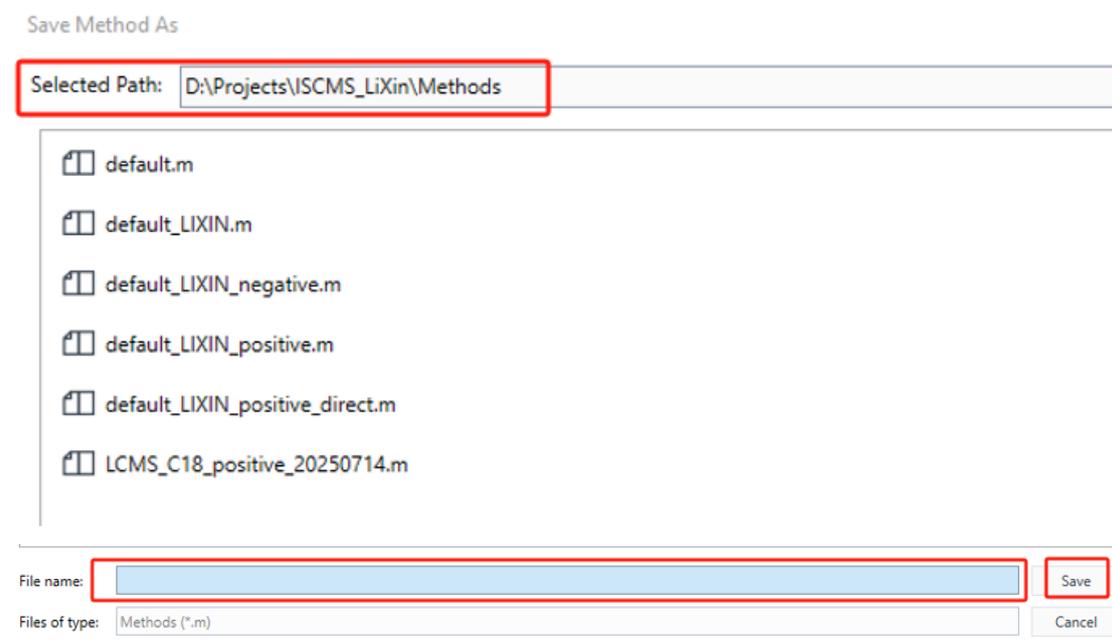


图6-24

6.5.2 新建采样序列

- 1) Acquisition界面下, 点击新建Worklist, 或者在Worklist子窗口, 点击 , 如图6-25;
- 2) 点击添加多个样品按钮;

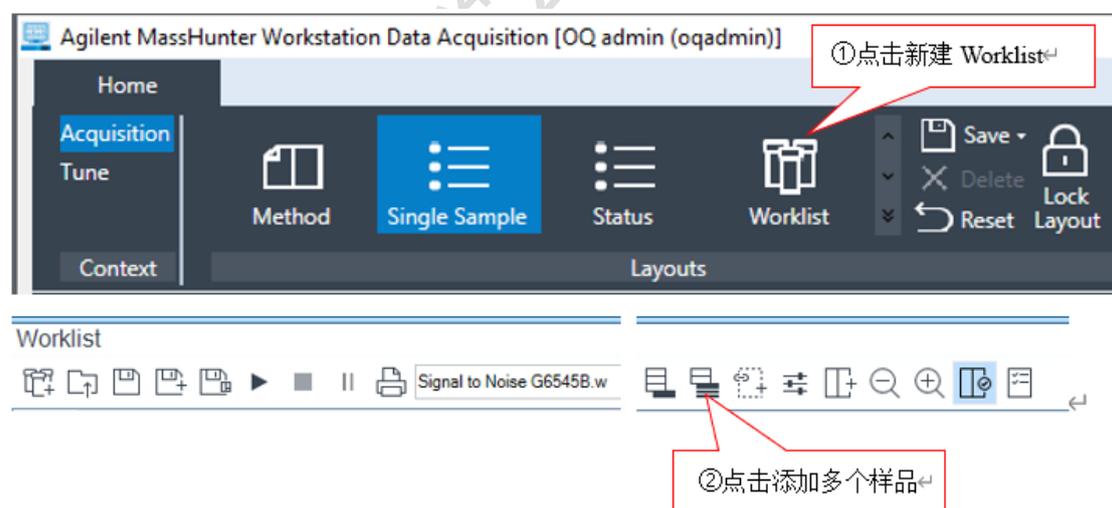


图6-26

- 3) 在 Sample Information 选项卡下, 填写样品名称(此处填写的一般是样品名字的公共部分, 后续以数字填充区分), 数据文件名称, 调用方法, 方法路径以及数据文件储存路径等; 点击 Sample Position 选项卡, 选择要添加的样品所放置的位置;

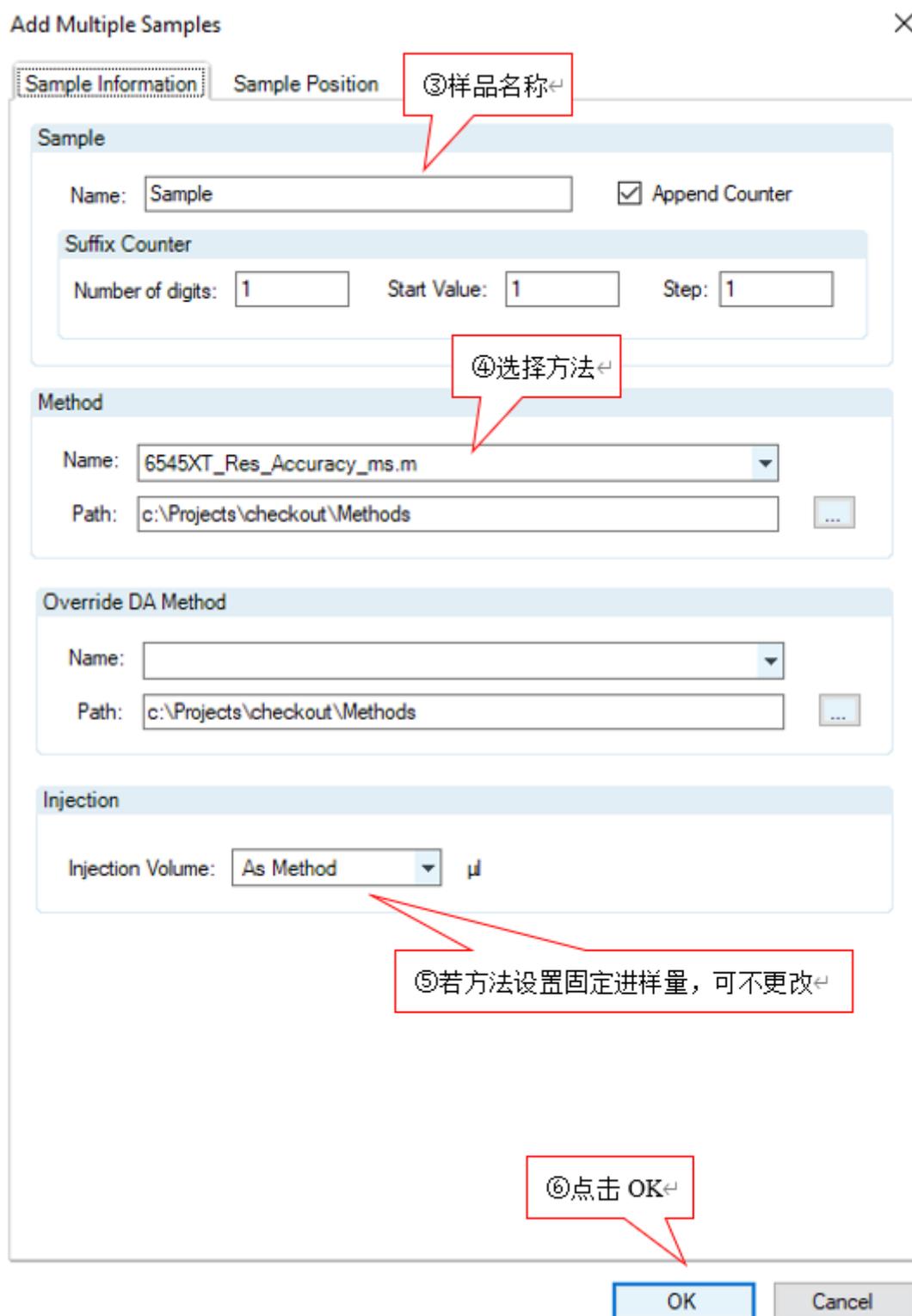


图6-27

- 4) 在 Sample Position 选项卡下点击并拖动鼠标来确定一个邻近的区域;

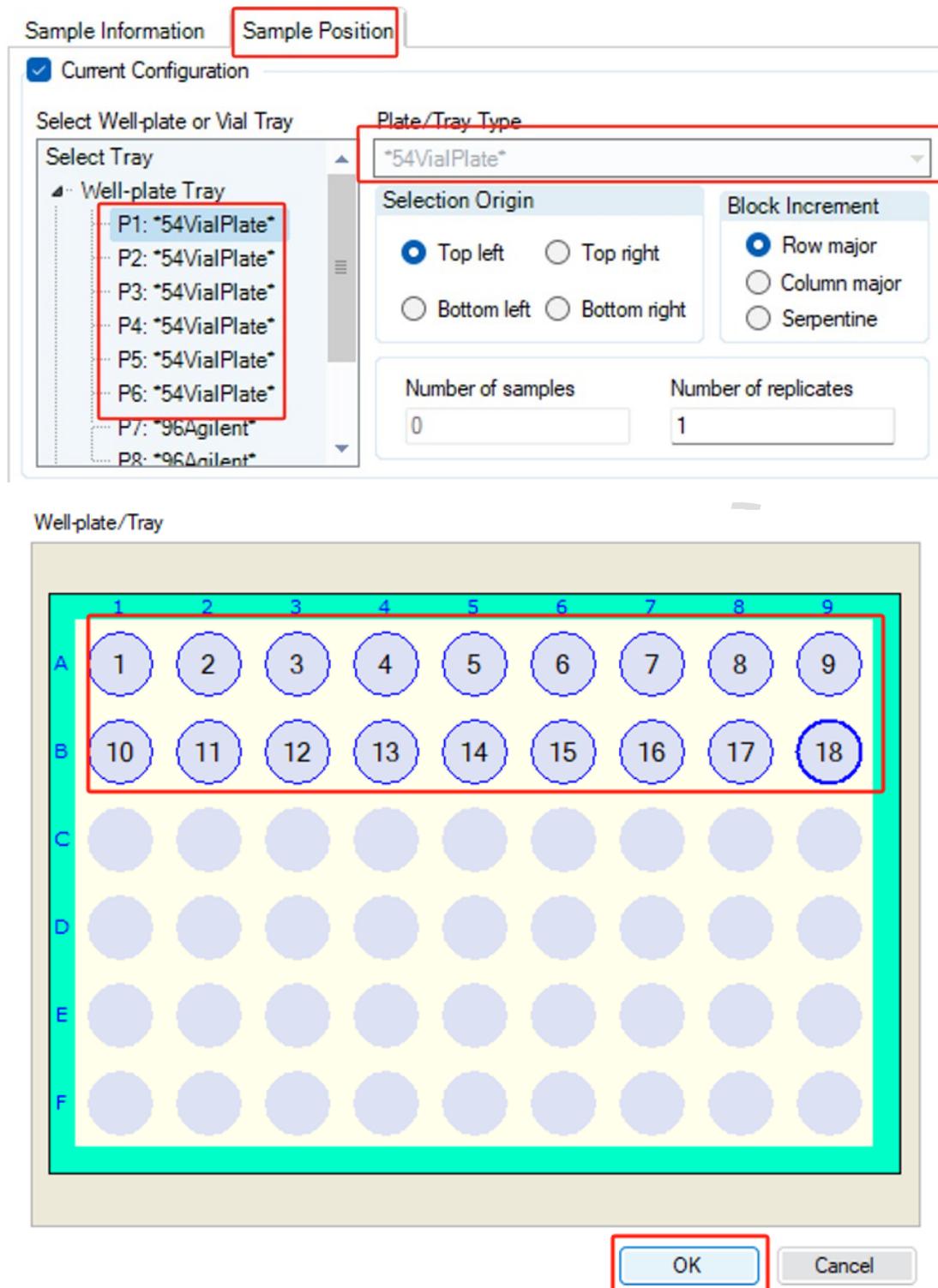


图 6-28

5) 点击 OK 关闭 Add Multiple Samples 对话框。设定的样品出现在 Worklist 表格，并且可以进行再次编辑：

a) Sample Name: 双击某一个 Sample Name 小框，显示光标，可根据需要重新数据样品名称；

- b) Sample Position: 双击某一个 Sample Position 小框, 可进行下来选择, 或者根据实际位置输入;
- c) Method: 选中某一个 Method 小框, 下来可以选择 Project---Method 中的其他运行方法。最后一行清洗, 可设置一个色谱柱冲洗方法, 质谱端切废。
- d) Data File: 鼠标选中某一个 Data File 小框, 点击...显示框, 将结果文件保存到对应 Project---Data 文件或 Data 下的子文件中, 并定义结果文件名称;
- e) Sample Type: 一般均选择到 sample。
- 6) 保存样品表: 如图 6-29, 点击  保存工作表, 命名工作表名称, 建议命名规则为 PI-用户-日期; 并保存到对应 Project---Worklists 路径下, 如图 6-30。

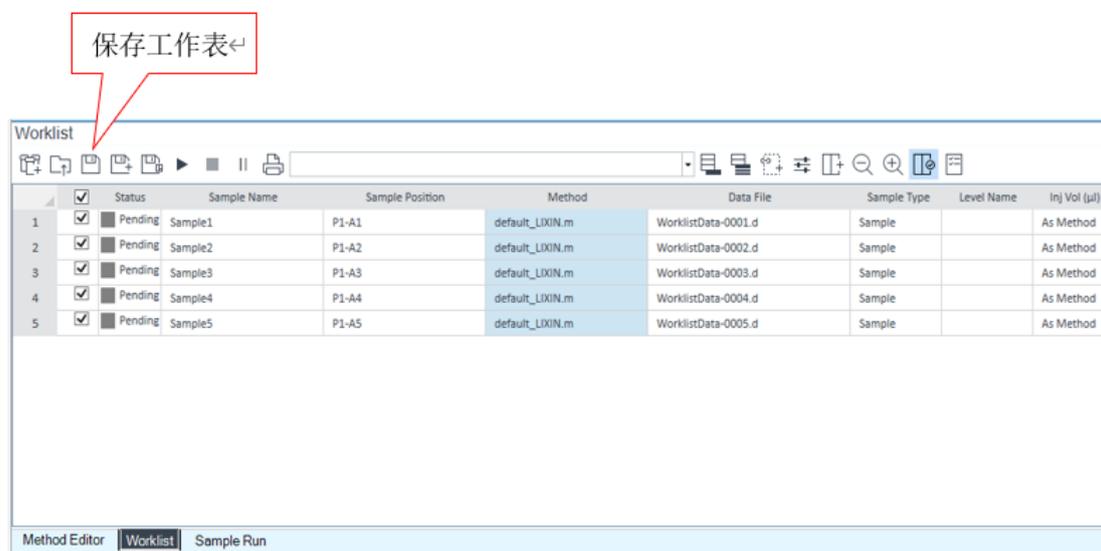


图 6-29

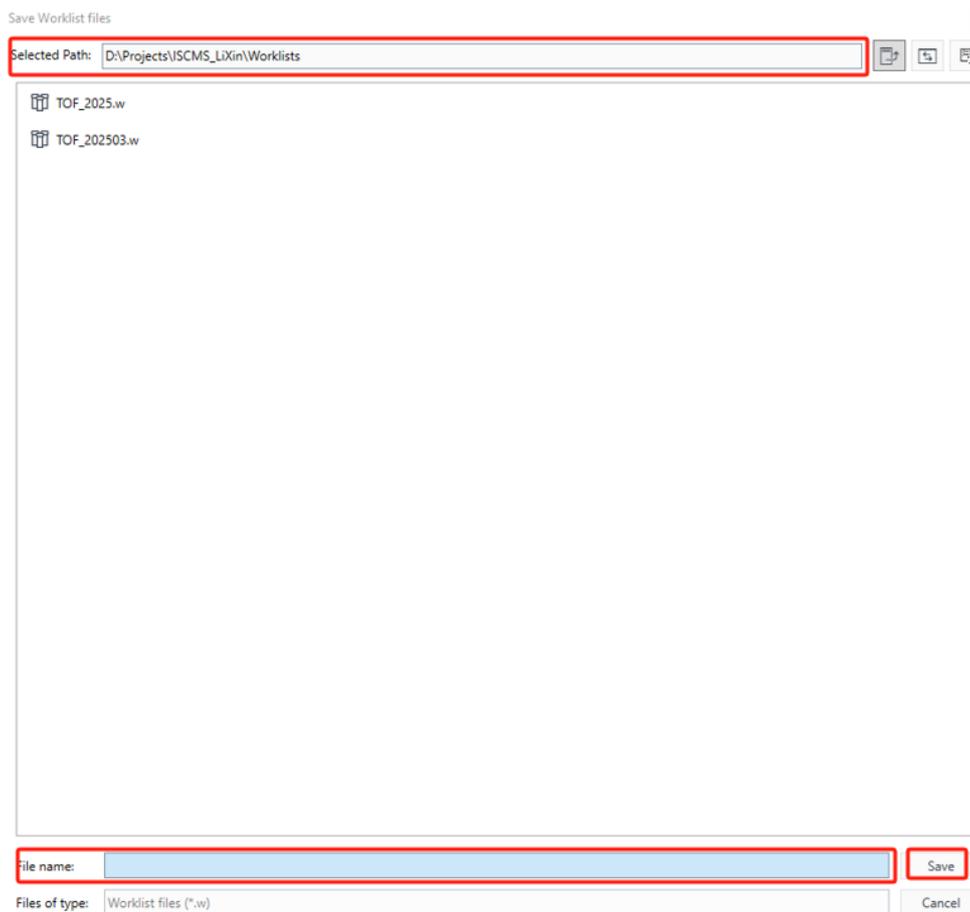


图 6-30

6.5.3 打开并加载液质方法

根据6.5.2样品表中即将运行的方法，正式运行样品前，应提前打开该方法，并进行加载，具体操作如下：在MassHunter Workstation界面右下角点击Method Editor---点击  图标，点击打开方法图标，调出将要运行的方法，点击Apply Method  即加载该方法。

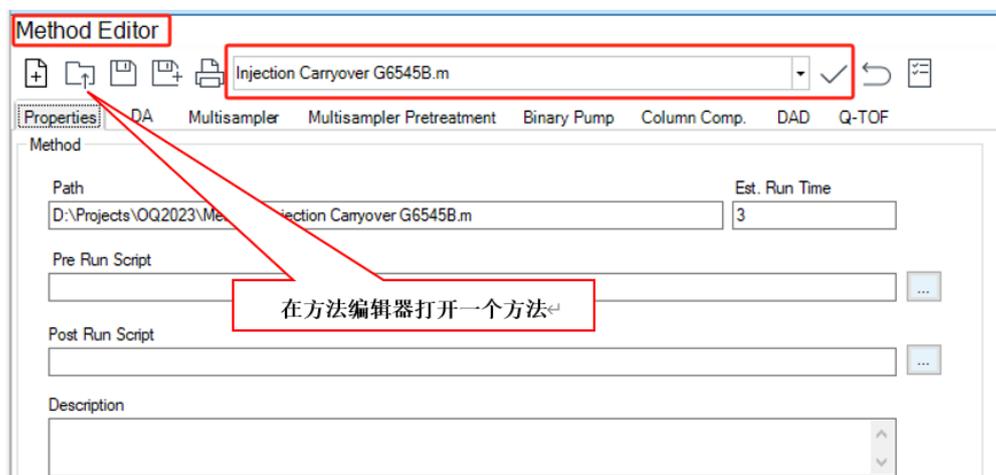


图 6-31

如果需要设置样品室温度, 可在Multisampler小框---右键---Control..., 进行设置。如果样品对温度不敏感, 则无需设置。

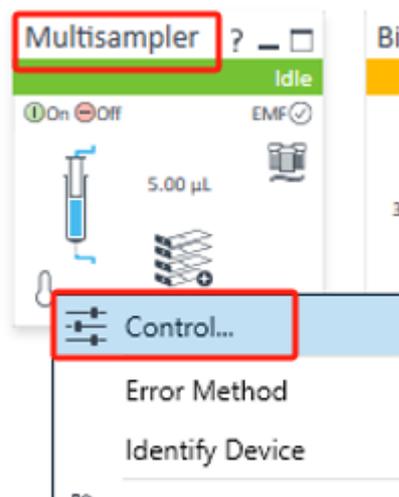
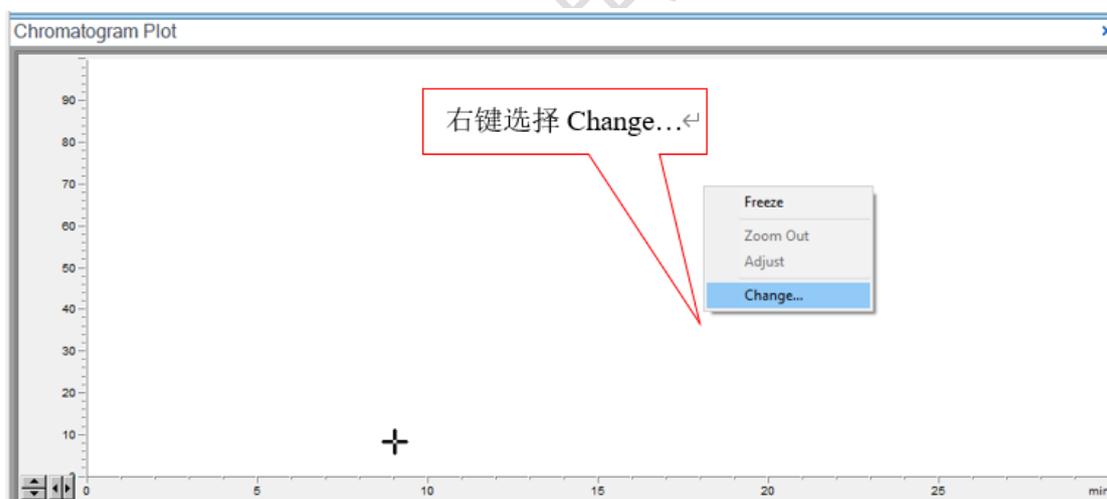


图 6-32

查看系统平衡: 如图6-33, 在Chromatogram Plot, TIC实时色谱图界面点击右键, 选择Change..., 在左边窗口选择Pump Pressure并点击Add->按钮加入到右边窗口中, 在实时色谱图中查看压力信号, 直至压力曲线平稳。



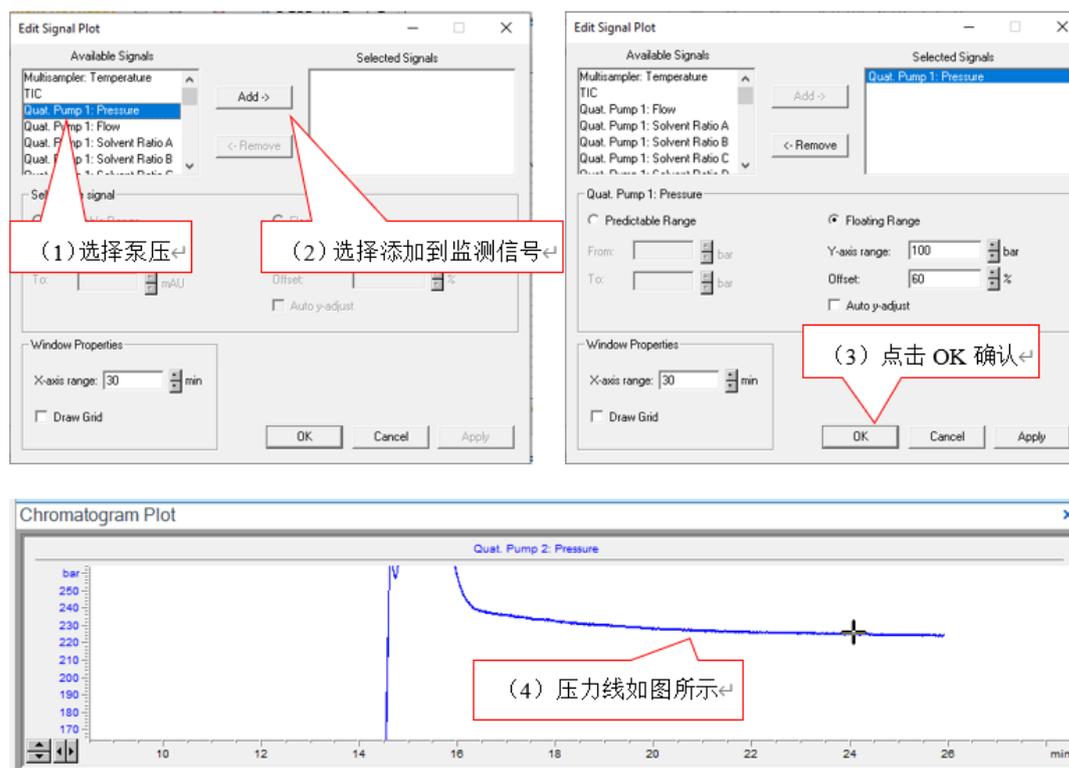
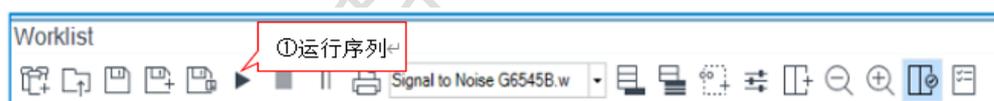


图 6-33

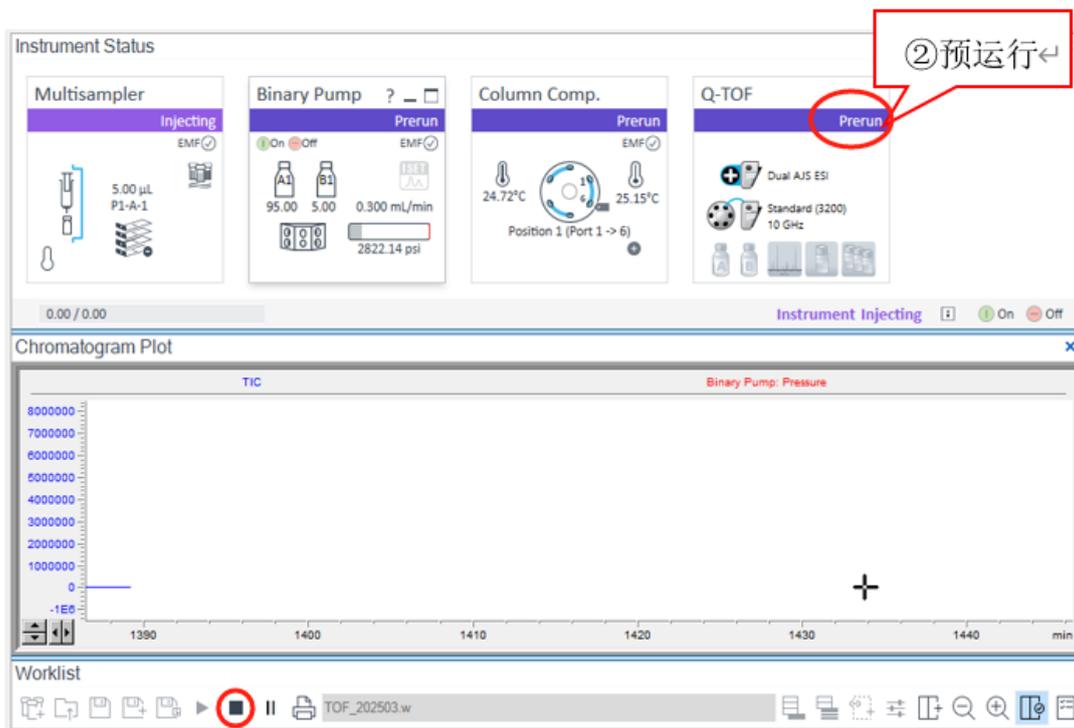
6.5.4 运行采样序列

按图3.1 A-D步骤运行采样序列：运行序列---预运行（Prerun）---正在运行（Run）---完成运行。

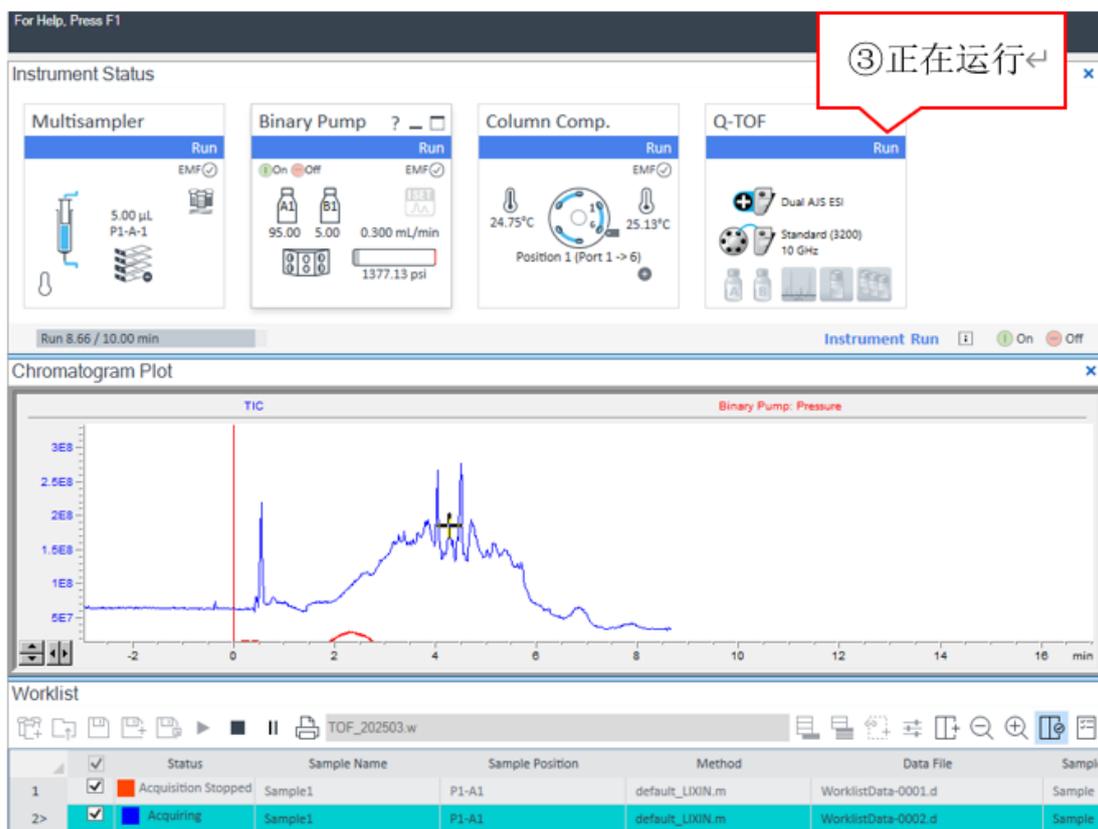
A)



B)



C)



D)

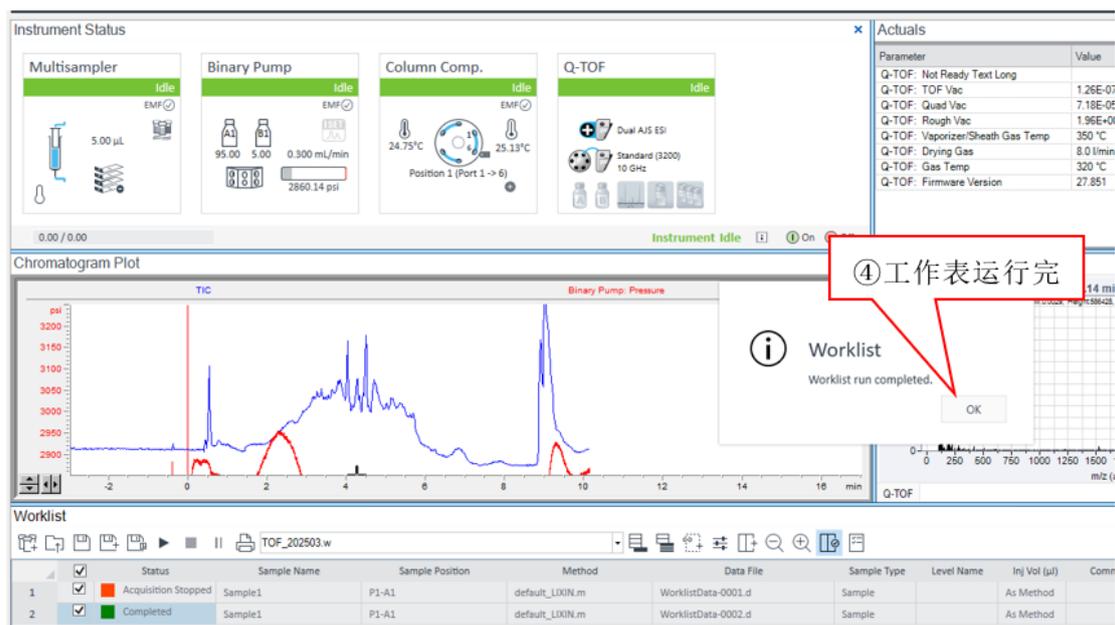


图6-34

6.6. 数据处理

6.6.1. 数据查看

双击Masshunter Qualitative Analysis, 打开定性分析软件界面如图6-35所示。

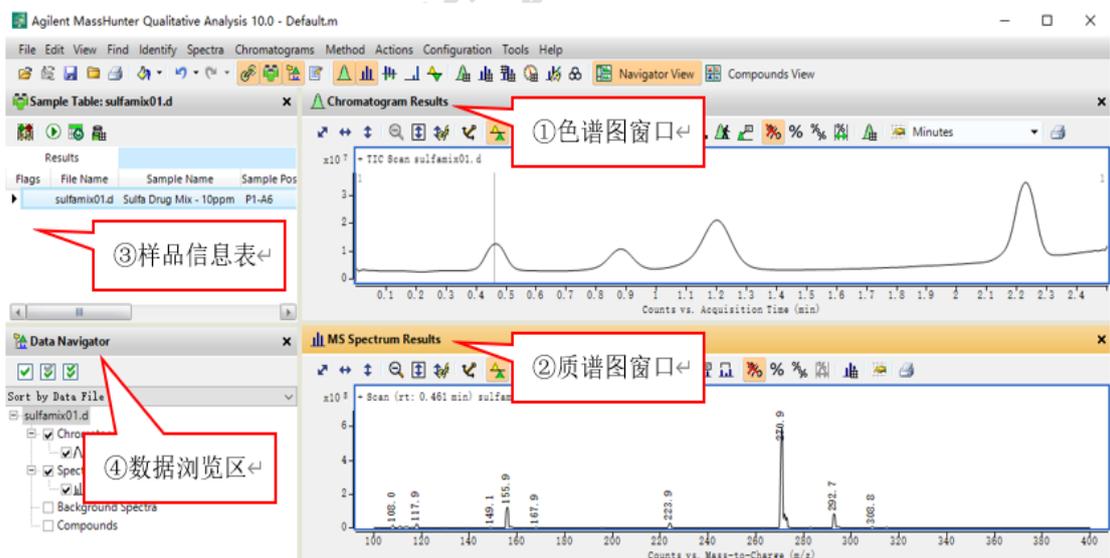


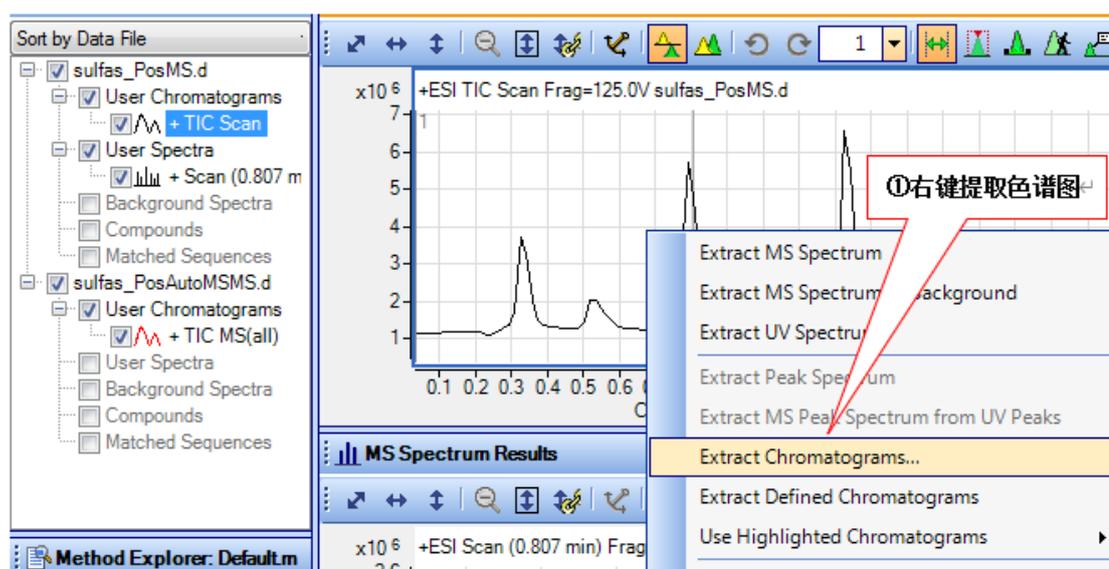
图6-35

6.6.2. 谱图提取及处理

a) 提取色谱图

右键色谱图显示区域, 在弹出的菜单选择Extract Chromatograms。

- ① 选择要提取的谱图类型，如EIC，并选择是否自动积分；
- ② 选择要提取的质谱图类型，如MS；
- ③ 选择要提取的离子极性是Positive还是Negative；
- ④ 若同时提取多个不同m/z的色谱图，可以输入多个数值，以逗号分开。还可以提取一段质量范围的色谱，如278-281。



←

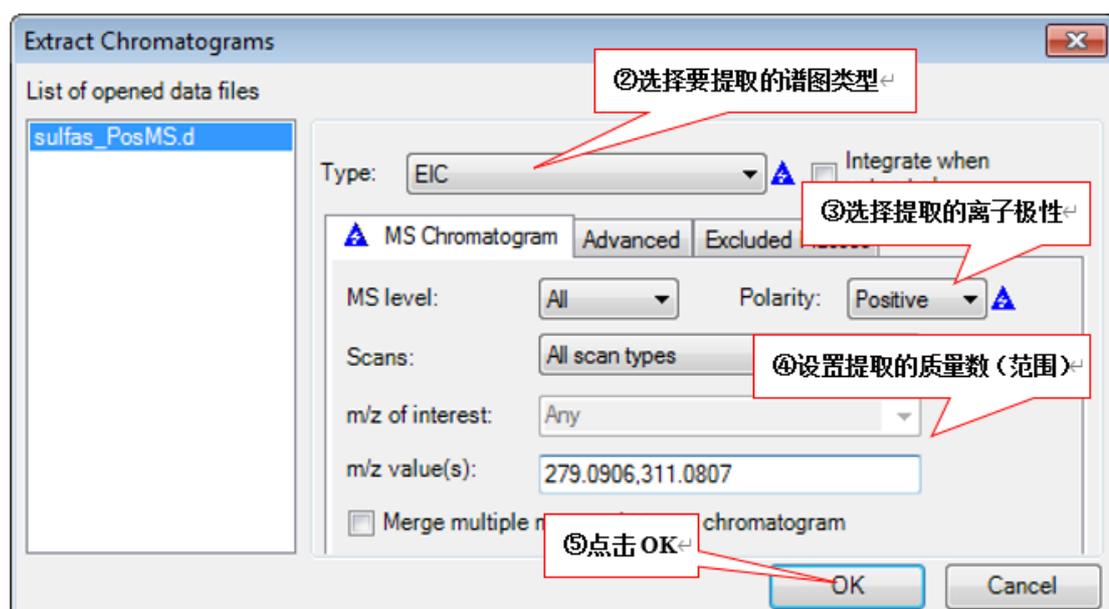


图6-36

b) 提取质谱图

- 选中范围选择工具，双击TIC对应时间点即可查看某时刻的质谱图。

- 若想获得某时间段的平均质谱图，可以在TIC图上按住鼠标左键选择一段范围，右键选择Extract Spectrum。

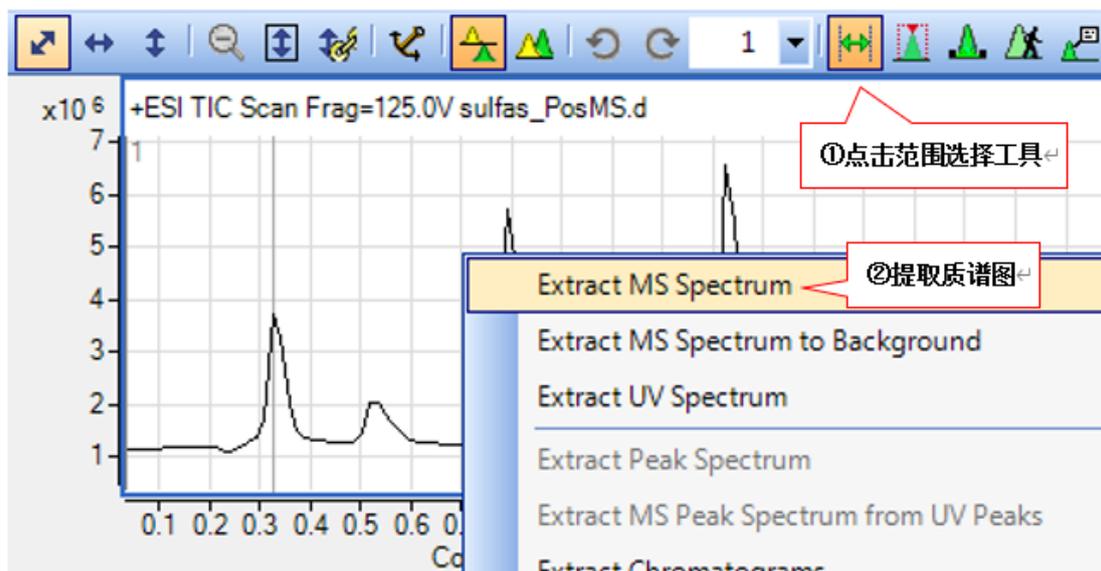
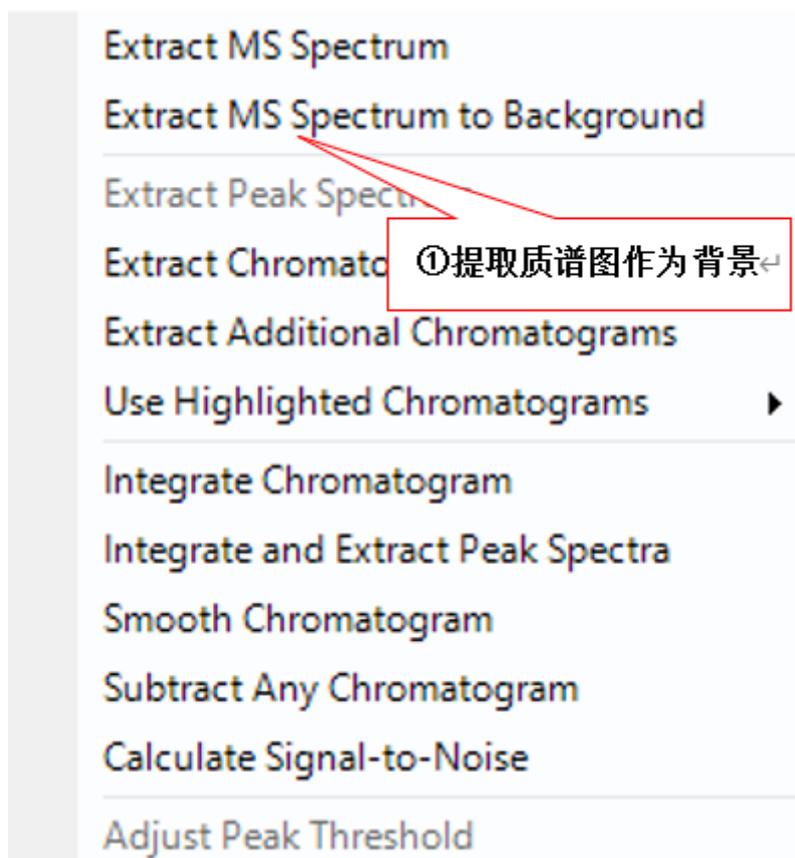


图6-37

c) 提取和扣除质谱背景

- 在TIC图中使用选择范围工具选择某点或一段背景范围，单击鼠标右键，选择Extract Spectrum to Background，该质谱图被自动加入到背景质谱图 (Background Spectra)。
- 在MS Spectrum Results内的某张质谱图上右键点击，在弹出的窗口选择 Subtract Background Spectrum。则该质谱图会自动扣除掉上面的背景质谱图。



分子科学公共

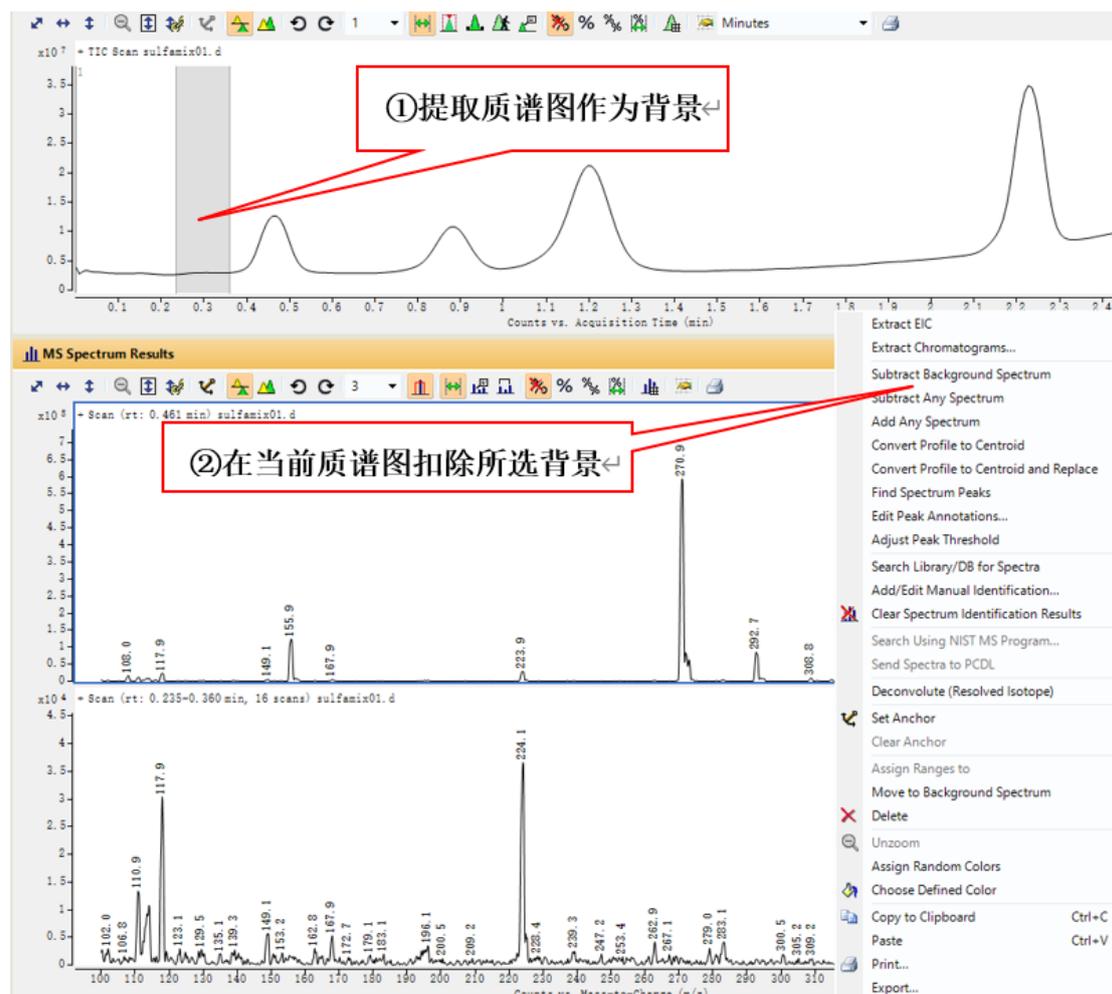


图6-38

d) 轮廓图转化为棒状图

如果采集的数据是轮廓图, 可以通过分析软件把相应的质谱图转化为棒状图。右键点击质谱图, 在弹出的菜单选择Convert Profile to Centroid, 可以把质谱图转化为棒状图。

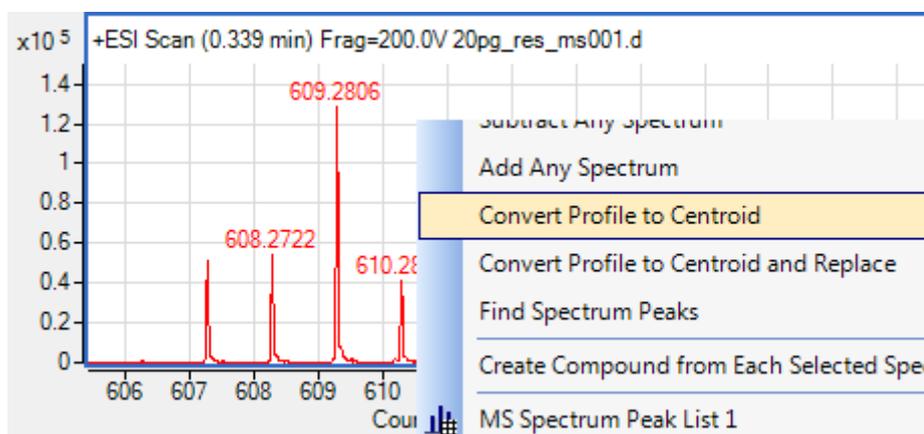


图6-40

e) 质谱图预览

点击跑峰的图标, 则进入了 Walk Chromatogram 状态。鼠标移到色谱图区域, 通过键盘的左右方向键快速的查看整个色谱图时间范围内任一时间点的质谱图。

退出 Spectrum Preview 模式, 必须选择高亮 Range Select 按钮和 MS Spectrum Results 按钮, 并取消对 Spectrum Preview 按钮的高亮选择。

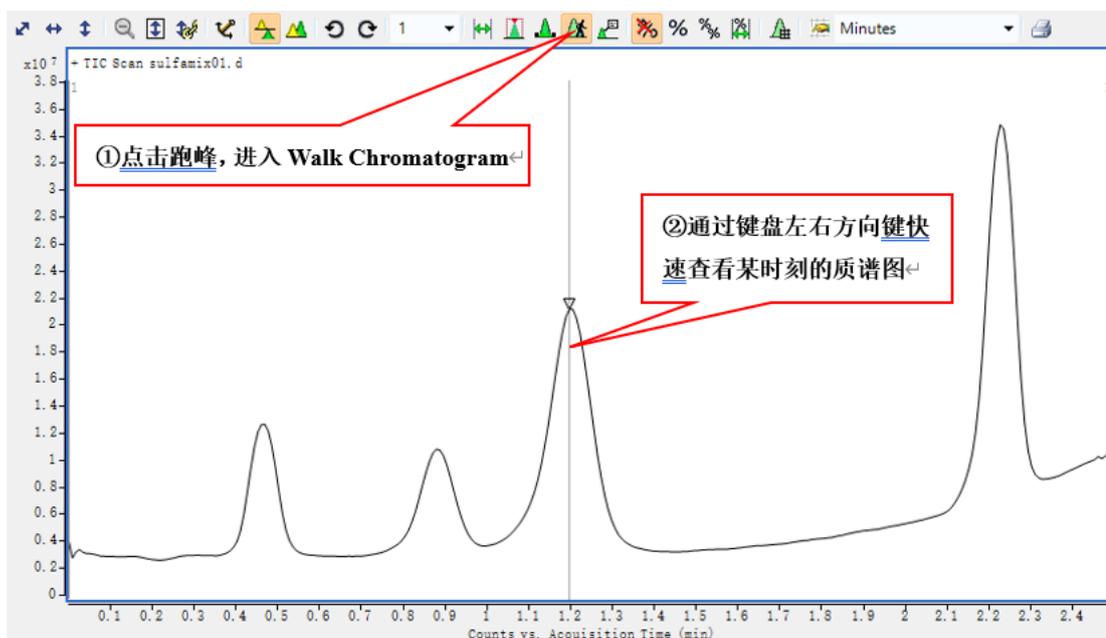


图 6-41

6.7. 定性分析

6.7.1 计算分子式

若计算质谱图中某个质荷比的分子式, 可以:

- ① 在质谱图上按住鼠标左键选择想要计算的质荷比 m/z 及其同位素;
- ② 单击 Identify Compounds 功能区, 选择 Generate Formulas;
- ③ 右侧显示分子式计算对话框, 设定元素组成、允许偏差、加和离子、同位素计算得分限度等参数;
- ④ 然后单击 Generate Formulas from Spectrum Peaks 开始计算;
- ⑤ 计算完成后会显示 MS Formula Results 窗口, 计算结果包含同位素匹配得分 (最高得分为 100, 其余是相对值)、质量偏差、不饱和度。单击+可以显示更详细的信息同时在下方的质谱图上会显示出同位素匹配框。

①鼠标左键选择想要计算的 m/z

②选择 identification--Generate Formulas

③设定参数限制

④点击开始进行计算

⑤显示匹配后的结果

Best	ID	Source	Name	Formula	Species	m/z	Score	Score (MFG)	Diff (ppm)	Score
					(M+Na)+	279.0906	96.32	96.32	2.12	
					(M+Na)+	279.0906	96.2	96.2	-1.68	
									-1.79	
									3.44	
									3.67	
									2.83	
					(M+Na)+	279.0906	86.99	86.99	-3.03	
					(M+Na)+	279.0906	86.72	86.72	7.68	
					(M+NH4)+	279.0906	85.49	85.49	-3.34	
					(M+Na)+	279.0906	84.61	84.61	-5.12	
					(M+NH4)+	279.0906	84.04	84.04	-4.05	
					(M+H)+	279.0906	83.45	83.45	7.95	
					(M+NH4)+	279.0906	83.45	83.45	8.47	
					(M+H)+	279.0906	82.62	82.62	-6.77	
					(M+Na)+	279.0906	78.14	78.14	-7.9	
					(M+H)+	277.1783	74.1	74.1	-1.1	
					(M+H)+	277.1783	71.94	71.94	3.95	
					(M+NH4)+	277.1783	71.94	71.94	4.21	
					(M+Na)+	277.1783	71.5	71.5	-2.21	

图6-42

6.7.2 分子式计算器

- ① 从 Tools 菜单选择 Show Formula Calculator, 会弹出计算分子式的小工具;
- ② 在 Mass and Charge 下输入要计算的质荷比和带电状态。Charge 选择 1 表示带一个正电荷, 如果选择-1 则表示带一个负电荷;
- ③ Charge Carrier 会自动激活是正/负离子, 并可以选择相应的加和或脱去的离子;
- ④ 在 Elements and limits 下输入可能的元素范围和个数;
- ⑤ 点击运行, 即可看到计算出来的可能分子式。

A)

①选择 Tools--Show Fomula Calculator

B)

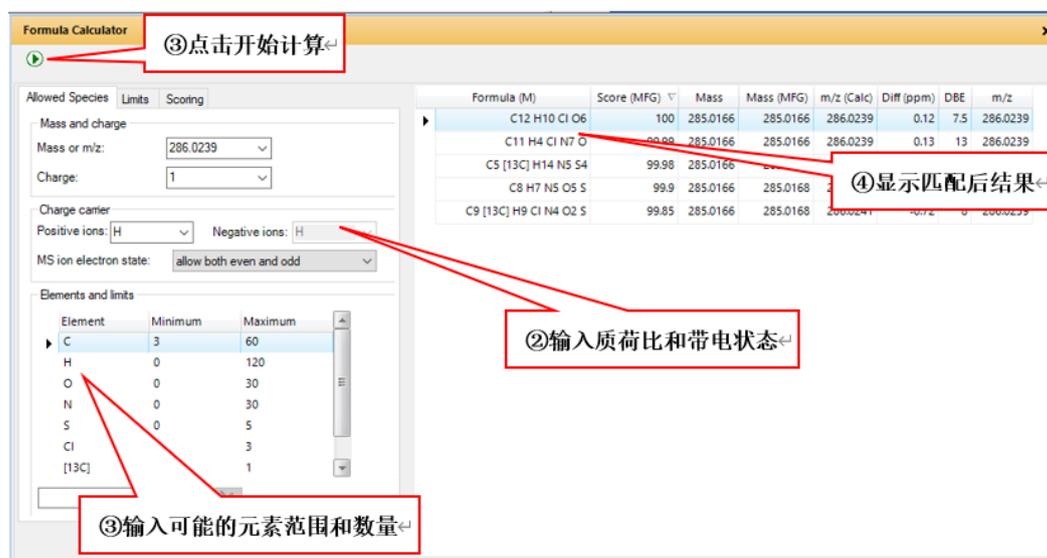
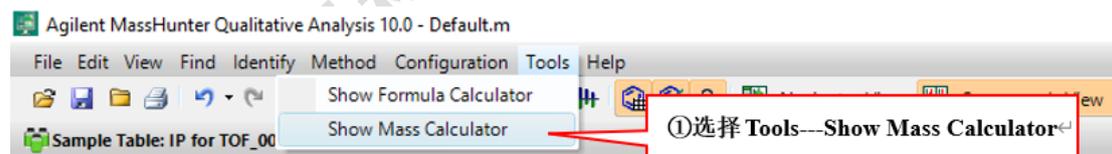


图6-43

6.7.3 质量计算器

- ① 从 Tools 选择 Show Mass Calculator, 弹出计算分子量和质荷比的小工具;
- ② 在 Base formula 下输入分子式;
- ③ 在 Species to calculate 下选择是正/负离子; 在 Number of charge 下输入所带的电荷数;
- ⑤ 点击运行开始计算, 计算结果显示在窗口的右侧。

A)



B)

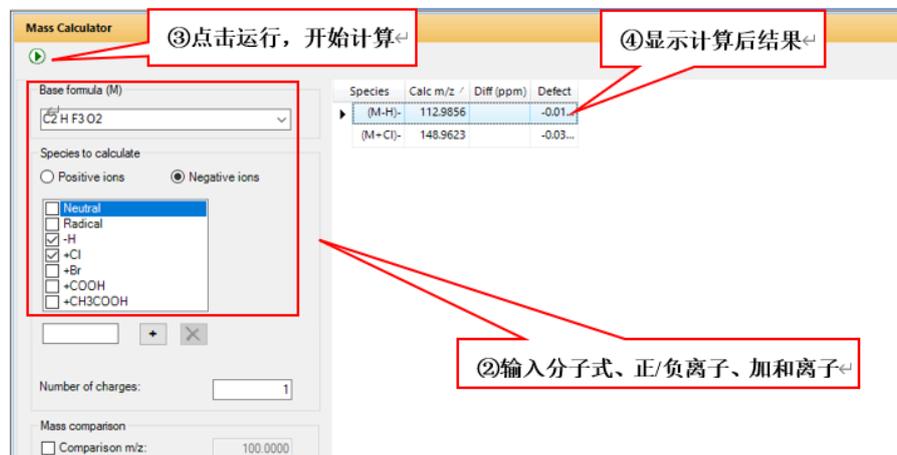


图6-44

6.8. 报告输出

从 File 菜单选择 Print---Workflow Report---弹出下面的窗口。从左侧选择要打印的数据文件，可以选择一个或多个打开的数据。设定好报告选项后，点击 OK 按钮生成报告。

➤ 选择报告存储路径。

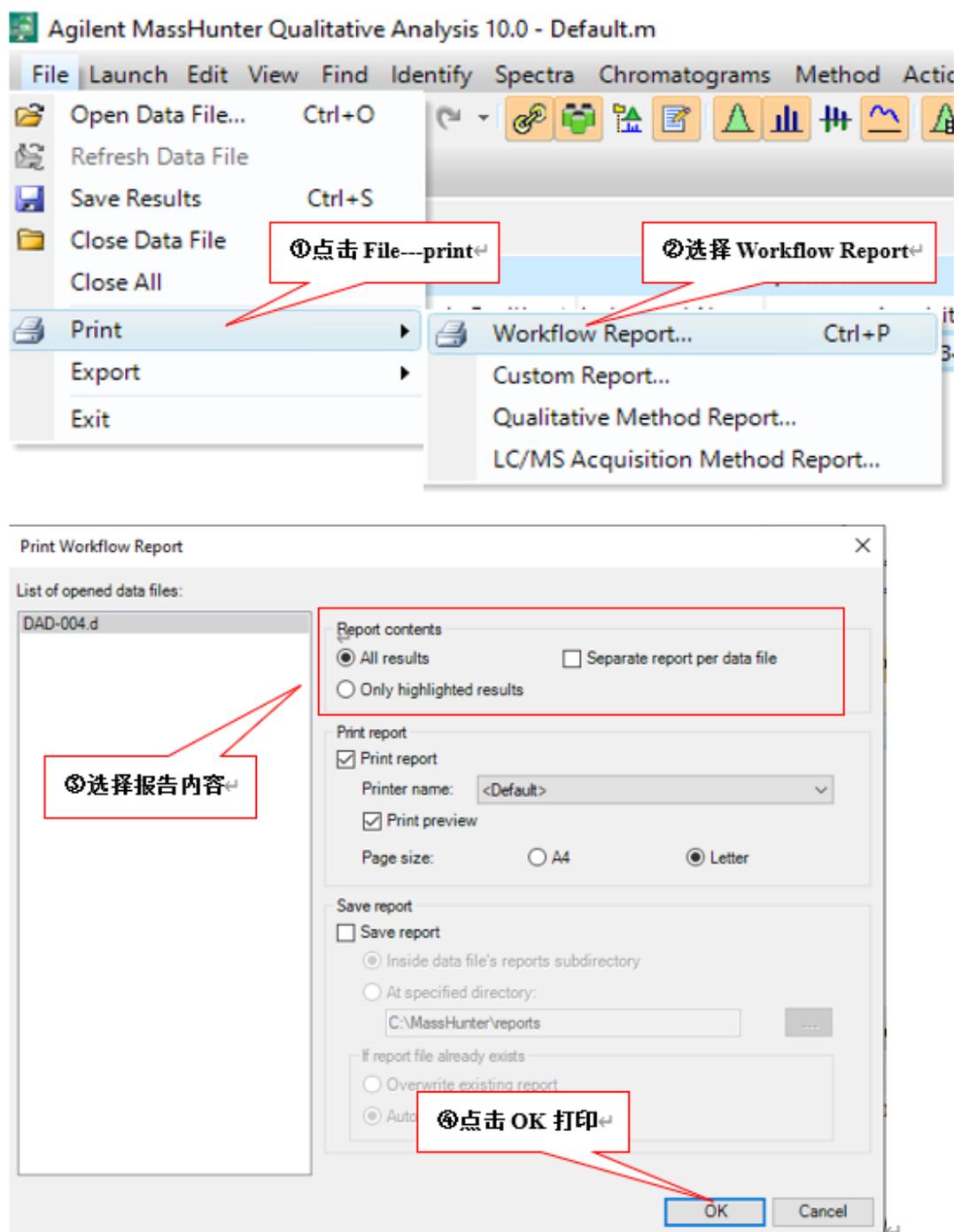


图6-45

6.9. 实验结束处理

- 冲洗色谱柱，关样品室温度，点击Off，一键Standby。

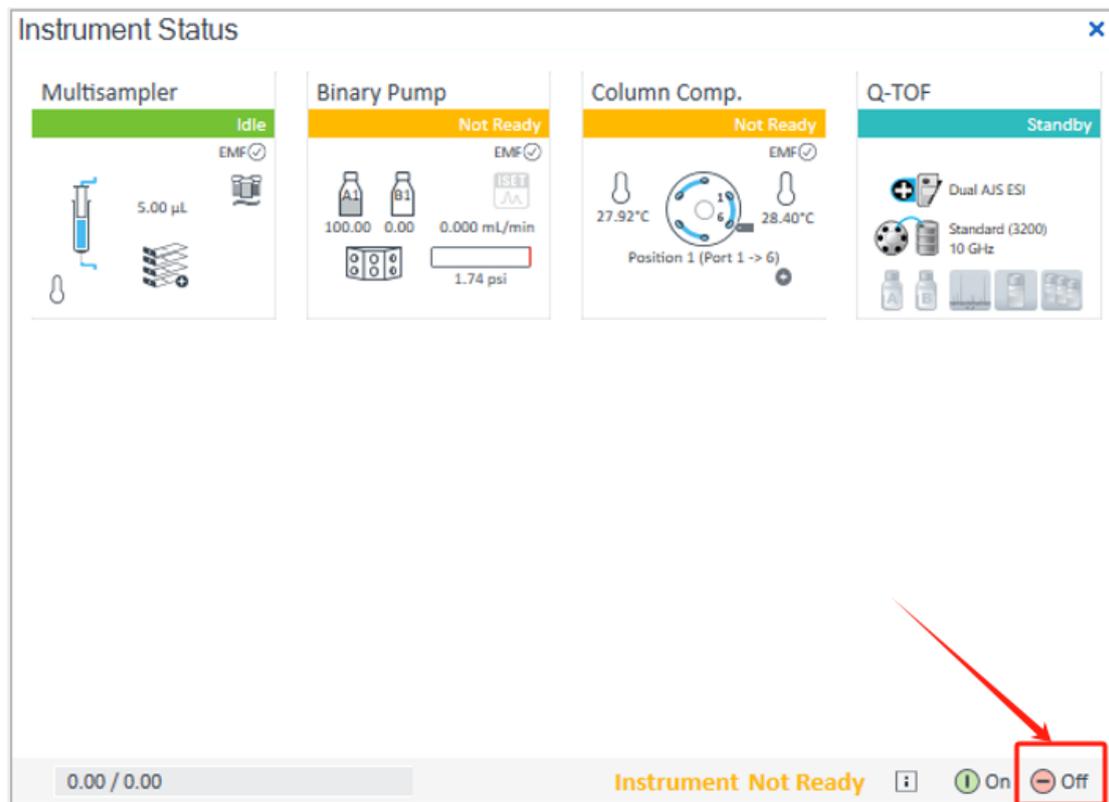


图6-46

- 退出大仪网系统登录，登记本如实记录样品信息。
- 实验结束，请整理实验桌，并将自己的测试样品带出实验室。

请注意：一旦开始实验，默认为使用前仪器状况良好；使用过程中出现故障须立即联系技术员；测试后请及时取回样品。

7. 相关/支撑性文件

Q/WU FLHR001 文件编写规范

8. 记录

液质联用仪使用登记表。

附件一：Q-TOF 质谱采集方法编辑

- (1) General列设置：如图1，如果使用电喷雾离子源，在ion source处下来选择 Dual AJS ESI； Stop time设置跟色谱梯度相同的时间；根据右侧蓝框、黄框和绿框可实现对Ion Polarity, LC Stream和Data Storage进行设置。具体如下： Ion Polarity根据样品离子化性质，选择正Positive 或者Negative，不支持快速极性切换； LC Stream只要是通过自动进样器进样进行质谱检测，都设置到MS；在对色谱柱冲洗时，可设置为Waste；如果加阀事件切除，可通过Time Segment增加事件，并在对应时间段选择需要的LC Stream即可； Data Storage:数据可采集棒状图(Centroid)或者轮廓图(Profile)，建议采Centroid减小数据文件大小，其他参数不需要测试；

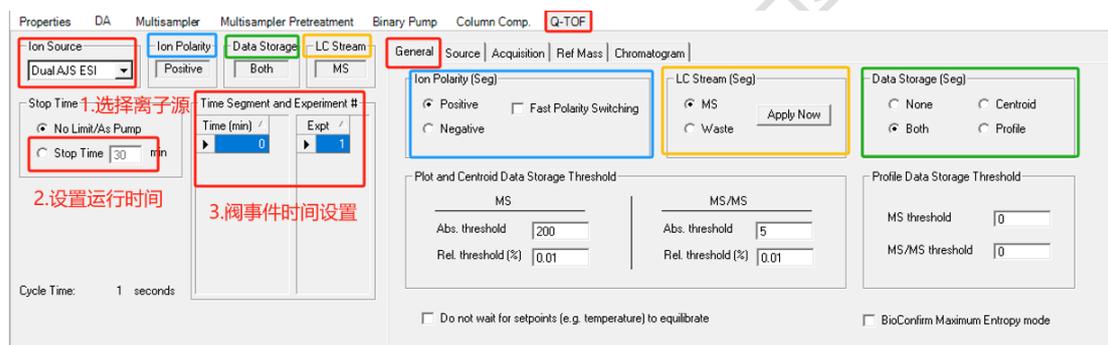


图1

- (2) Source: 设置离子源参数，无特殊要求，按默认设置即可。

注: Nozzle Voltage (Expt): 除电喷雾电离电压之外的喷嘴电压，用于辅助电离；

Fragmentor: TOF的碎裂电压，用于去簇。

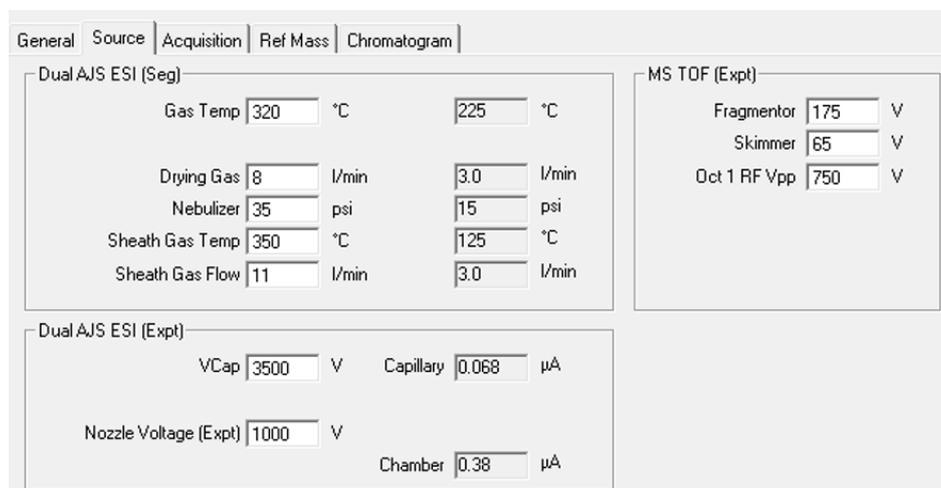


图2

- (3) Acquisition: 质谱采集模式, 包括四种MS 一级全扫; Auto MS/MS:自动采集二级; Targeted MS/MS: 目标离子二级质谱采集; Data Independent:数据非依赖性采集。以下具体说明:

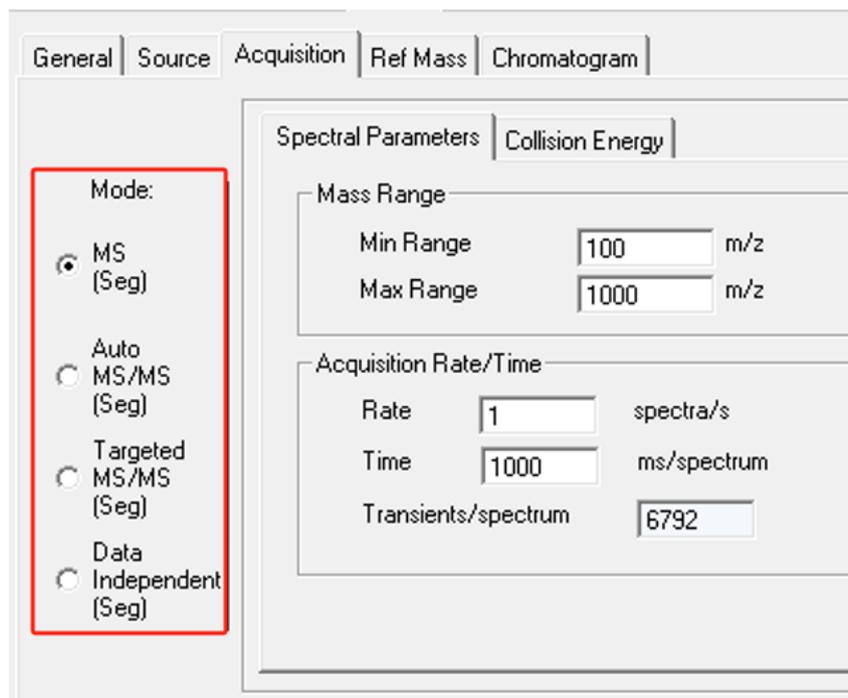


图3

- MS 采集: 用于完整用品中各化合物物质荷比的精准测定, 根据样品成分设置 Mass Range, 仪器最低m/z为100。Max Range请根据样品, 如无必要, 不要设置过大, 否则采集的结果文件大。Acquisition Rate通常设置为1或者2。Collision Energy设置为零。

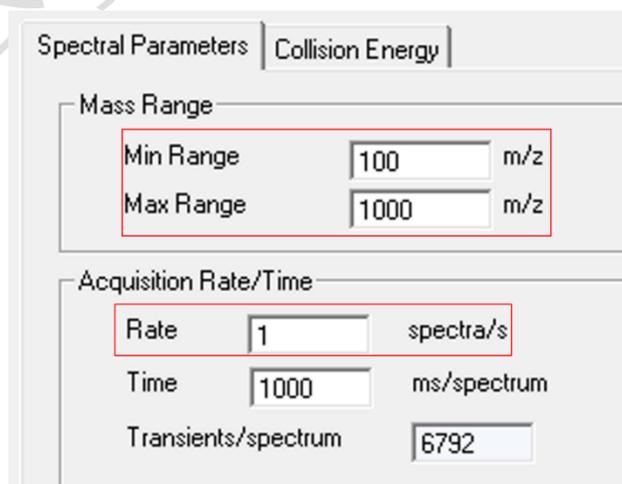


图4

- Auto MS/MS: 仪器采集一级谱的同时, 并根据响应设置进行二级谱的采集。

设置MS和MS/MS采集Mass Range; Collision Energy: 可以设置固定碰撞能量, 或者Use table, 不同质荷比范围的离子设置不同碰撞能量; 或者选择Use Formula, 根据需要进行电压ramp设置, 可参见图6; 通过Precursor Selection I, II, III进行二级母离子自动筛选条件设置。

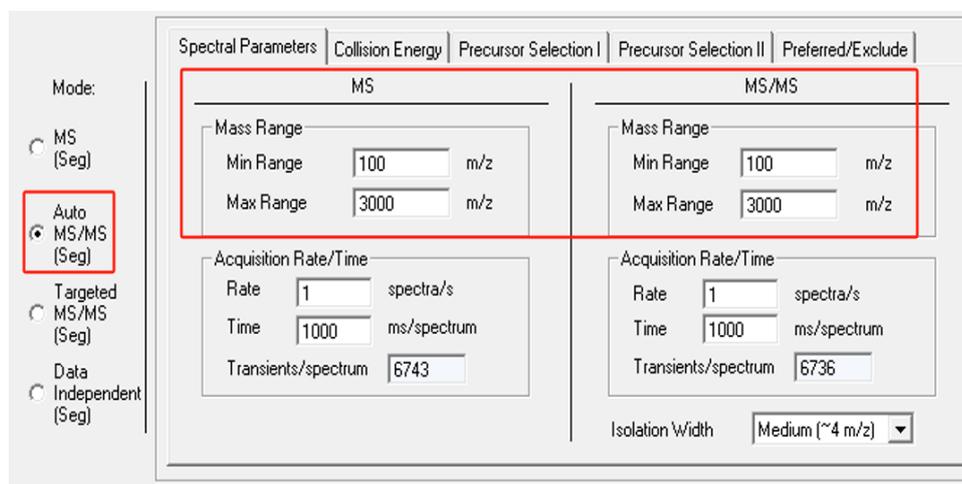


图5

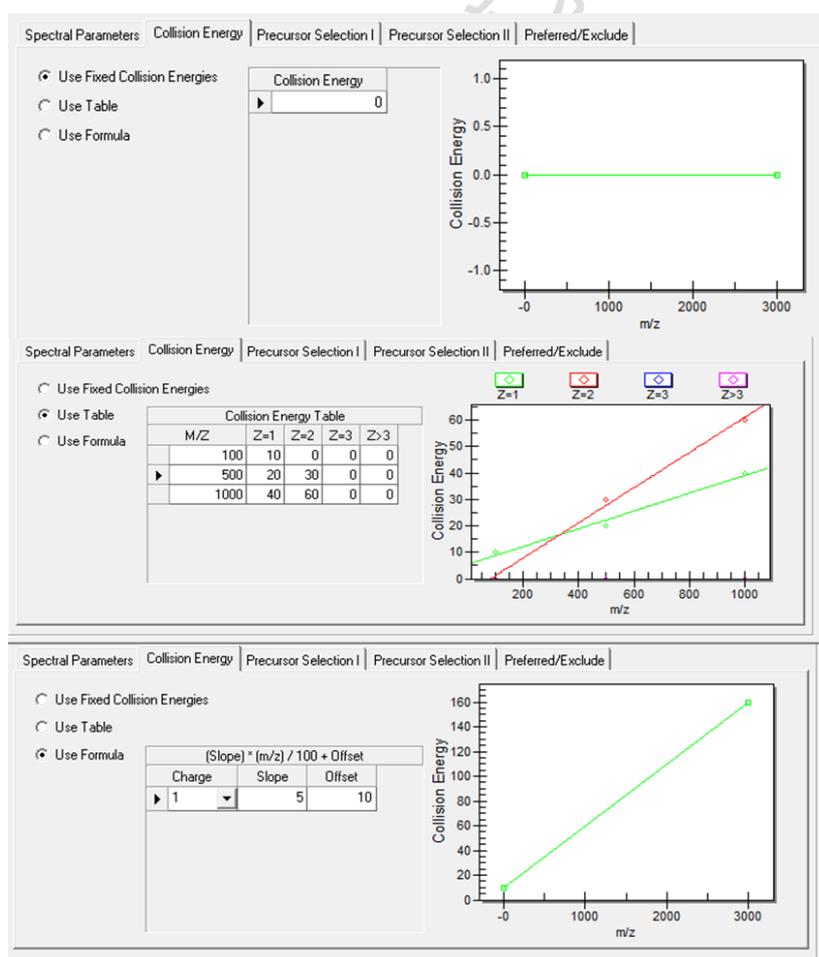


图6

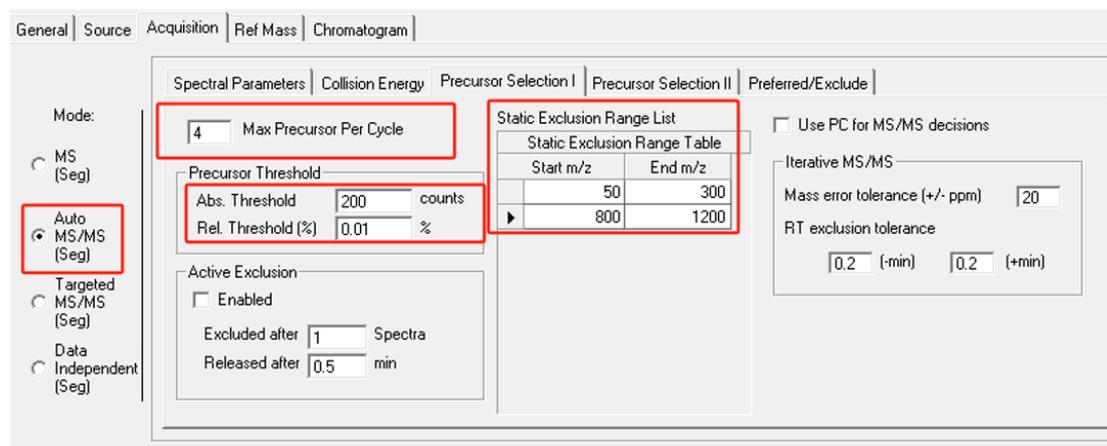


图7

- Targeted MS/MS: 仪器采集一级谱的同时, 并采集特定m/z的离子进行二级谱的采集。设置MS和MS/MS采集Mass Range; Collision Energy: 可以参考Auto MS/MS碰撞能量说明; 在Targeted List---右键Add, 可增加行, 数据目标离子的质荷比(精度到小数点后第四位)、电荷、保留时间窗口、隔离宽度、碰撞能或采集时间等信息。

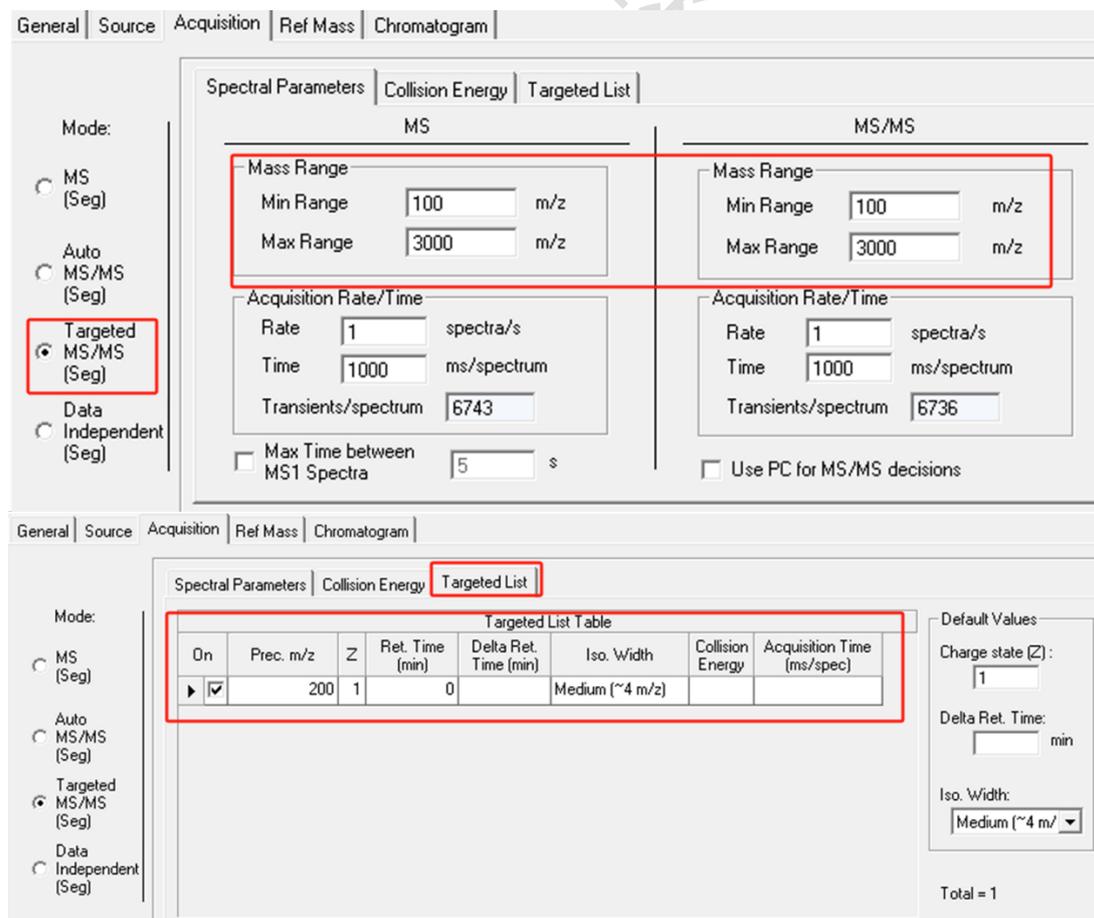


图8

- Data Independent: 仪器采集一级谱的同时, 并对某一或者某几段质荷比的所以离子进行二级谱的采集。设置MS和MS/MS采集Mass Range; Quadrupole Window List: 可以参考Auto MS/MS碰撞能量说明; 在Targeted List---右键Add, 可增加行, 数据目标离子的质荷比(精度到小数点后第四位)、电荷、保留时间窗口、隔离宽度、碰撞能或采集时间等信息。

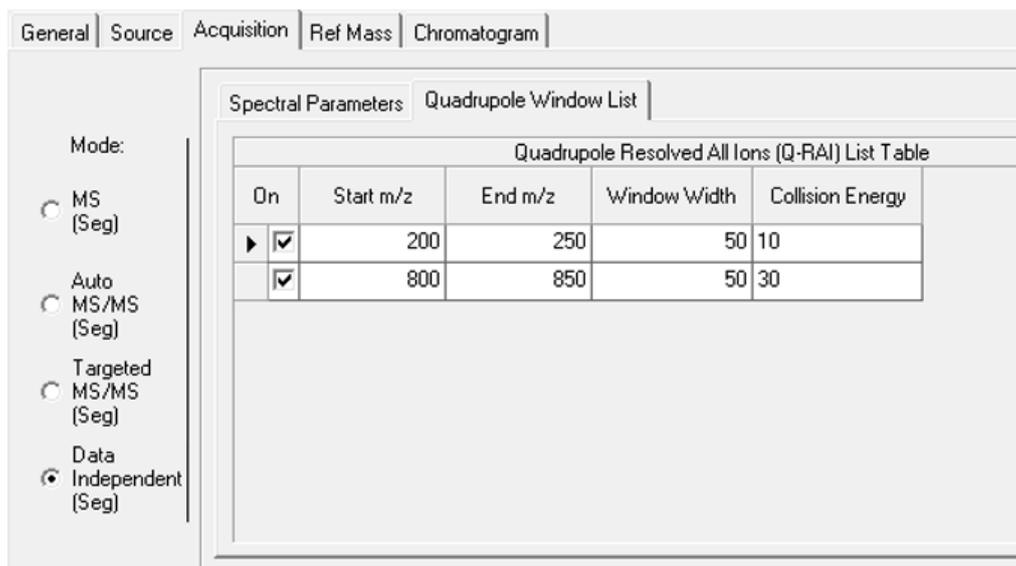


图9

分子科学公共实验平台