

文件编号：WU-ISCMS-QM 20214699

版本号：V2.0

受控状态：

分发号：

分子科学公共实验平台

质量管理文件

高分辨飞行时间质谱 Waters SYNAPT-G2-Si 标准操作规程

2019年9月30日发布

年 月 日实施

分子科学公共实验平台 发布

修订页

修订日期	版本号	修订说明	修订	审核	批准
2019.09.30	V1.0	发布试行	陈银娟	卢星宇	卢星宇
2022.05.15	V2.0	修订安全及操作规范	陈银娟	陈银娟	卢星宇

分子科学公共实验平台

目 录

1. 目的	1
2. 范围	1
3. 职责	1
4. 色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. 色谱实验室仪器设备管理规范.....	4
5.1. 高分辨飞行时间液质联用仪预约与使用.....	4
5.2. 预约制度.....	4
5.3. 培训考核制度.....	5
6. 实验内容.....	6
6.1. 实验前准备.....	6
6.2. 样品的准备.....	6
6.3. 仪器主机组成.....	7
6.4. 登录基理系统.....	8
6.5. 打开项目文件.....	9
6.6. 仪器准备工作.....	14
6.6.1 密封件清洗（Seal Wash）.....	14
6.6.2 灌注操作（Prime Solvents）.....	15
6.6.3 进样针及注射器清洗.....	16

6.6.4 质谱调谐.....	17
6.6.5 打开质谱界面.....	18
6.7. 编辑进样列表.....	19
6.7.1 文件名(File name).....	20
6.7.2 编辑 File Text 列.....	21
6.7.3 建立色谱方法文件(Inlet File).....	21
6.7.4 建立质谱方法文件(MS File).....	25
6.7.4.1 直接进样的样品.....	25
6.7.4.2 液质分析.....	26
6.8 选择色谱、质谱方法.....	29
6.9 样品位置选择(Bottle).....	30
6.10 进样体积(Inject Volume).....	31
6.11 方法运行.....	31
6.12 数据查看.....	35
6.13 实验结束处理.....	37
7. 相关/支撑性文件.....	38
8. 记录.....	38
9. 附件.....	38
附录一 新建项目文件.....	39
附录二 质量轴校正 Calibration.....	41
附录三 Lockspray setup.....	52
附件四 简版操作流程.....	57

1. 目的

建立高分辨飞行时间液质联用仪(SYNAPT-G2-Si)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高分辨飞行时间液质联用仪的用户。

3. 职责

3.1. 用户: 严格按本程序操作, 发现异常情况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:

①Acknowledgement: 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.

②Coauthorship 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. 色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. 进入色谱实验室，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，需两人在场。
- 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，未经培训人员，不得擅自上机使用。
- 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。

- 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洗脱梯度、进样盘等, 因用户本人选择色谱柱或梯度设置错误, 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登记, 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. 色谱实验室仪器设备管理规范

5.1. 高分辨飞行时间液质联用仪预约与使用

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, 并按照要求登记预约信息。根据预约制度可登陆大仪网站即时预约机时, 包括周末; 寒暑假及国庆假期将另行通知。

1. 委托测试

- ① 送样前与仪器负责人沟通样品信息。
- 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 测试结果请通过数据中心进行下载。
- ④ 样品如需回收请在测试后尽快取回, 一周未取回平台将作化学废弃物处理。

2. 自主上机

- ① 色谱谱仪器培训至少需要两小时, 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, 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。

5.2. 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作, 用户需根据预约制度可登陆大仪共享网站最少提前 30 分钟预约机时或送样。考虑到设备的复杂性, 特殊情况下如周末或节假日使用, 务必提前与技术员沟通。

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 2 小时取消预约并通知技术员。如无故不遵预约时间, 将被取消一个月的预约资格。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
周一至周五	09:00 至 22:00	最短机时为 10 分钟	一级质谱 串联质谱分析 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, 结束时如实记录仪器状态;
- (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), 其导师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, 尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。使用者应根据要求通过科研仪器网/数据服务器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保留 2 年。
- (7) 使用者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, 联系技术人员进行上机考核, 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;

仪器管理员认为培训者达到相应级别的独立操作水平后, 给予培训者授权在相应级别所允许的范围内独立使用仪器。如果在各级别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, 给予降级重考惩罚、培训费翻倍。

对接受培训人员的核心要求:

- (1) 了解质谱的基本原理及其应用的多学科背景知识;
- (2) 熟悉质谱仪器、电喷雾离子源的原理、构造及各部分的功能, 严格遵守仪器部件的开关顺序, 在突然停电时应正确处理仪器并上报, 关注仪器各部件有无异常;
- (3) 熟练掌握 Masslynx 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. 实验前准备

- (1) 检查流动相、洗针液等溶液的成分和体积, 确保可以完成测试;

常用流动相: 流动相A: H₂O (超纯水, 0.1%FA)

流动相B: ACN (Fisher, LC-MS, 0.1%FA)

注: 需要用特殊流动相, 务必提前与技术人员协商, 确认色谱柱和仪器兼容性, 请根据色谱洗脱梯度及实验室需要配制所需流动相;

本仪器仅支持反相色谱模式, 默认接C18色谱柱。

其他溶液: Seal Wash及弱洗WNW (高比例水相): 10%ACN+90%H₂O;

SNW (高比例有机相): 90%ACN+10%H₂O;

注意事项: 甲酸为LC-MS级别 (冰箱保存); 配制好流动相超声脱气5分钟

- (2) 按要求制备样品。

6.2. 样品的准备

- (1) 去盐, 因离子源不耐盐, 含盐样品禁止上机测试;
- (2) 溶剂: 乙腈/甲醇/水或以上两种混合溶剂, 严禁测试遇到乙腈/甲醇/水析出的样品溶液; 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、表面活性剂类化合物; 禁止用 NMR 的样品上样。

- (3) 样品浓度: 1-2 ppm;
- (4) 样品量: 0.5-1.5 ml;
- (5) 制备溶液之后, 过 0.22 μm 的滤膜或者超离心 (11000 rpm, 15-20 min 取上清液)
- (6) 使用预开口的样品盖 (严禁人为手动开口)

补充说明: 样品溶液须过滤澄清, 严禁含有不可溶性颗粒或含有蛋白质、核酸、多糖等大分子; 样品溶液pH在2-8范围内, 生物样品、微生物培养液等样品, 必须经过去除蛋白质、脂类和多糖的操作, 然后用流动相溶解; 不得含有表面活性剂; 不得含有机或无机强酸强碱、三氟乙酸等。送样需说明样品保存条件、稳定性、溶解性、毒性、余样是否需要取回等信息。

重要提醒: 1) 送样人员必须对测试样品的合法性负责, 未注明合法性和物理化学性质的样品不予测试。如测试过程中发现样品含毒品类非法样品, 送样人将负法律责任。

2) 因送样溶液不符合要求而导致管道堵塞或对仪器造成损坏的, 根据情节严重情况进行通报批评、禁用或赔偿等处罚。

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。

6.3. 仪器主机组成

如图 6-1, 高分辨飞行时间液质联用仪硬件包括以下几个部分: 流动相及托盘、柱温箱、自动进样器、溶剂管理器、飞行时间质谱及仪器控制电脑。



图 6-1

6.4. 登录基理系统

***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。

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

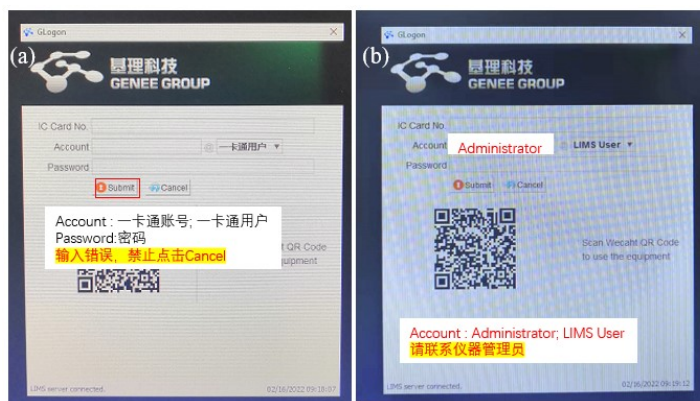


图 6-2

6.5. 打开项目文件

系统中已有项目文件的用户, 请选择 File - Open project 打开项目文件, 并进一步选择 file-open... 打开自己的 sample list, 具体如下:

注: 系统中没有课题组项目文件的用户, 请联系仪器技术员。

6.5.1 认识软件

Masslynx 软件高分辨飞行时间液质联用仪控制及数据采集软件, 软件图标及桌面位置见图6-3。

注意: 测试结束, 禁止退出 Masslynx 软件界面, 请按要求正常关闭仪器流动相、电压及温度后, 窗口最小化即可。如退出软件, 仪器将进行灯带报警。

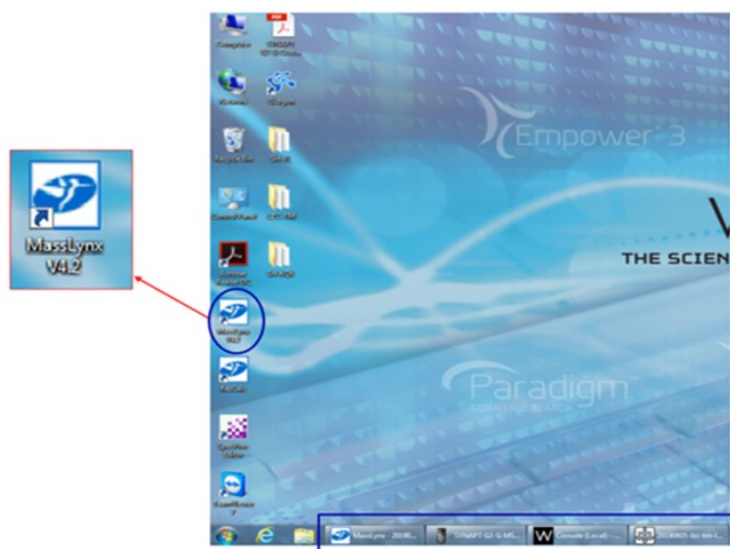


图6-3

6.5.2 打开项目文件及个人进样列表

Step 1. 点击仪器任务栏最小化的Masslynx图标（图6-4），默认显示为上一次仪器实验的测试序列(图6-5)。



图 6-4

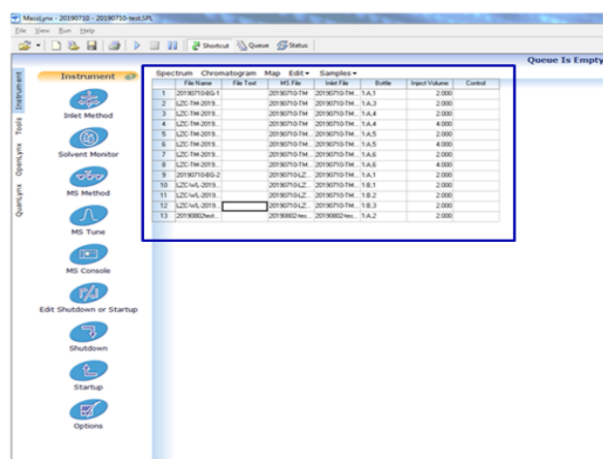


图 6-5

Step2. 点击 File – Open Project... (图 6-6), 弹出 6-7 对话框, 点击 Yes

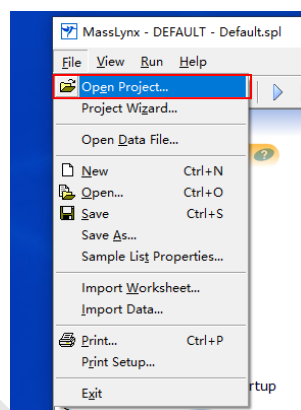


图 6-6

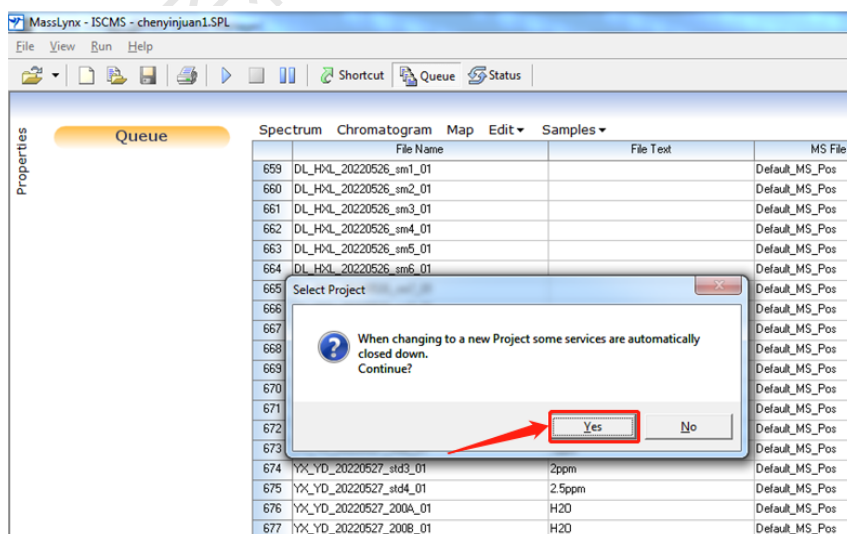


图 6-7

Step3. 选择项目文件

如图 6-8, 根据电脑的数据存储路径, 选择相应 Drives 及 PI Projects 后, 选择自己课题组的项目文件。课题组的项目文件, 通常以课题组负责姓名命名。比如选择 ISCMS.PRO, 即可显示该项目文件 (图 6-9)。

注: 不清楚存储路径, 请联系技术员。

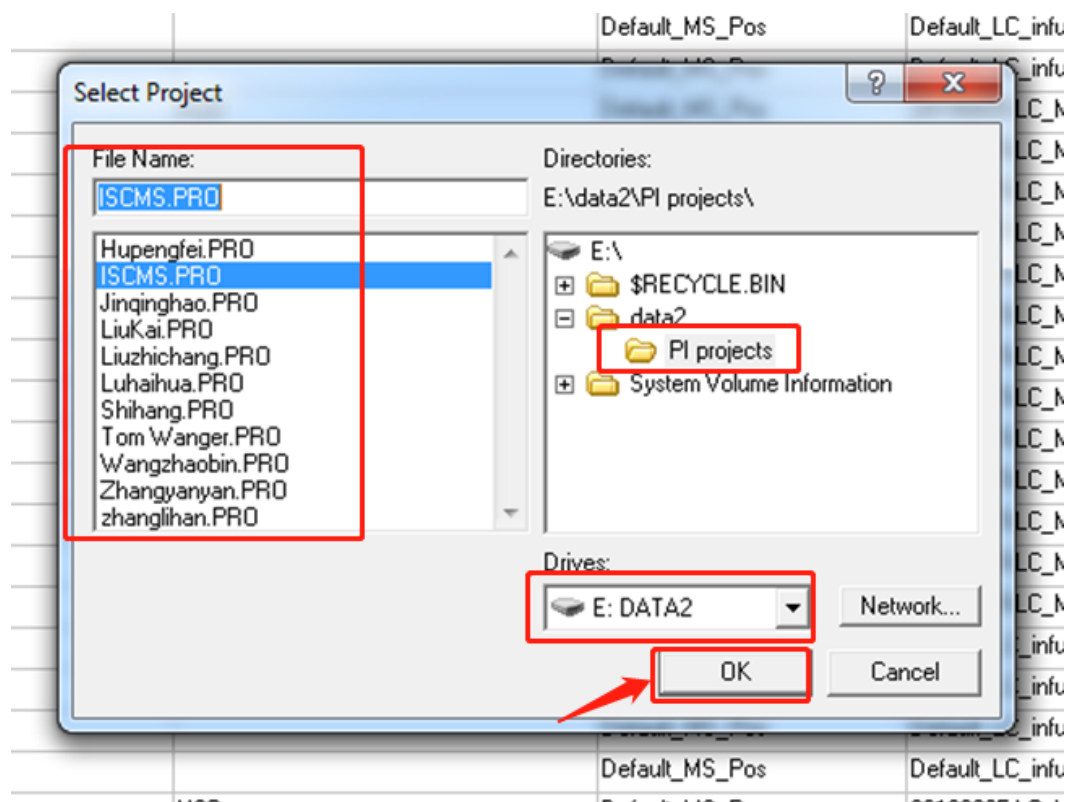


图 6-8

Step4. 选择个人进样表

在课题组的项目文件下, 进一步点击 File – Open... (图 6-9), 弹出 6-10 对话框, 选择个人进样列表-open, 即可显示该项目文件下的用户个人进样列表情况 (图 6-11)。窗口右上角会有 Masslynx-project-sample list 显示, 如 Masslynx-ISCMS-chenyinjuan1.spl。

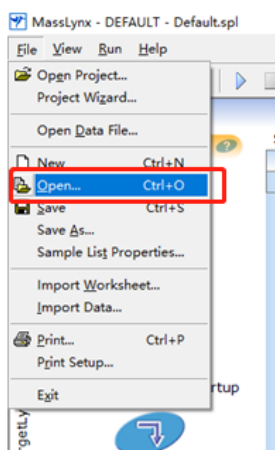


图 6-9

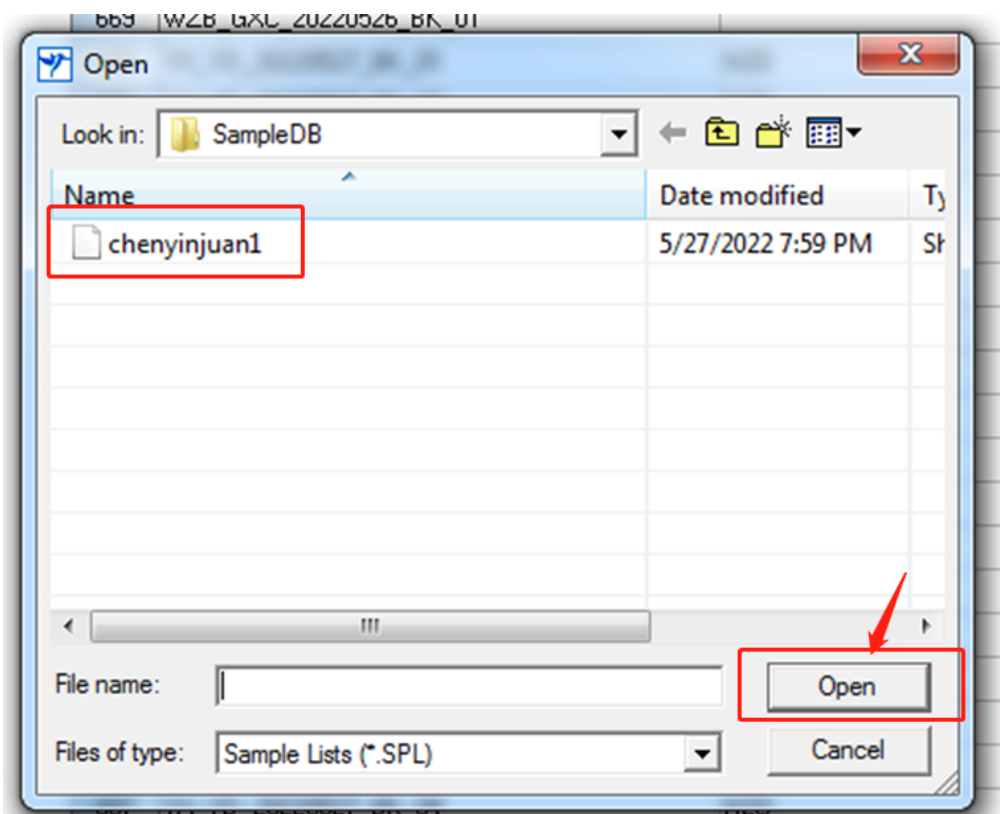


图 6-10

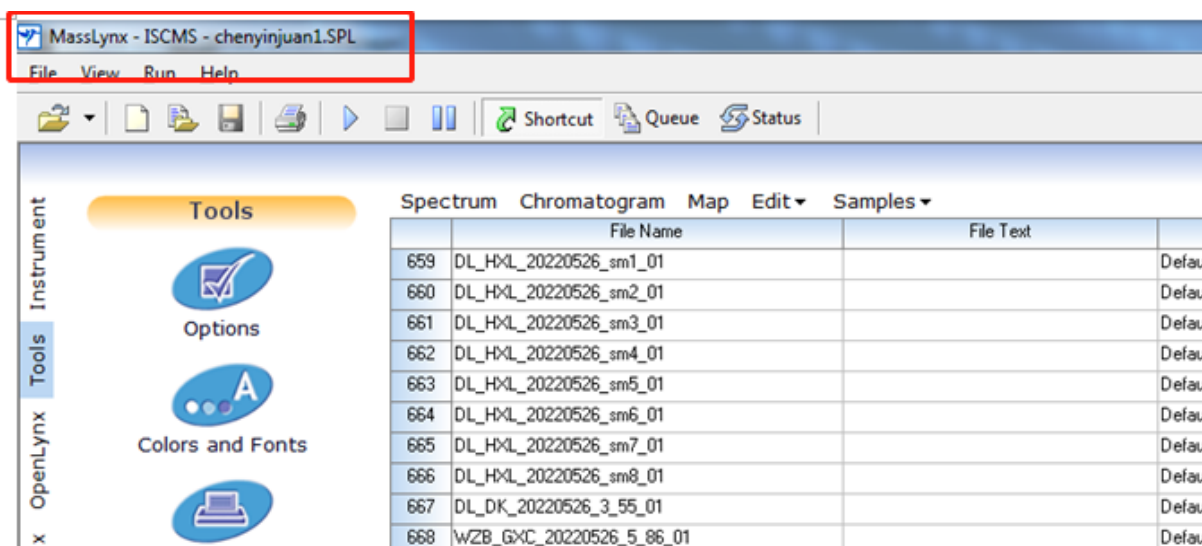


图 6-11

6.6. 仪器准备工作

6.6.1 密封件清洗 (Seal Wash)

Step1. 在 Masslynx 主界面 (Shot cut, Instrument 显示), 点击 MS Console 界面 (图 6-12) 或者点击电脑任务栏 MS Console 图标 (图 6-13), 打开仪器控制台界面。

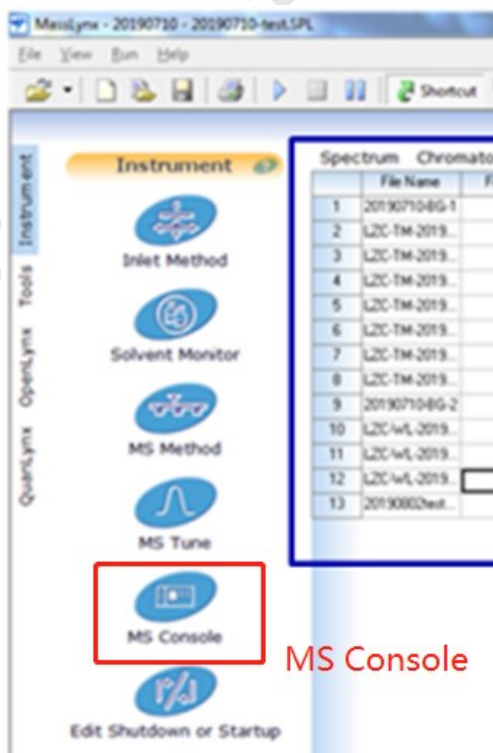


图 6-12



图 6-13

Step2. 如图 6-14, 在 Console 界面, 选择 Binary Solvent Manger – Control-Prime seal wash (图 6-14), seal wash 泵开始工作, 运行时间 2 分钟。

注: 再次点击 Prime seal wash, 则 seal wash 泵运行停止。

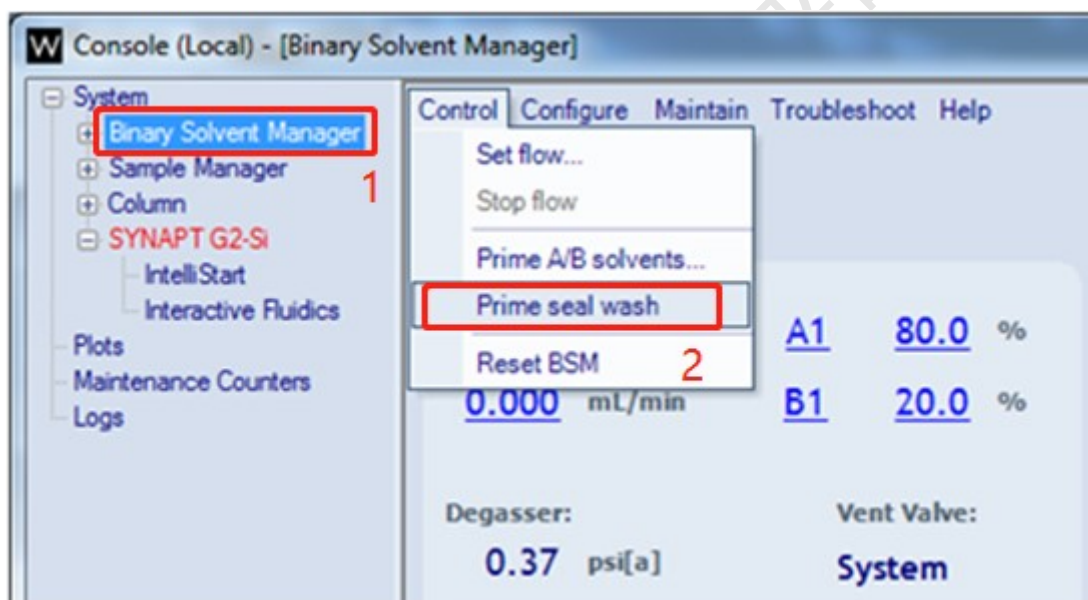


图 6-14

6.6.2 灌注操作 (Prime Solvents)

如图 6-15, 在 Console 界面, 选择 Binary Solvent Manger – Control-Prime A/B solvents 操作(图 6-15), 弹出对话框(图 6-16), 勾选流动相 A, B, 设置时间 2-4 min, 点击 Start。二元流动相开始运行, Binary solvent manager 显示 Priming 提醒。

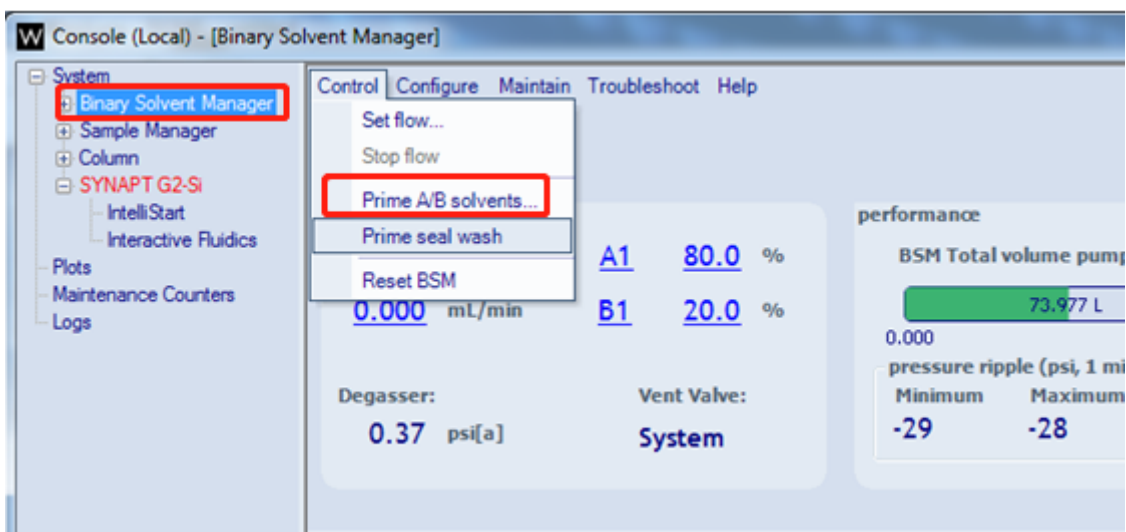


图 6-15

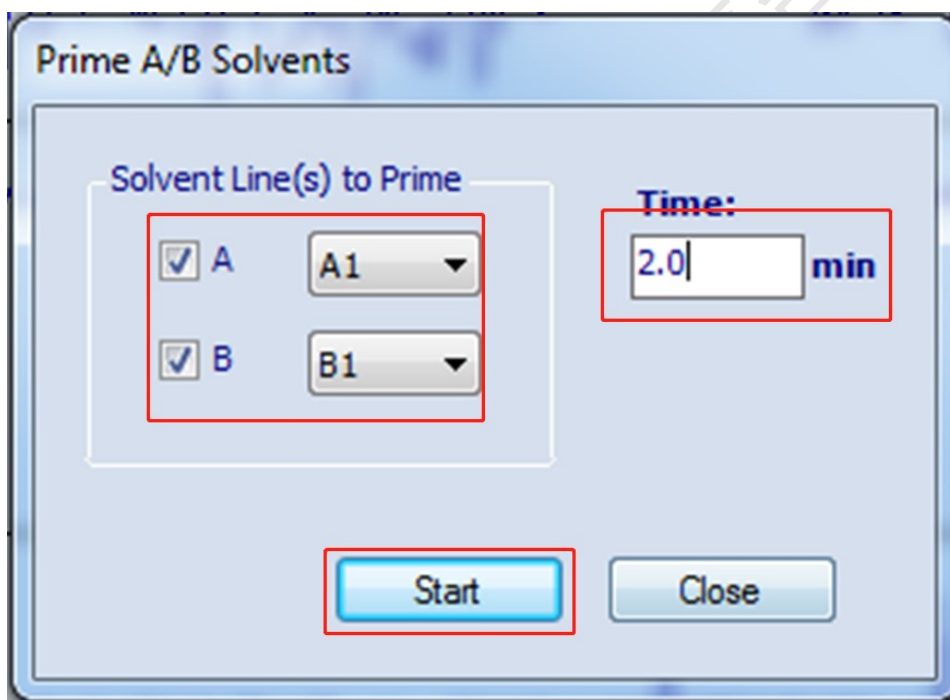


图 6-16

6.6.3 进样针及注射器清洗

在 MS Console 界面, 选择 Sample Manger-Control - Prime syringes 操作(图 6-17), 弹出对话框(图 6-18), 选择 Sample syringe and wash syringes, 设置循环次数为 2-3 次, 点击 OK。Sample manager 将显示进样器清洗状态提醒。

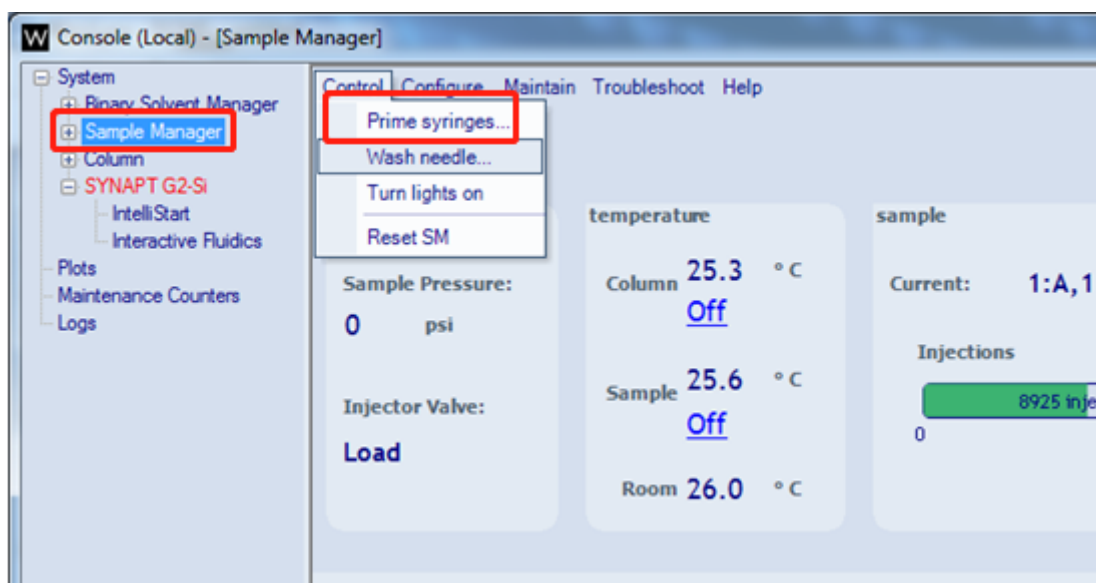


图 6-17

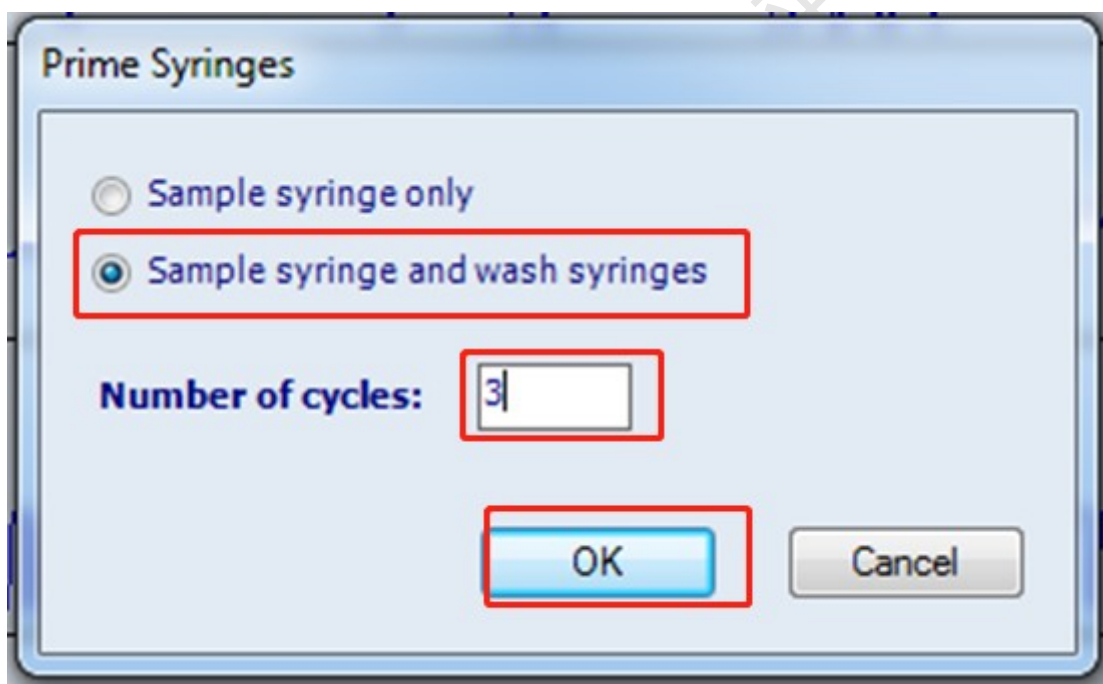


图 6-18

6.6.4 质谱调谐

该操作由技术员执行。 高分辨飞行时间质谱精度受室内温湿度变化，仪器每天需进行质量轴调谐。调谐模式必须与用户使用模式一致，使用前，请务必与技术员进行确认仪器已完成当天调谐且通过。

6.6.5 打开质谱界面

Step1. 在 Masslynx 操作主界面(Shot cut, Instrument 显示),选择 MS tune 图标(图 6-19),或者点击任务栏 MS tune 图标(图 6-20), 进入质谱操作界面(图 6-21)。

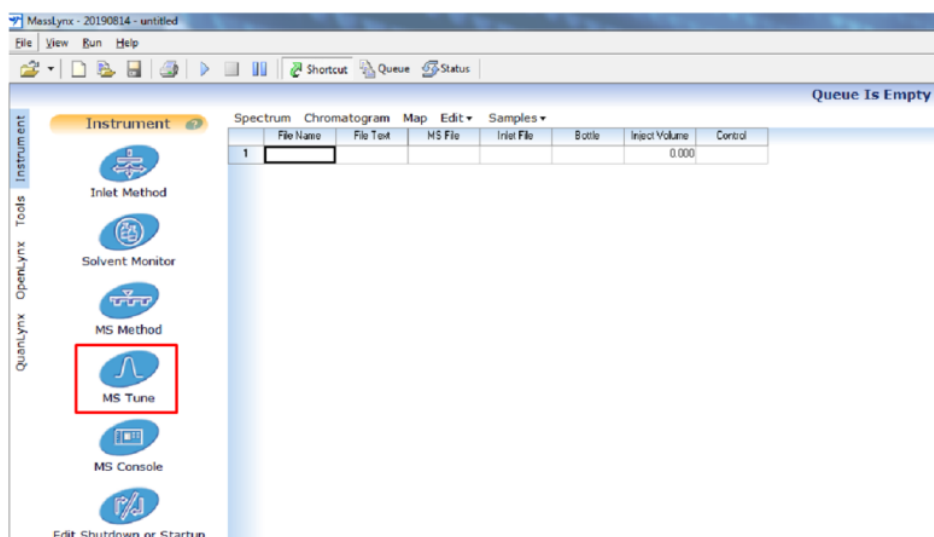


图 6-19



图 6-20

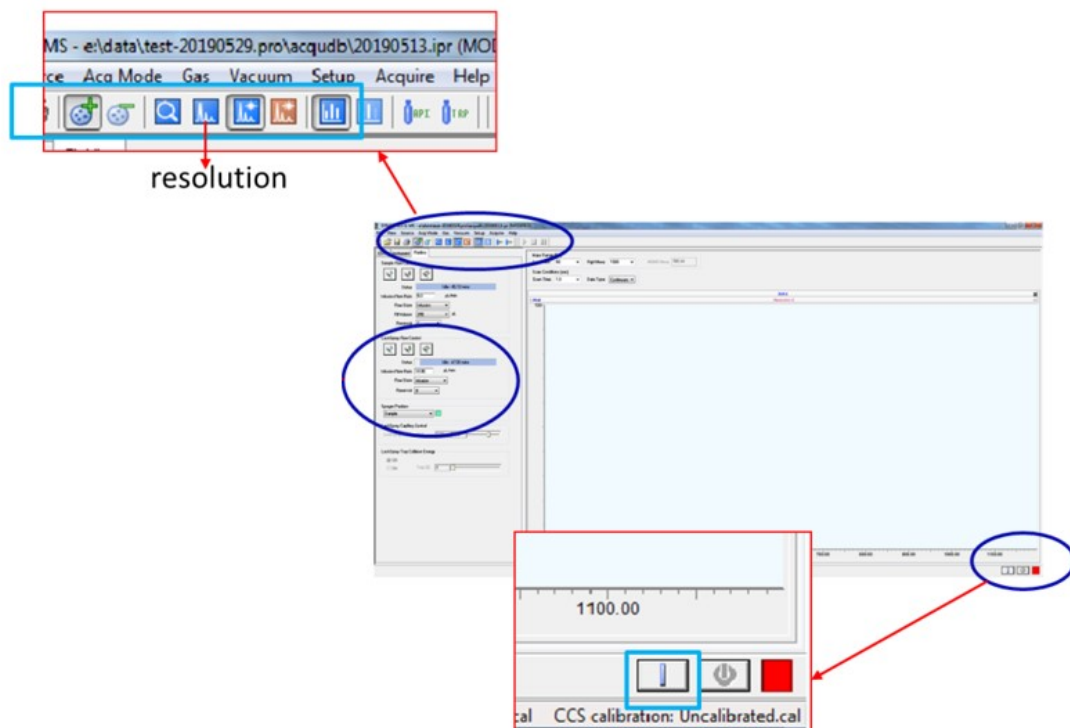
Step 2. 在 MS 操作界面(图 6-21), 需要进行以下操作:

① 选择离子模式和分辨率模式

注: 离子模式根据待测样品需求进行选择; 分辨率模式: 选择 Resolution。默认为 ESI+, Resolution 模式

② 操作窗口右下角, 点击 Operate 开关。(点击后, 红色方框变为绿色为正常)

1: 选择离子模式和分辨率模式



2 : 点击operate 按钮
(点击后显示红色变为绿色)

图 6-21

6.7. 编辑进样列表

样品列表编辑顺序: 空白 (1-2 针) -标准品 (从低浓度到高浓度) -实际样品-空白 (1-2 针)

Step1. 回到 Masslynx 主界面, 打开个人进样列表或者新建进样列表 (图 6-22)。进样列表每一行序列共包含: 序列编号, File name, File text, MS File, Inlet File, Bottle, Inject volume 和 Control 共 8 列。选择序列-右键-Add, 可在当前基础上增加数个序列

- ① File name: 必填项, 文件名称, 即某一样品测试所有结果的总文件命。
- ② File text: 选填项, 可输入样品名称或编号等信息;
- ③ MS File: 必填项, 质谱方法文件;
- ④ Inlet File: 必填项, 色谱方法文件;
- ⑤ Bottle: 必填项, 样品瓶位置;
- ⑥ Inject Volume: 必填项, 注入体积;

⑦ Control: 选填项。

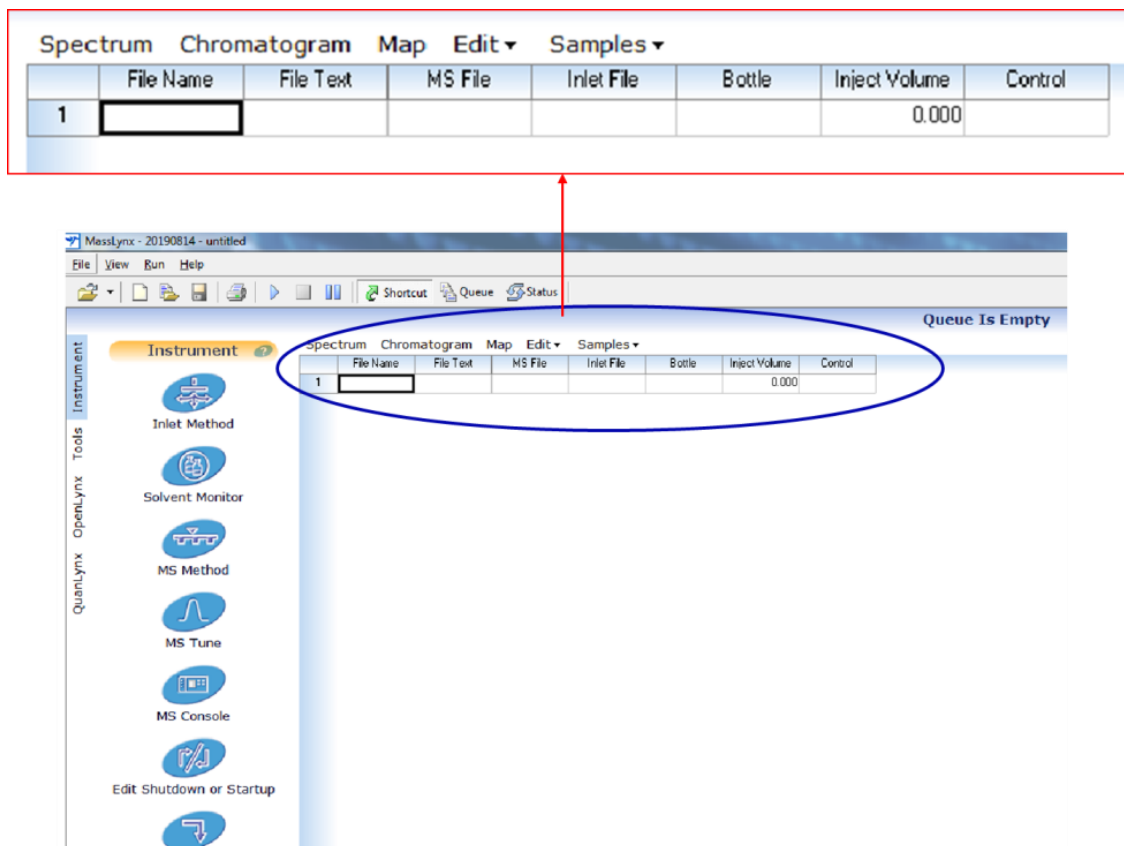


图 6-22

6.7.1 文件名(File name)

Step1. 如图 6-22, 在 Masslynx 操作界面主页, 选中 File name 下方空格, 双击至显示光标, 即可输入文件名。

- 命名原则: 导师姓名首字母(大写)_个人首字母(大写)_日期_样品编号_测试序号, 中间用下划线连接, 不要用连字符

例如: 张三老师李四的样品, 测试时间为 2017 年 6 月 15 日, 样品编号为 sm1, 进行第一针测试, 那么文件命名为: **ZS_LS_20170615_sm1_01**

- 进行二次测试, 则增加另一序列, 文件名为 ZS_LS_20170615_sm1_02, 以此类推。

注: (1) File name 不可重复;

(2) 进样行不够, 请右键-add, 可增加若干实验序列, 默认添加的序列, **禁止删除已运行行**。新建行中 File name, Bottle 等以数字结尾的, 系统自动按数字或样品瓶序列进行自动增加。

6.7.2 编辑 File Text 列

此为用户个性化编辑窗口, 输入字段主要用于提醒, 比如样品的差异性, 方法差异性等等。如无需要, 可以不编辑。

6.7.3 建立色谱方法文件(Inlet File)

6.7.3.1 直接进样

请联系技术员新建 Default_infusion 方法, 直接调用。

调用具体操作: 选中 Inlet File 小格-右键-Browse (图 6-23)

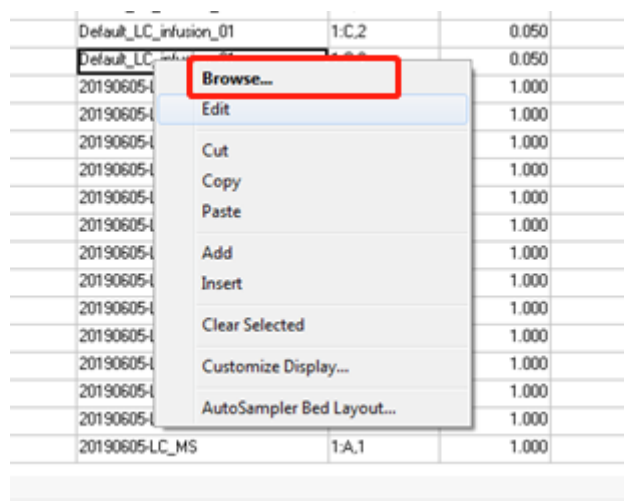


图 6-23

6.7.3.2 液相进样方式

Step1. 选中 Inlet File 小格-右键-Edit, 打开液相方法编辑窗口 (图 6-24, 6-25)

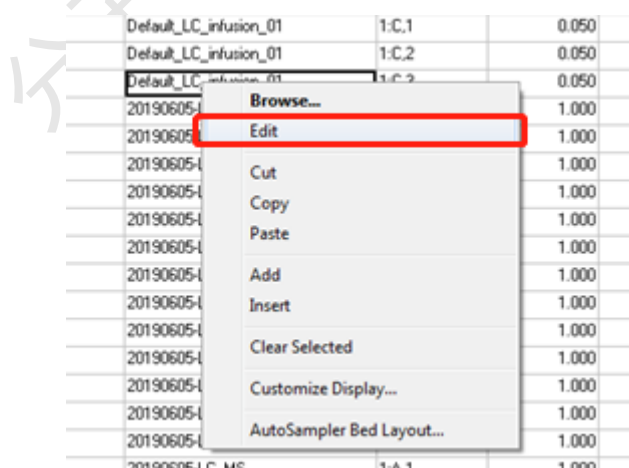


图 6-24

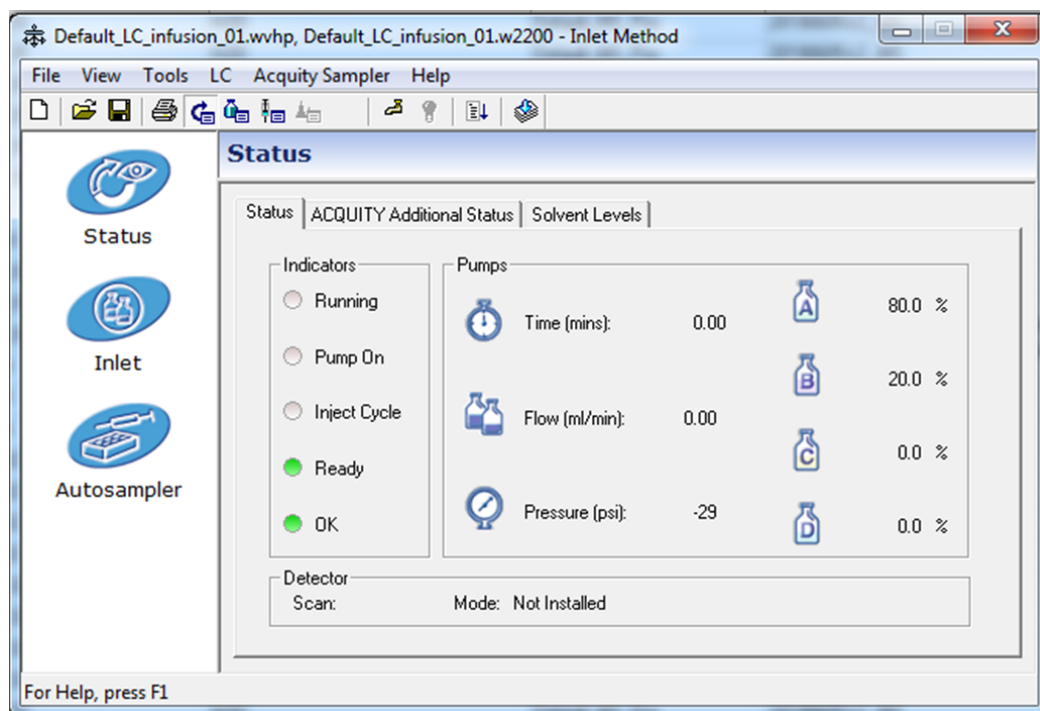


图 6-25

Step2. 编辑梯度洗脱方法

在图 6-25 中，点击左侧 Inlet 图标，弹出图 6-26。

设置 A、B 相成分（A 为水相，B 为有机相），流速为 **0.4 ml/min**，系统压力上下限及洗脱梯度。在 run time 窗口，输入总的运行时间。

注意：反相洗脱，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。

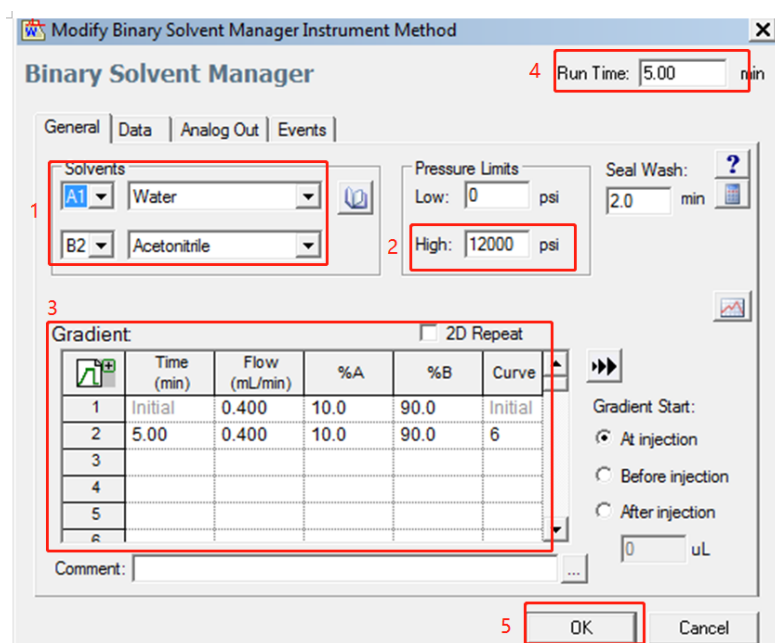


图 6-27

Step 3. 编辑自动进样器 Autosampler

在图 6-25 中, 点击左侧 Autosampler 图标, 弹出图 6-28。

可根据色谱分析温度和样品要求设置柱温箱温度及样品箱温度, 点击 OK 确认。

注: (1) 样品对温度不敏感, 可不设样品箱温度;

(2) 柱温箱不可降温, 温度设置需综合考虑色谱柱温度耐受性;

(3) 在 Run time 窗口, 输入总的运行时间。

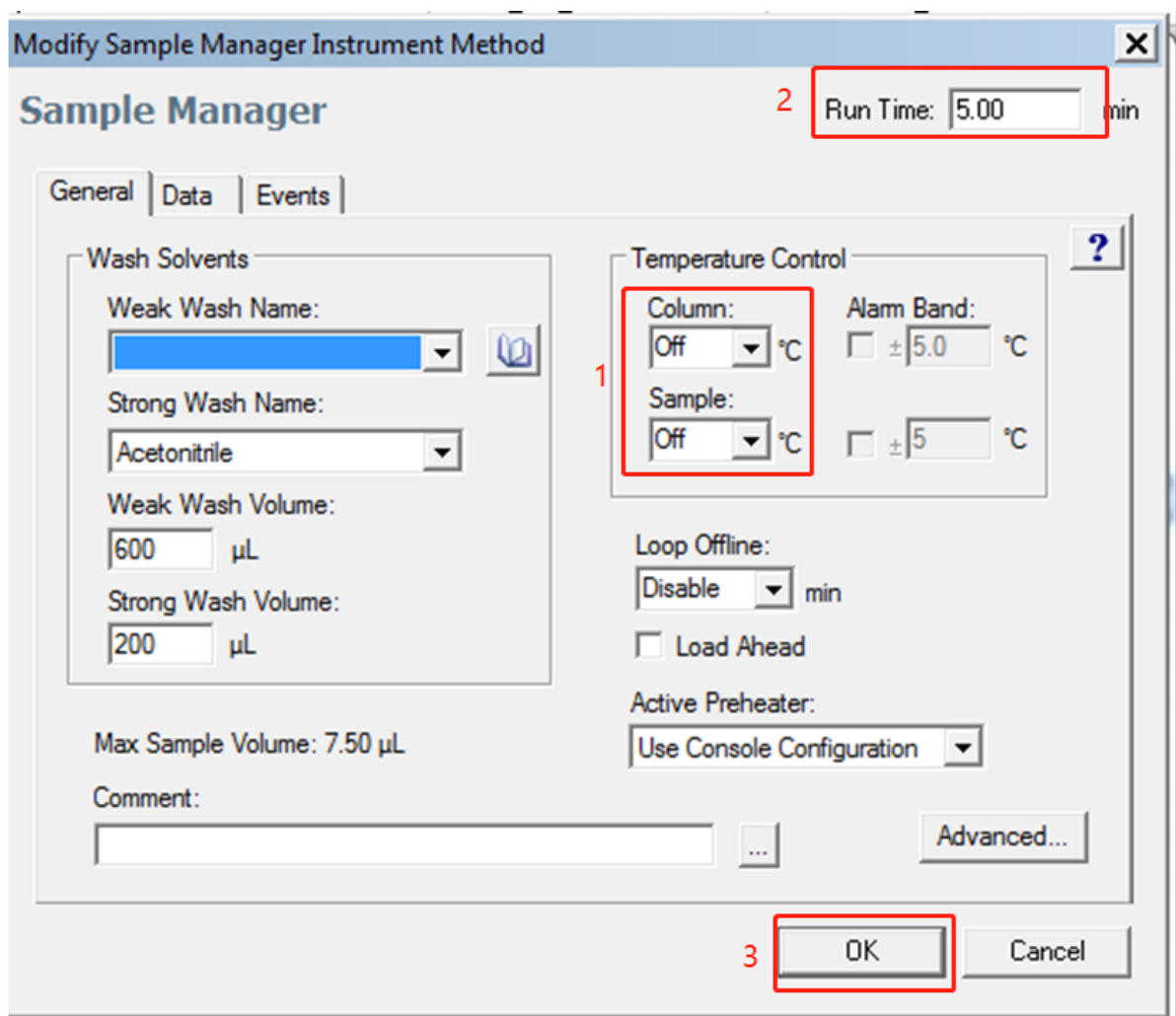


图 6-28

Step 4. 保存方法

请检查所有的方法设定项，确认无误，点击 File-Save，保存方法。

为便于快速识别个人液相方法，建议方法命名原则为：

用户名首字母大写_体系_色谱柱_时间

比如：LRZ_TCM_T3_16min

使用该液相方法，可选中 Inlet File 小格-右键-Browse，即可调用（图 6-23）。

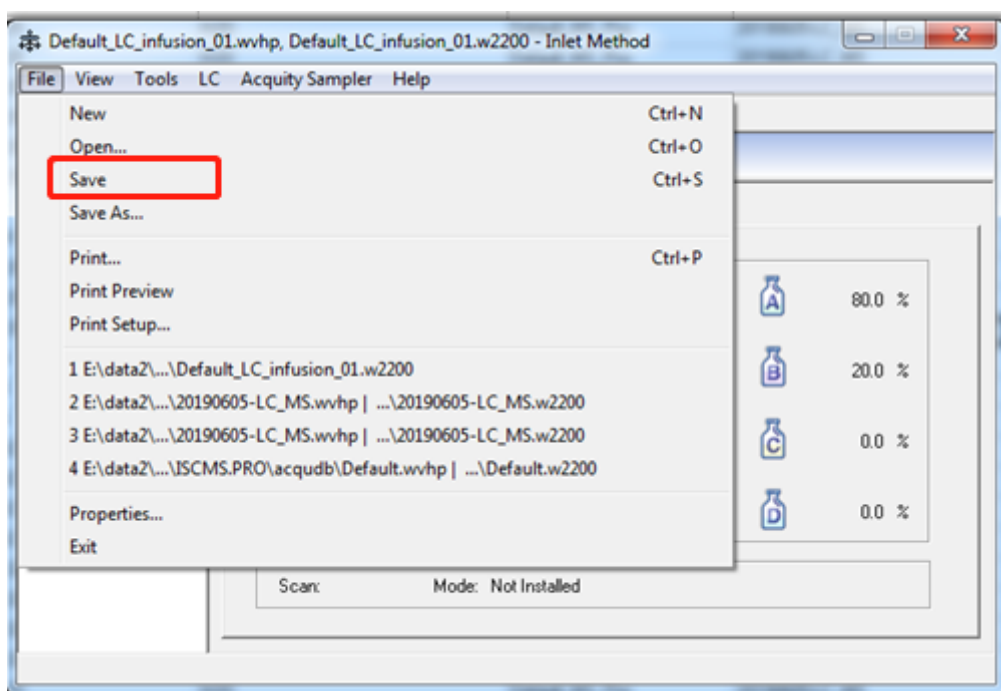


图 6-29

6.7.4 建立质谱方法文件(MS File)

6.7.4.1 直接进样的样品

请联系技术员，新建 Default_MS_Pos 或者 Default_MS_Neg 方法文件，直接调用。

调用具体操作：选中 MS File 小格-右键-Browse（图 6-30）

注意：由于样品体系分子量不同，用户调用该质谱方法后，应选中 MS File 小格-右键-edit，修改质荷比范围。

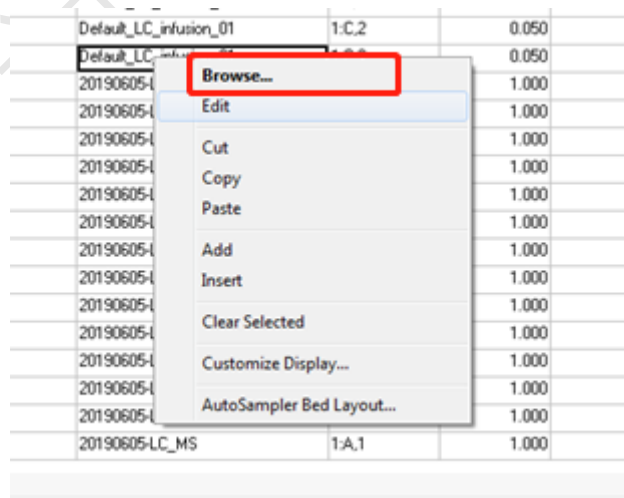


图 6-30

6.7.4.2 液质分析

Step1. 在 Masslynx 操作界面主页, 选中 MS File 下方空格-右键- Edit, 弹出 Experiment setup 对话框。

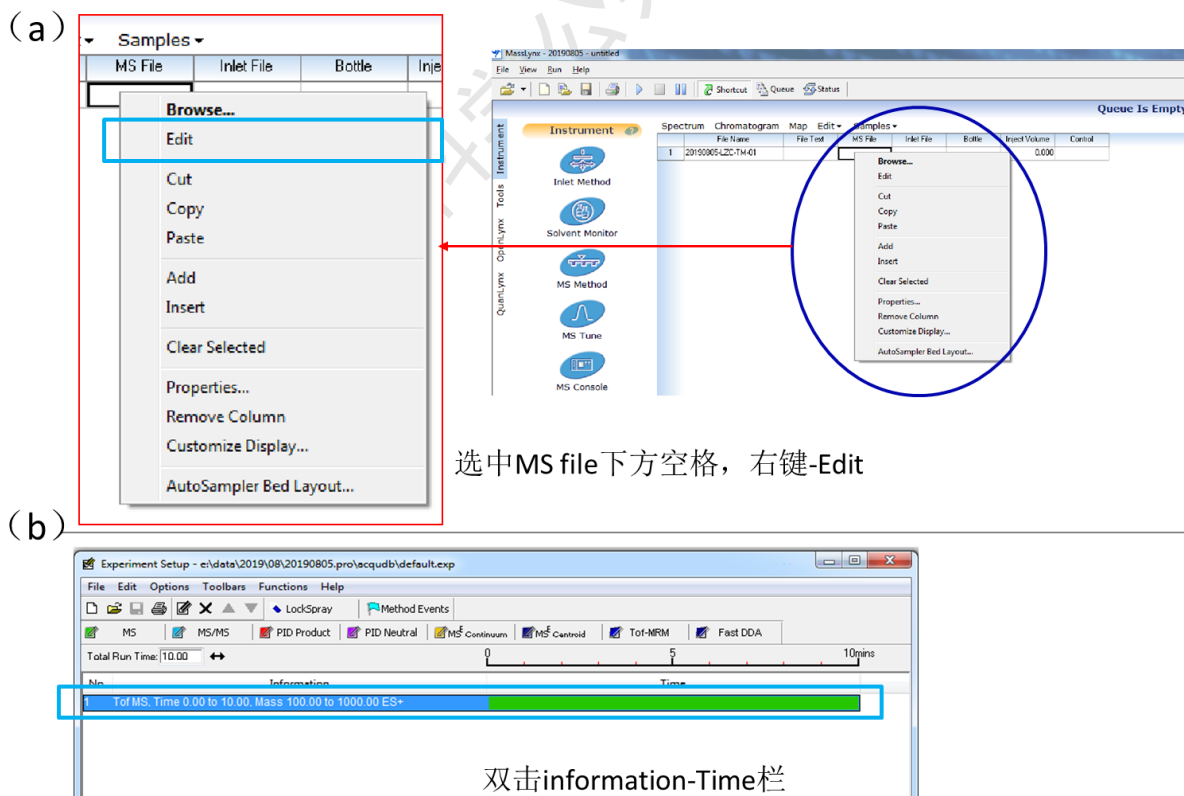
Step2. 修改数据采集参数:

请按 6-31(b)-(e)进行如下操作:

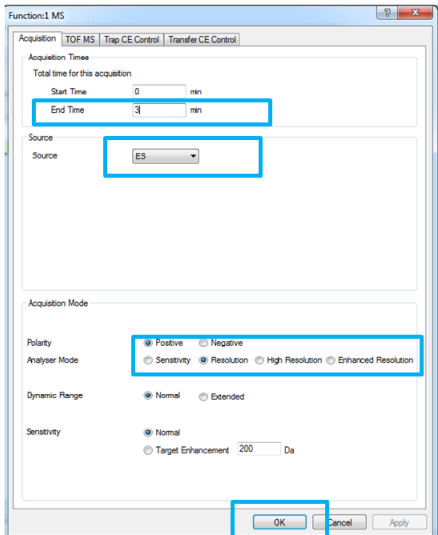
- 图 6-31 (b): 双击 Information-Time 栏, 显示图 6-31(c);
- 图 6-31(c): 共进行 4 项设置:
 - ① 设置数据采集总时间, 与液相方法一致;
 - ② 设置离子源种类: 电喷雾离子源;
 - ③ 设置扫描模式: Polarity (离子极性), Analyzer mode(质量分析器模式);
 - ④ 点击 OK 选择; 显示图 6-31(d)。

注: 扫描模式必须与质量轴校正及 Lockspray 校正选择的的模式一致。

- 图 6-31(d): 共进行 3 项设置。①设置扫描质荷比范围; ②设置设置扫描条件: Scan time 0.2 s; Data format: Continuum; ③点击 OK 选择; 显示图 6-31(e)。

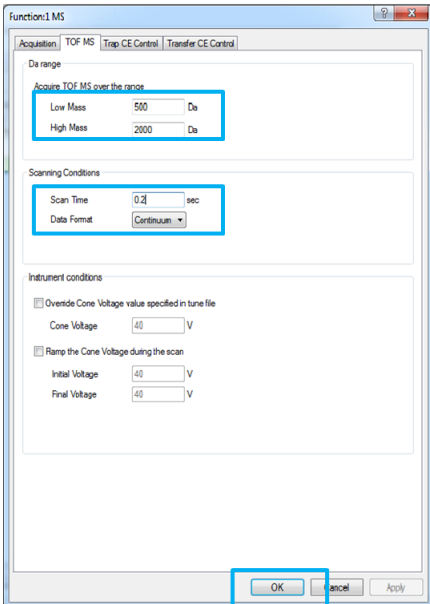


(c)



1. 设置数据采集总时间, 与液相方法一致
2. 离子源种类: 电喷雾离子源。
3. 扫描模式: polarity (离子极性), analyzer mode(质量分析器模式) 与create calibration及lockspray校正文件一致
4. 点击OK

(d)



1. 设置扫描质荷比范围;
2. 设置扫描条件: scan time 0.2 s; data format: continuum
3. 点击OK

(e)

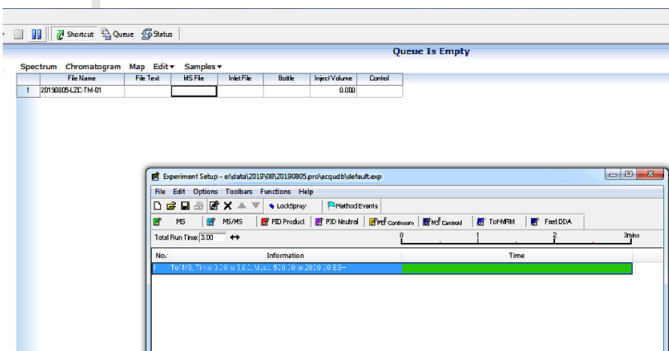


图 6-31

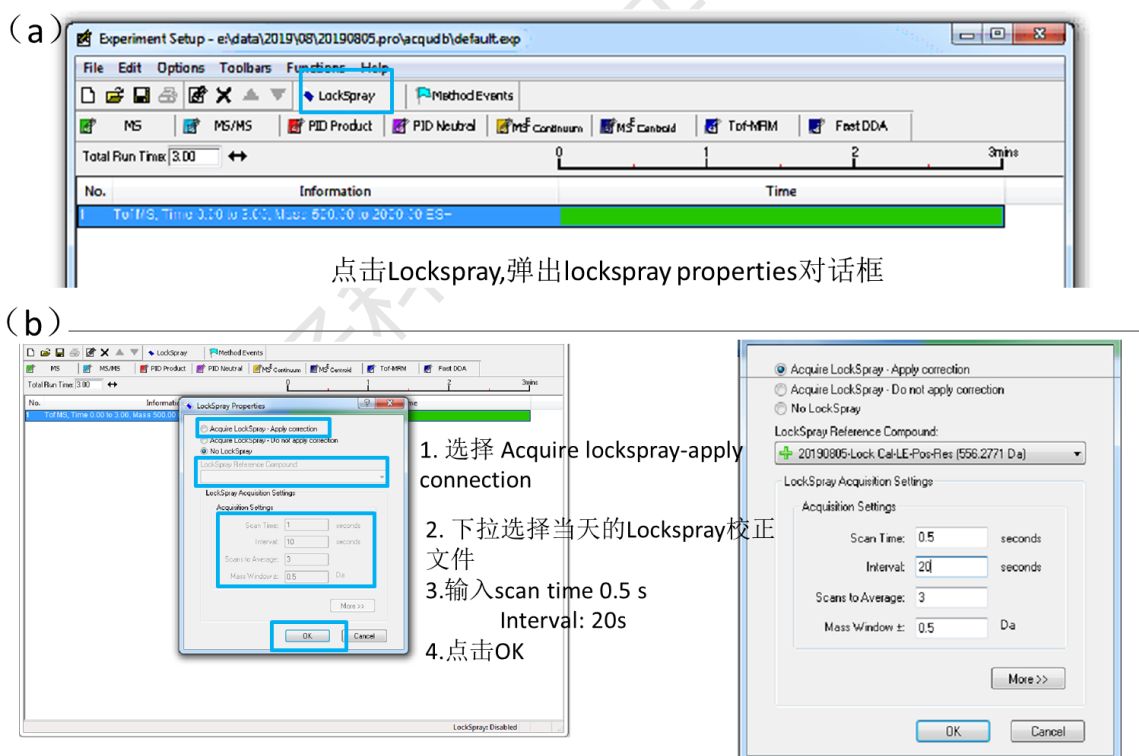
Step3. 确认 Lockspray 校正文件

只要用户选择了正确的 MS 方法, 只需确认 Lockspray 模式。其他无需操作。

- 图 6-32(a): 点击 Lockspray, 弹出 Lockspray properties 对话框, 显示图 6-32(b);
- 图 6-32(b): 共进行 4 项设置:
 - ① 选择 Acquire lockspray - Apply connection;
 - ② 下拉选择正确的 Lockspray 校正文件;
 - ③ 输入 Scan time 0.5 s; Interval: 20s;
 - ④ 点击 OK 选择; 显示图 6-32(c)。
- 图 6-32(c): 点击 Method events, 弹出 Method events 对话框, 显示 6-32(d);
- 图 6-32(d): 勾选 Enable, 点击 OK 选择; 显示图 6-32(e);
- 图 6-32(e): 为便于快速识别个人液相方法, 建议方法命名原则为: 用户名首字母大写_体系_MS_模式

比如: LRZ_TCM_MS_Pos; LRZ_TCM_DDA_Pos

如使用该质谱方法, 可选中 MS File 小格-右键-Browse, 即可调用。



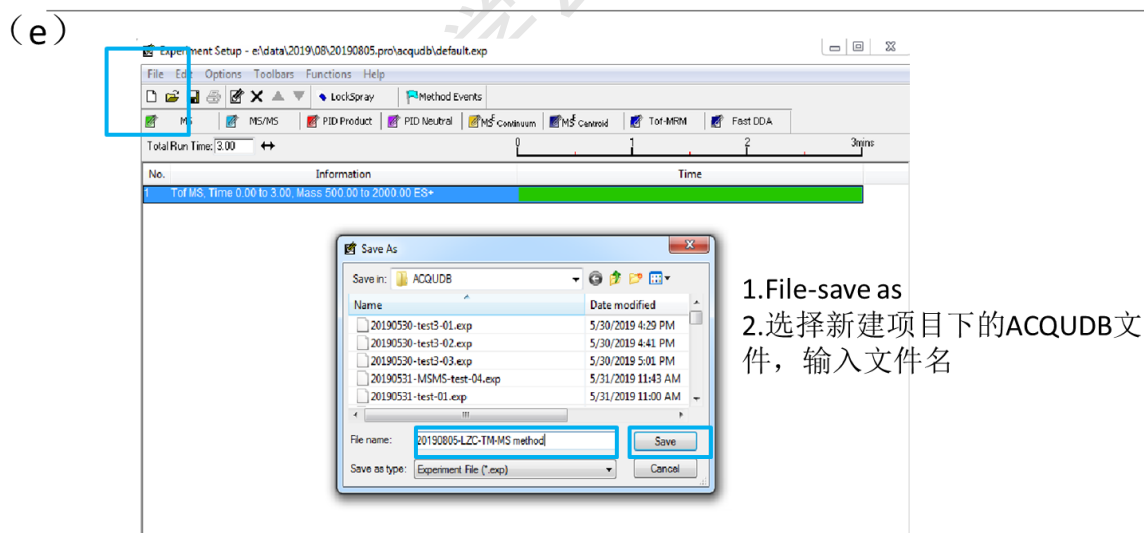
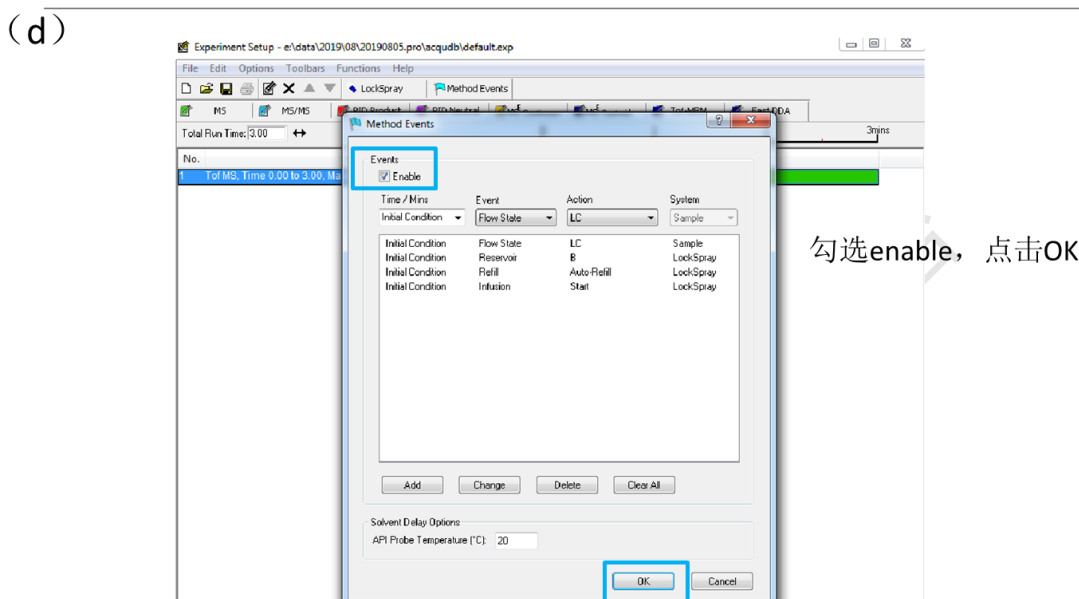
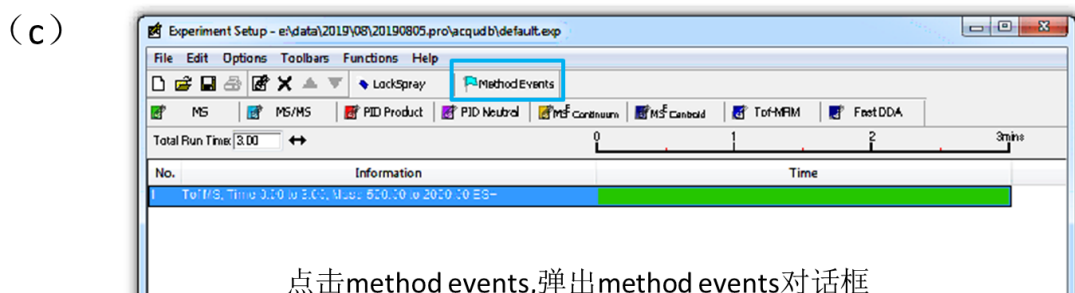


图 6-32

6.8 选择色谱、质谱方法

回到 Masslynx 主页, 在 Masslynx 操作界面主页, 选中 Inlet File (或 MS file) 下方空格, 右键, Browse, 选择 6.7 和 6.8 步骤中建立的色谱及质谱方法文件。

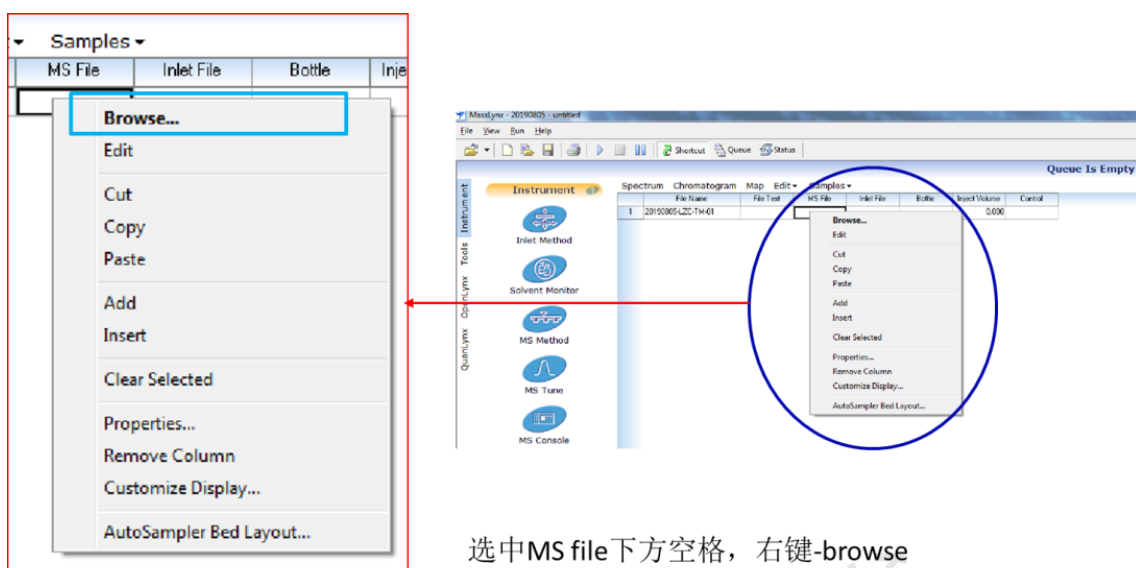


图 6-33

6.9 样品位置选择(Bottle)

图 6-34 是自动进样样品盘实物图。样品盘规格为 6*8, 以缺角至于左上角为正向, 放置在样品管理器中, 每个样品管理器共有两个。

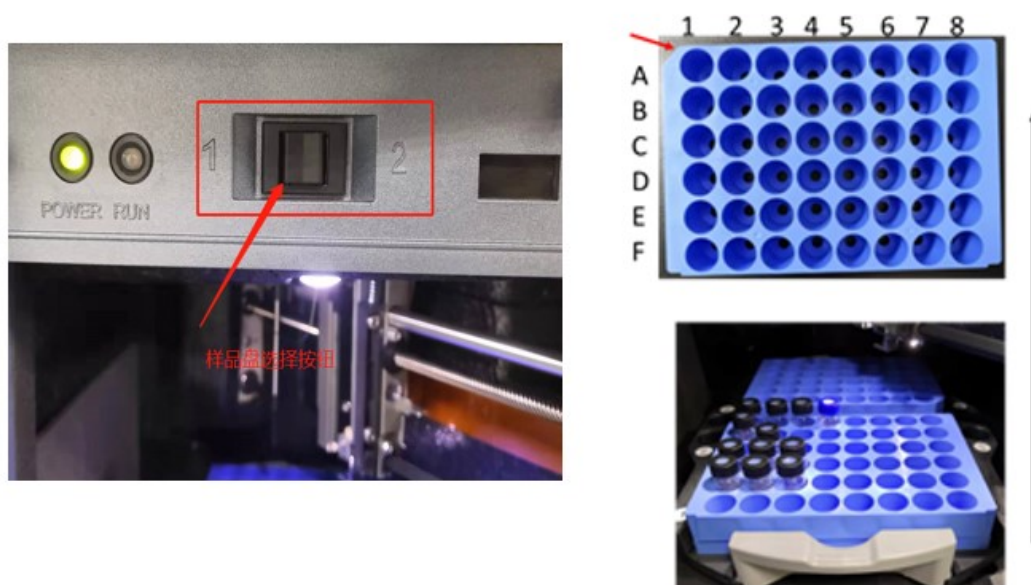


图 6-34

样品管理器共有两个样品盘, 样品盘通过自动进样器1/2按钮进行选择 (图6-34)。

注: (1) 放样时间可灵活处理; (2) 两个样品盘必须通过1/2按钮选择样品盘; (3) 放样: 先开门, 再将样品盘托盘移至门口, 取出样品盘, 将样品盘托盘推至自动进样器腔体; 放完样品重复上述操作, 将样品盘放置托盘中。 (4) 样品盘需水平贴合样品托。

样品瓶位置有两种输入方法, 操作如下:

手动输入: 选中 Bottle 下方空格, 双击至出现光标, 输入格式如下

样品盘:行标,列标

例如:1 号样品盘, A 列, 2 号位, 则输入: 1:A,2

自动输入: 选中 Bottle 下方空格, 右键-Auto Sampler Bed Layout, 出现样品盘选择器(图 6-35 (b))。根据自己放置的样品盘位置, 首先选中样品盘, 然后点击行列标的具体位置, 最后点击 Instead, 关闭窗口, 即可。

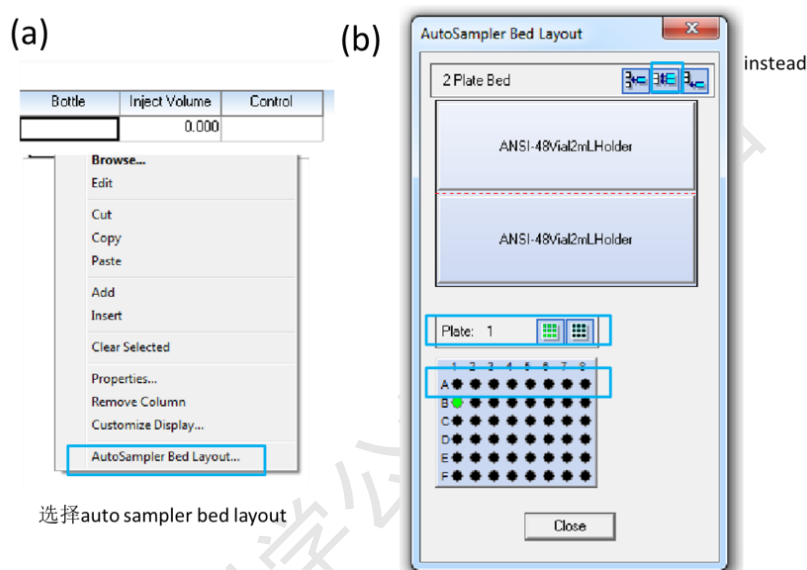


图 6-35

6.10 进样体积(Inject Volume)

选中 Inject volume 下方空格, 双击至出现光标, 输入 2, 回车。

注: 常规进样体积为 2 ul, 如果样品浓度过高, 务必稀释; 或者减小进样体积。非定量测试, 可进 0.5ul, 0.1ul 等。

6.11 方法运行

6.11.1 如图 6-36, 核对方序列中的方法和其他信息无误后, 保存序列。File - Save。

新建的进样列表, 请以用户名全拼小写保存。

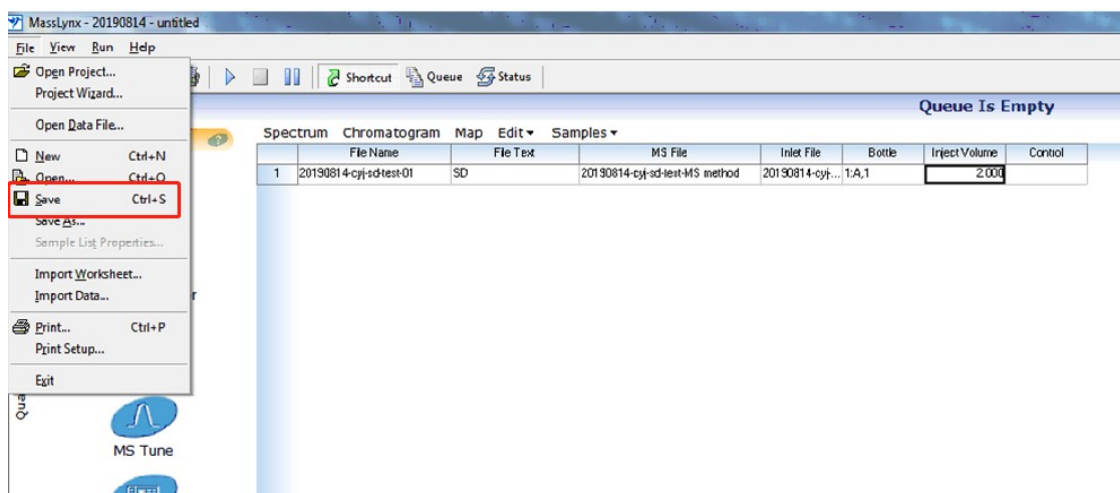


图 6-36

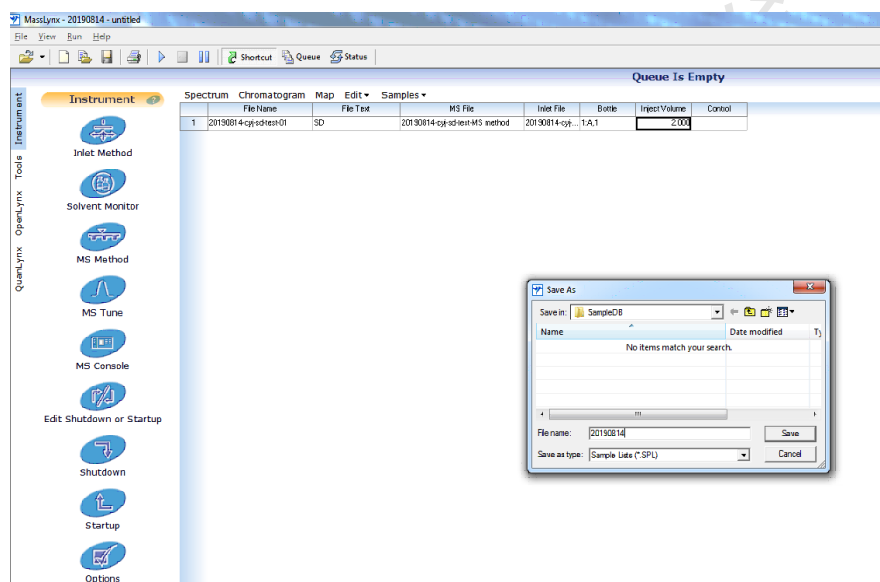


图 6-37

6.11.2 加载方法:

按 6.7 步骤, 打开液相方法窗口, 点击图 6-38 的 load method, 加载液相方法。之后, 液相色谱方法, 开始按用户编辑的方法进行升温、加载初始流动相。

当 Console 界面, 系统压力差小于 30 psi (图 6-39), 可以运行样品。

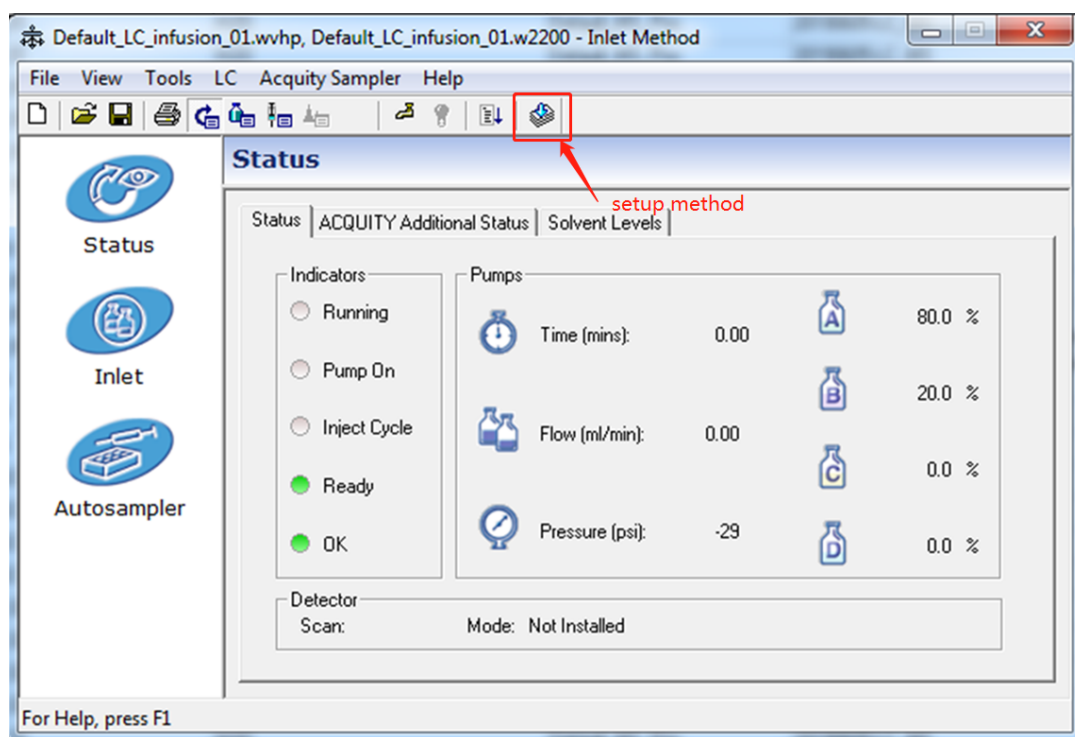


图 6-38

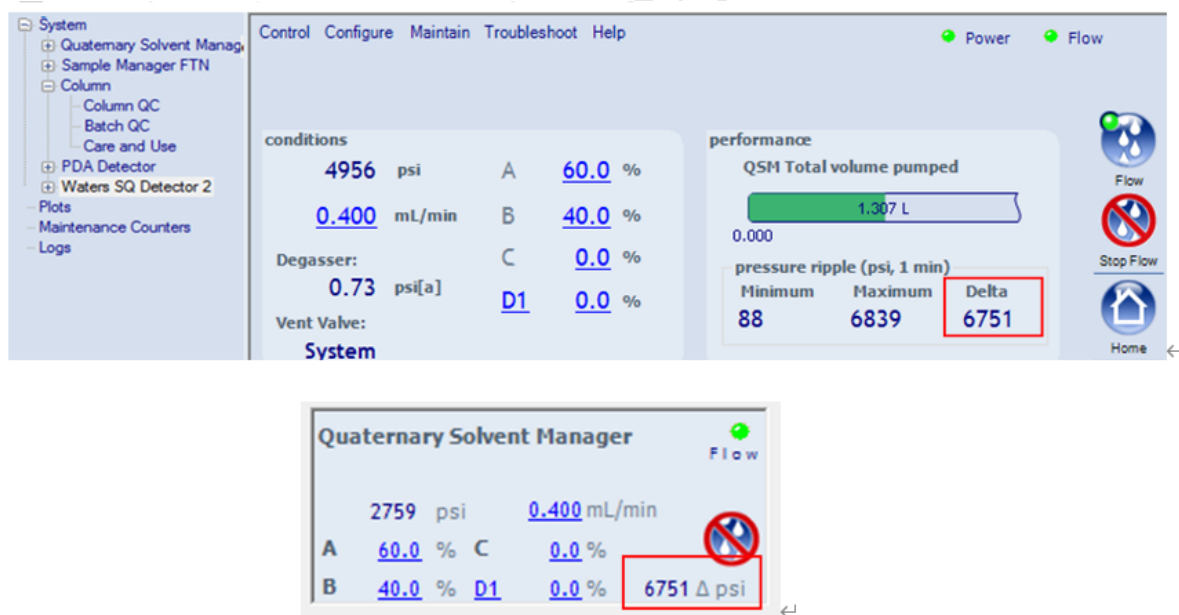


图 6-39

6.11.3 运行样品

选中编辑好的序列，点击三角形图标(Start run)（图 6-40），弹出图 6-41 对话框。

注：运行样品之前，一定要先加载液相方法，Load 液相方法后，溶剂管理器开始运行，

待 Console 界面, 溶剂管理器系统压力差 < 30 psi, 流动相初始比例达到平衡。



图 6-40

6.11.4 确认运行的样品编号

点击 Start run, 弹出 Start sample list run, 显示要运行的序列编号范围, 确认无误, 点击 OK。此时序列开始运行, 当前运行的序列, 有绿色进度显示。运行结束, 绿色进度状态消失。

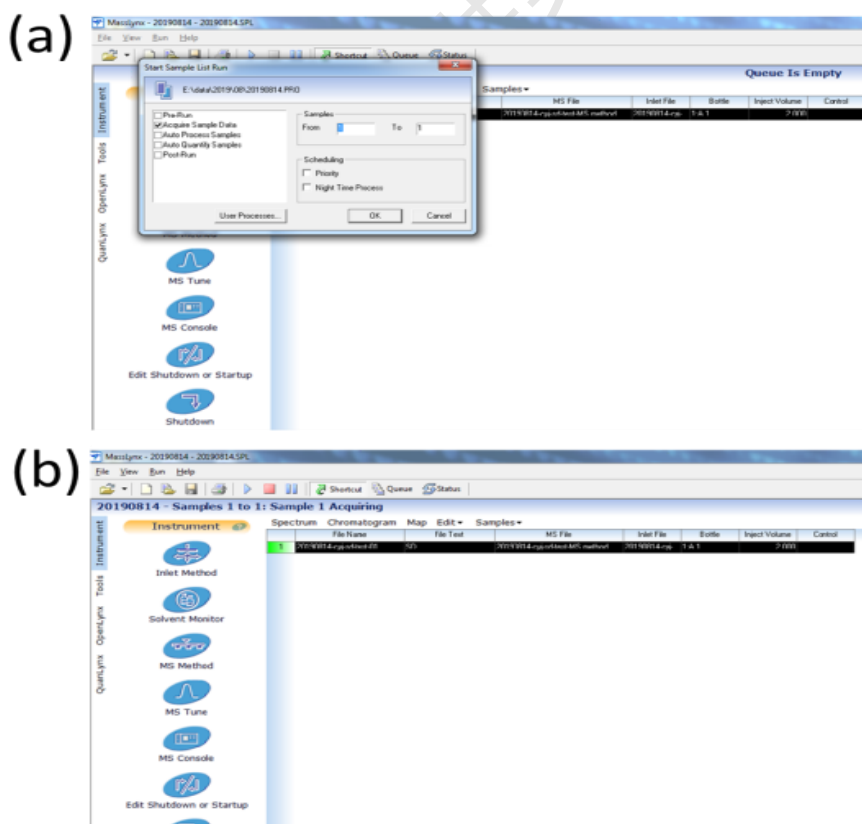


图 6-41

6.12 数据查看

6.12.1 查看色谱图

选中运行结束的序列，点击 Chromatogram（图 6-42）。

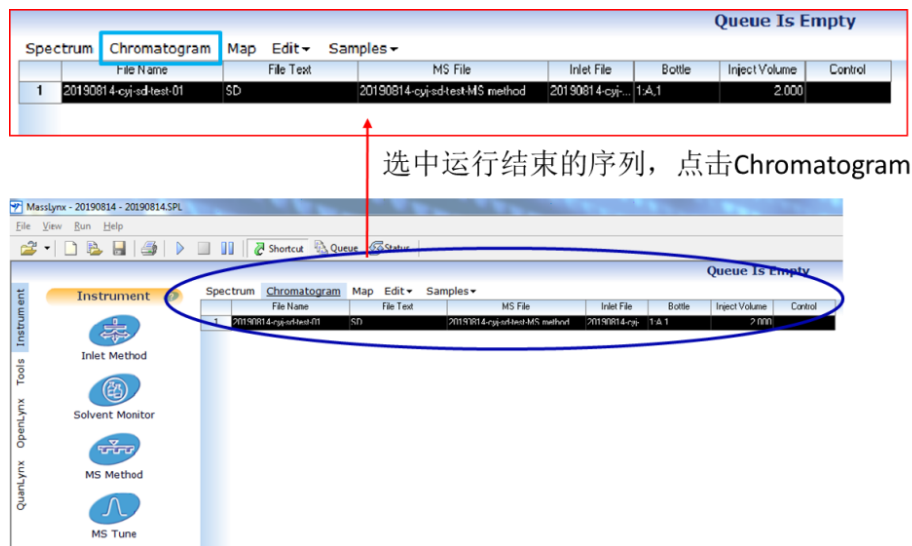


图 6-42

6.12.2 查看质谱图

- 查看某保留时间处的质谱图：在色谱图上某点处双击。
- 查看某段保留时间的质谱图：在色谱图上，按住右键拖拽目标时间段即可（水平拖动，勿使用方框选择）。

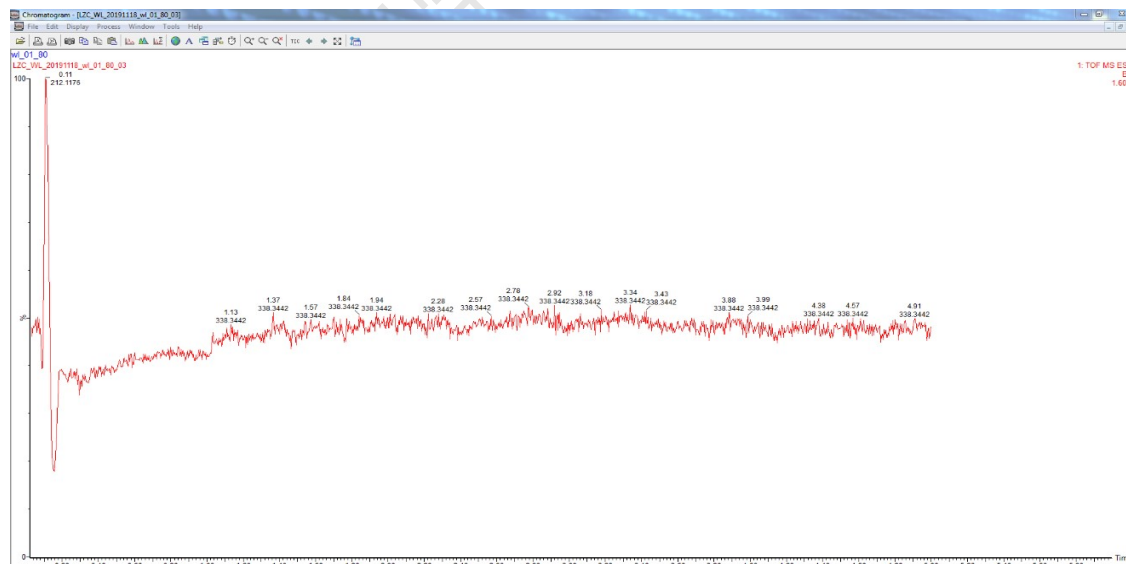


图 6-43

- 弹出质谱图，Process - Automatic peak detection 查看棒状图（测试结果以棒状图为准）

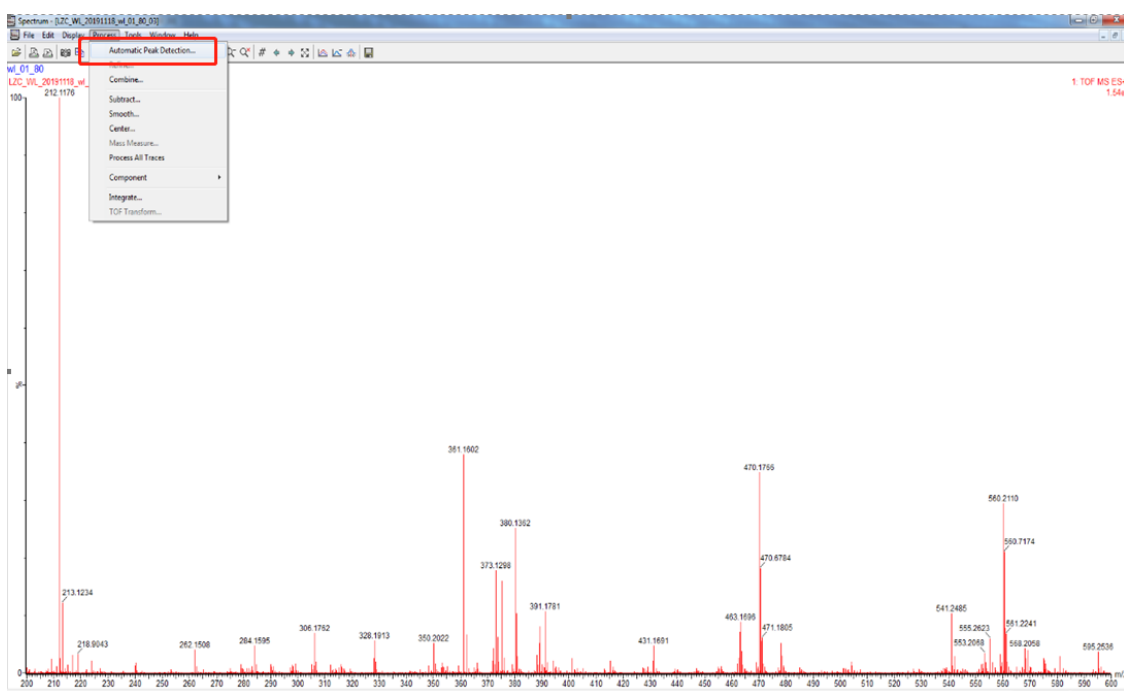


图 6-44

- 捕获质谱图。在质谱图窗口，点击照相机，复制质谱图，打开电脑中的 Paint 画图，粘贴并另存；

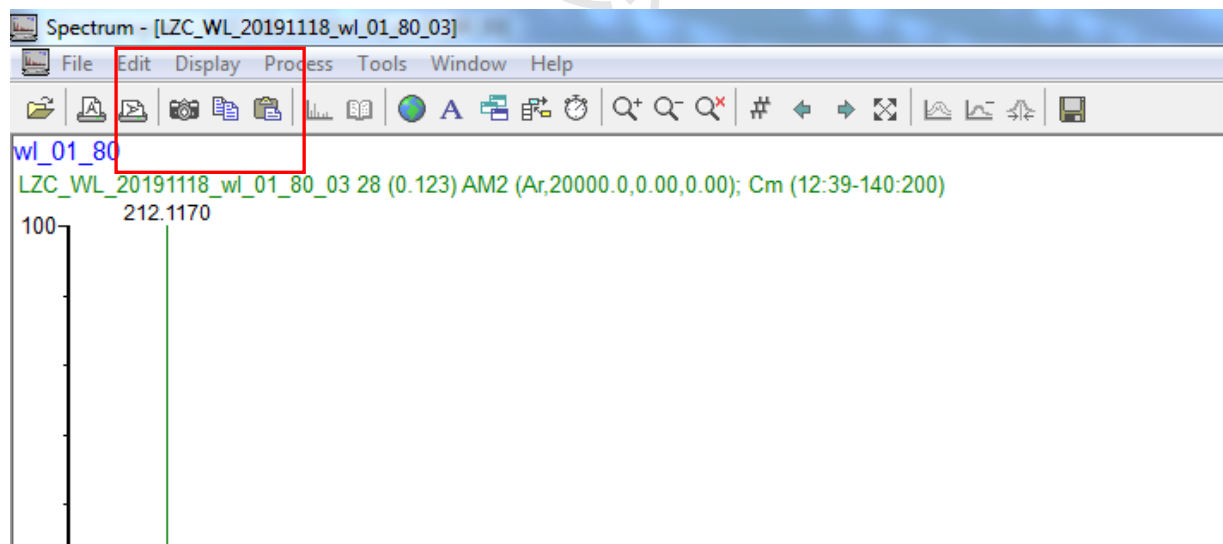


图 6-45

- 获取原始数据。选择 Edit - Copy spectrum lists 复制质谱原始二维数据，新建 Text document 文本文件进行粘贴即可。该 txt 文本可以进一步用 Origin 进行处理。

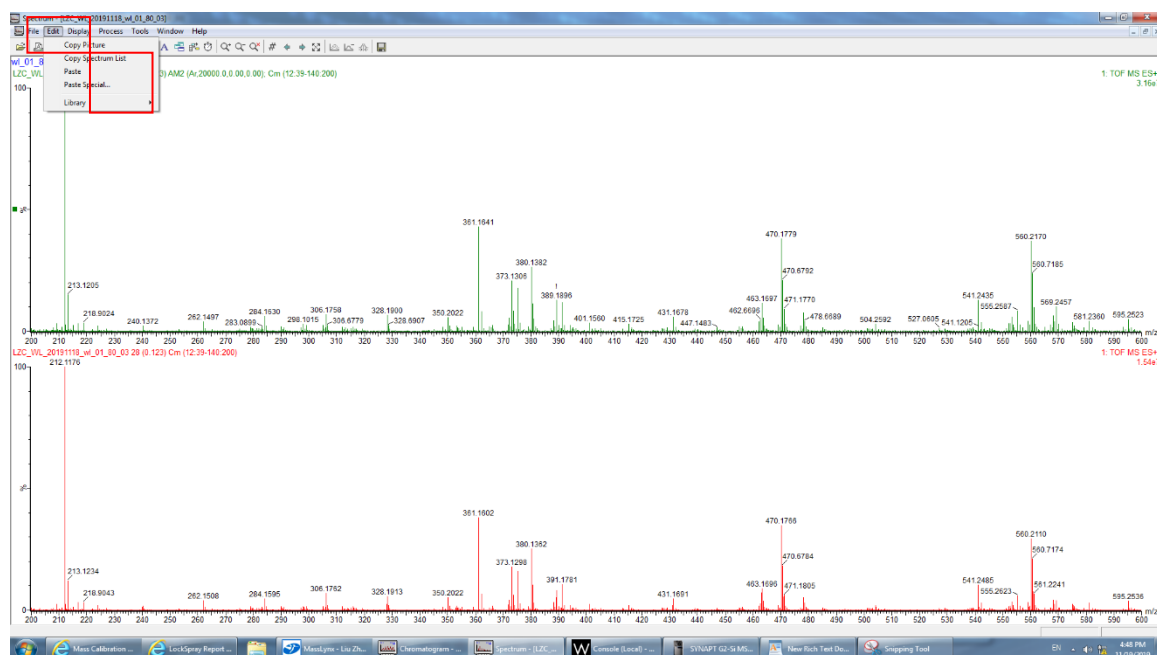


图 6-46

实验室数据禁止采用U盘或硬盘进行下载传输。实验公共电脑，可进行数据处理，并将处理好的数据存在学校数据中心指定的数据传输路径下。或者将处理好的数据暂存桌面，由技术员上传到网盘，用户通过链接下载。

6.13 实验结束处理

- 实验结束之后，需要对流路进行清洗，确保没有自己样品的没有残留；另外ESI有正常的喷雾；

- 停流动相，就流速设为0，回车，会显示Off；

Console界面，选中二元溶剂管理器，序列运行结束，所有运行界面的数字将以蓝色带下划线显示，点击数字，设为0，回车即可。

- 柱温箱及样品管理器温度设为Off；

Console界面，选中样品管理器，序列运行结束，所有运行界面的数字将以蓝色带下划线显示，点击数字，设为0，回车即可。

- 质谱调谐界面：关闭标准溶液，右下角点击Standby；

- 退出学校基理系统；

- 取出样品；

- 实验结束，请完成测试登记，整理实验桌并将自己的测试样品带出实验室。

请注意：使用前先检查谱仪状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前谱仪状况良好；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

高分辨飞行时间质谱 Waters SYNAPT-G2-Si 标准操作规程使用记录表。

9. 附件

附录一：新建项目文件；

附录二：质量轴校正 Calibration

附录三：Lockspray setup

附录四：仪器简单操作流程

分子科学公共实验平台

附录一 新建项目文件

Step1. 点击 File - Project wizard(图 1-1(a), 蓝绿色方框), 弹出对话框(图 1-1(b)), 点击 Yes 进入项目新建向导(图 1-1 (a))。

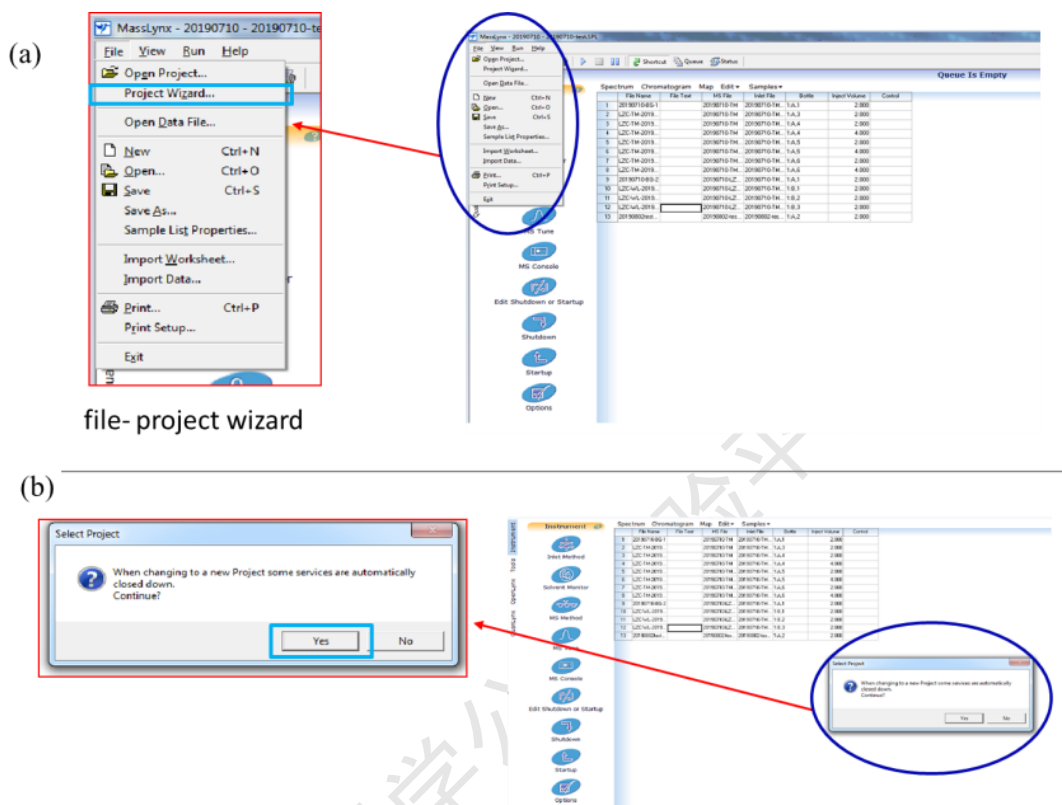


图 1-1 File - Project wizard 选项(a)及弹出对话框(b)

Step2. 项目新建向导。如图1-2, 通过Browse选择正确的项目路径(location), 输入项目名称(Project name), 点击Next, 弹出对话框(图1-2 (b)), 勾选**Create using current project as template**选项, 点击Finish, 弹出显示序列文件无效提醒窗口(图1-3), 点击OK进行确认。至此完成新建项目。

禁止直接新建, 否则仪器所有的调试参数无法正常运行。

➤ **注:** 本实验室所有文件按课题组进行分类和命名。每一个测试的课题组均会有一个项目文件存在于 PI folder 路径下。如果没有课题组项目, 请以 PI 全名进行新建, 如张三, 则输入 Zhang San, 点击 Next。

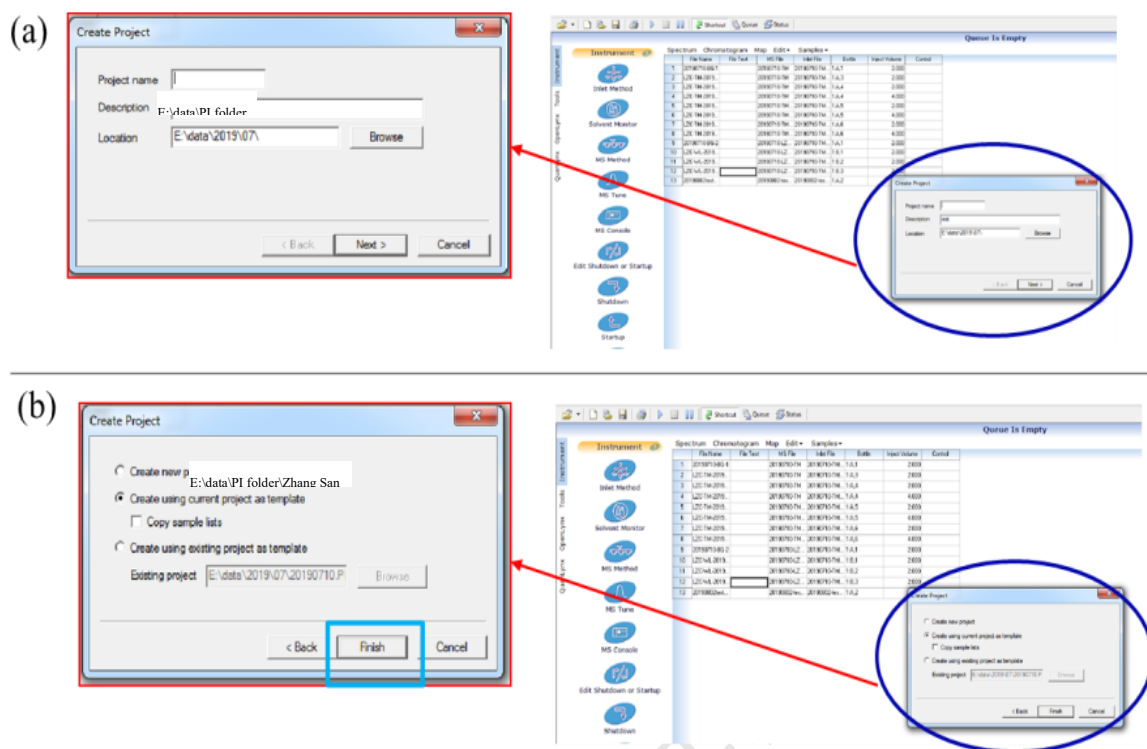


图 1-2 项目新建向导 (a)及弹出对话框(b)

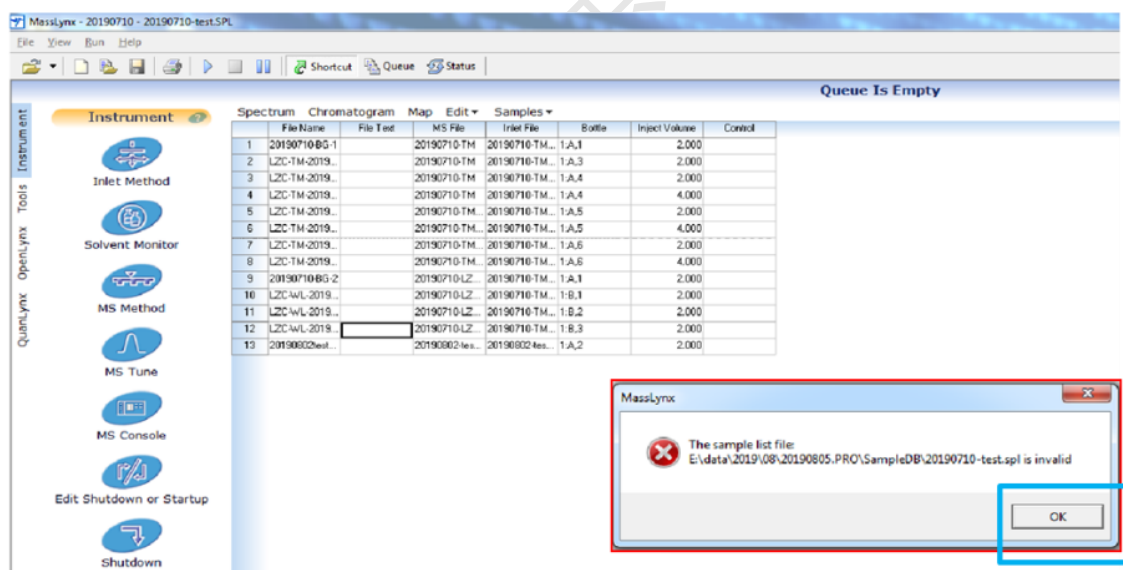


图 1-3 序列名称无效提醒窗口显示

附录二 质量轴校正 Calibration

1. 仪器状态初判

Step1. 在 Masslynx 操作主界面, 选择 MS tune 图标(图 2-1), 进入质谱操作界面(图 2-2)。

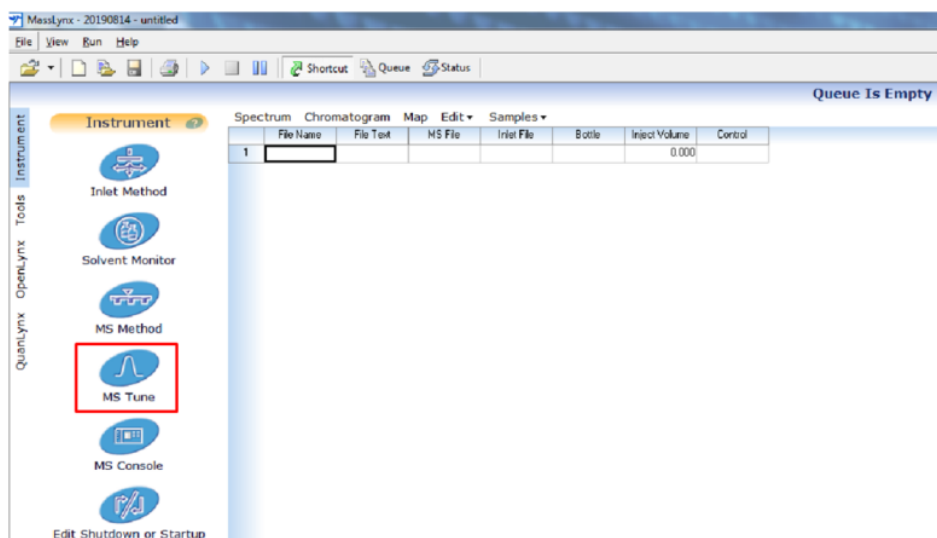


图 2-1 Masslynx 主操作界面 MS tune 选项

Step2. 在 MS 操作界面(图 2-2), 需要进行以下三项操作:

① 选择离子模式和分辨率模式

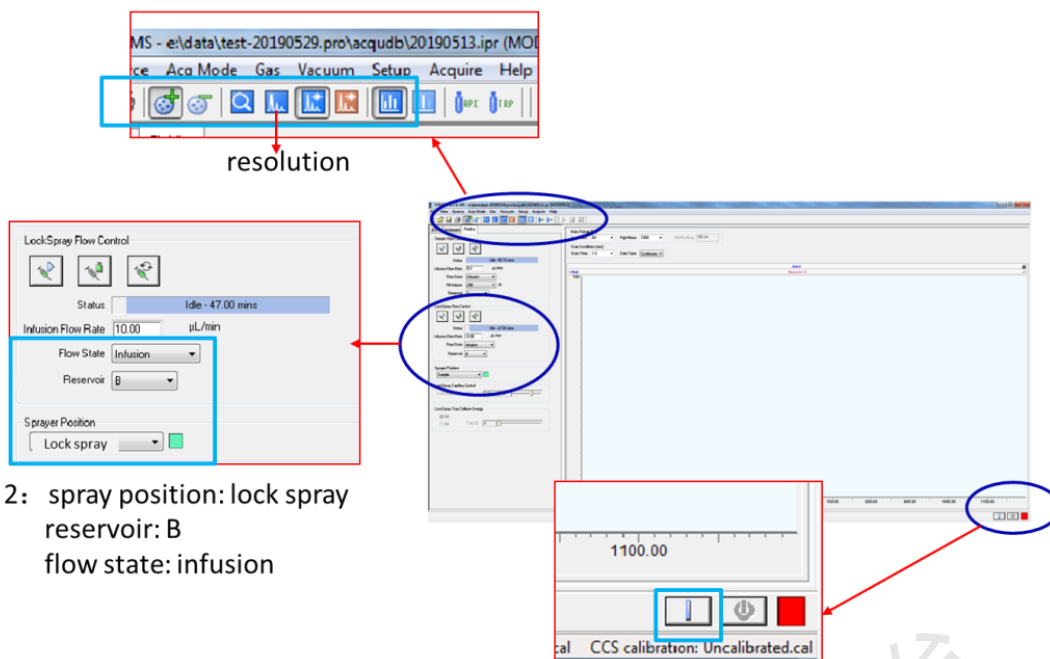
注: 离子模式根据待测样品需求进行选择; 分辨率模式: 选择 **Resolution**

② Fluidics 选项下, 查看 Lockspray control, 选择 Spray position: **Lock spray**;
Reservoir: **B**, Flow state: **Infusion**;

③ 操作窗口右下角, 点击 Operate 开关。(点击后, 红色方框变为绿色为正常)

注: 默认为 **ESI+**, **Resolution** 模式

1: 选择离子模式和分辨率模式



2: spray position: lock spray
reservoir: B
flow state: infusion

3: 点击operate 按钮
(点击后显示红色变为绿色)

图 2-2 MS tune 操作窗口

Step3. 进行Step2操作后, 显示质谱图, 在 $m/z=556.2771$ 附近出峰为正常。至此完成仪器状态初判。

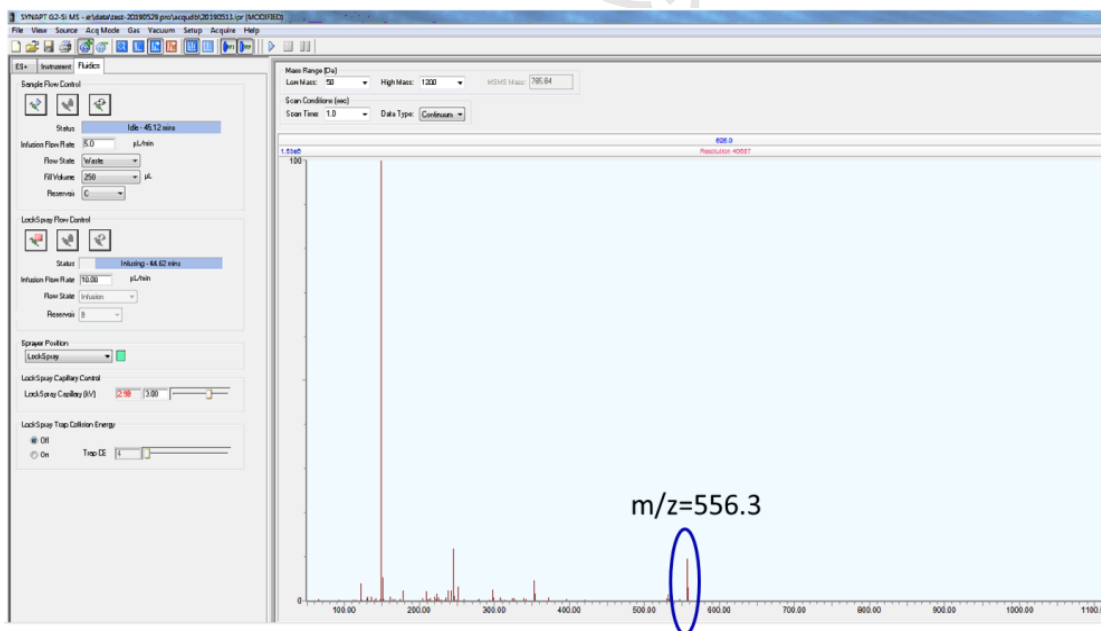


图 2-3 step2 操作后 MS 操作窗口显示

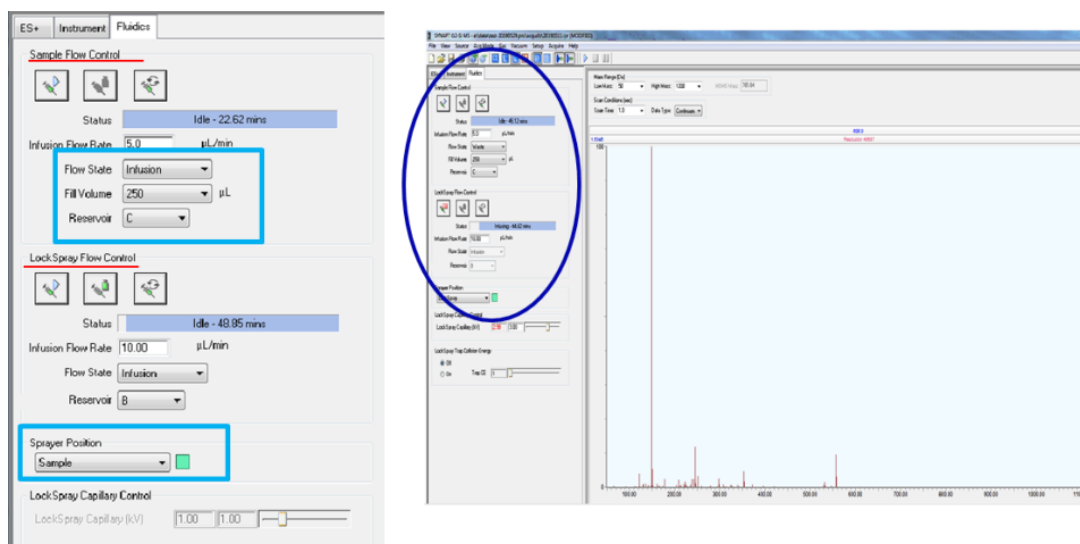
2. Create Calibration

Step1. 在质谱操作窗口, 点击右下角 Operate 按钮, 进行两项设置(图 2-4)

Fluidics 项目栏: Sample flow control, 选择 Flow state: **Infusion**; Reservoir: **C**; Spray position: **Sample**, 点击 **Start infusion**。完成之后, 显示 Sample spray 下质谱显示窗口如

内部文件, 请勿随意转发、打印、复印

图 2-5 所示。



Sample flow control: spray position: reservoir: C
 flow state: infusion
 Lock Spray Flow Control: sample

图 2-4 Create calibration MS 操作窗口

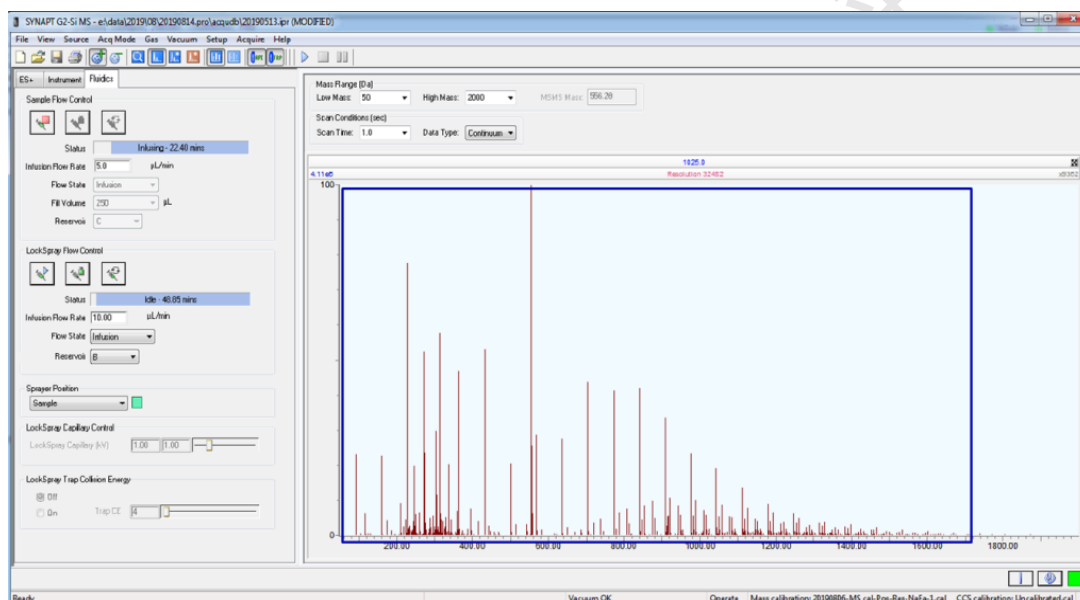


图 2-5 Sample spray 质谱窗口显示

Step2. 返回 Masslynx 操作主界面, 选择 MS Console 图标(图 2-6), 进入 MS Console 操作界面(图 2-7)。

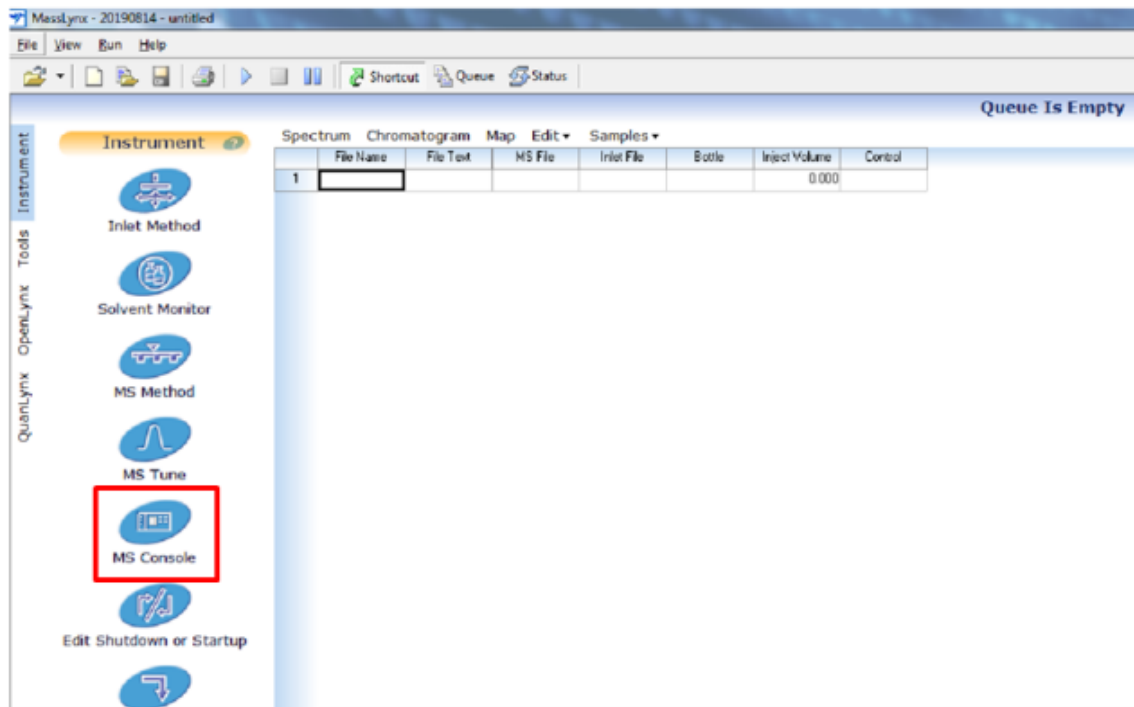
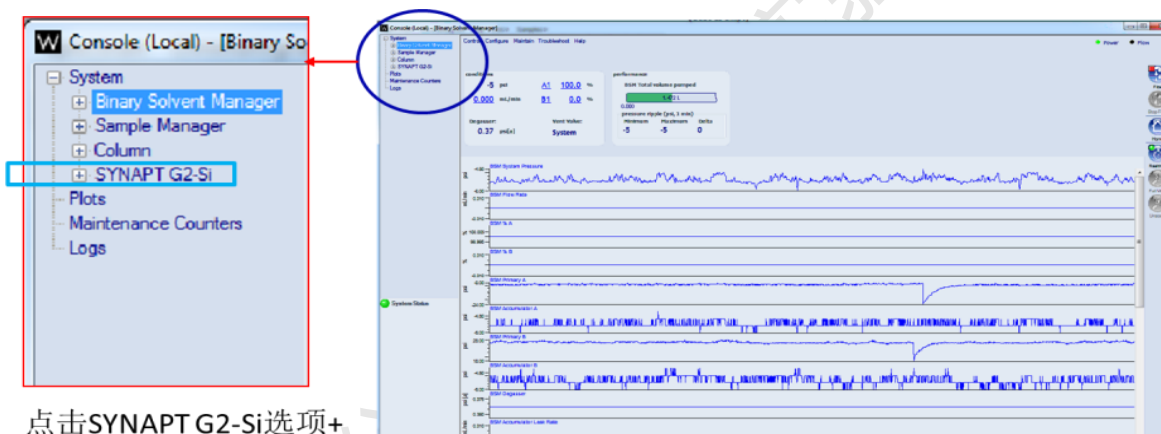


图 2-6 Masslynx 主操作界面 MS tune 选项

Step3. 建立 Create calibration 质量轴调谐文件并运行。如图 2-7, 在 MS Console 界面, 点击 SYNAPT G2-Si 选项前加号+, 显示 2-8(a)界面。



点击SYNAPT G2-Si选项+

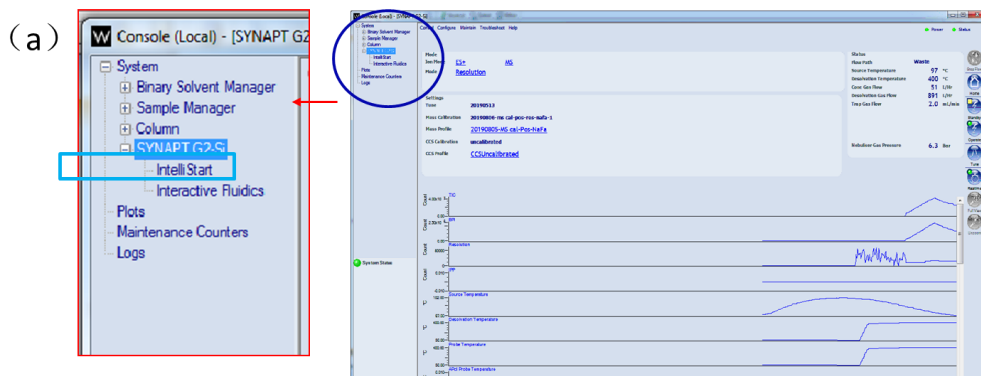
图 2-7 MS console 操作界面

请按图 2-8(a)-2-8(g)显示进行如下操作:

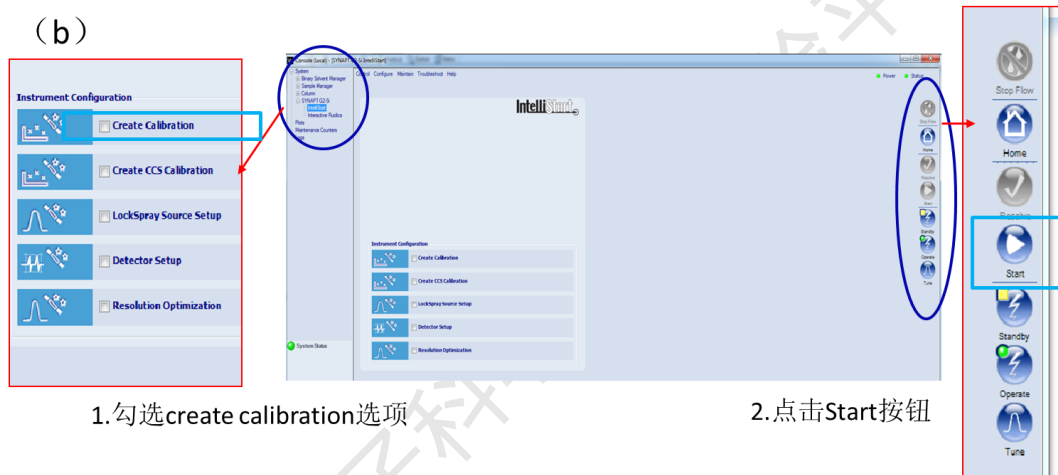
- ① 图 2-8(a): 点击 SYNAPT G2-Si 选项下 Intelli Start, 显示图 2-8(b);
- ② 图 2-8(b): 勾选 Create Calibration 选项并点击 Start 按钮, 显示图 2-8(c);
- ③ 图 2-8(c): 点击 Next, 显示图 2-8(d);
- ④ 图 2-8(d): 点击 Calibration Profile Editor 显示图 2-8(e);
- ⑤ 图 2-8(e): 选择 File - New, 新建文件, 显示图 2-8(f);
- ⑥ 图 2-8(f): 首先输入文件名, 然后选择 Type of calibration 子菜单下的 Assisted - Acquire data automatically, and identify the peaks manually 选项, 如输入 20190814_Pos_Res_NaFa, 选择 Assisted 选项后, 显示如 2-8(g);

注：文件名命名原则：日期-离子模式-分辨率模式-调谐溶液。离子模式与分辨率模式均须与 2.1 中的选择一致，以正离子，分辨率模式，调谐溶液为甲酸钠溶液为例，命名文件名为：20190814_Pos_Re_NaFa.下划线连接。

⑦ 图 2-8(g): 根据自己样品测试需求，选择 Positive polarity 或者 Negative polarity 下的 Edit 选项，本文中以正离子为例。进入图 2-9 操作步骤。



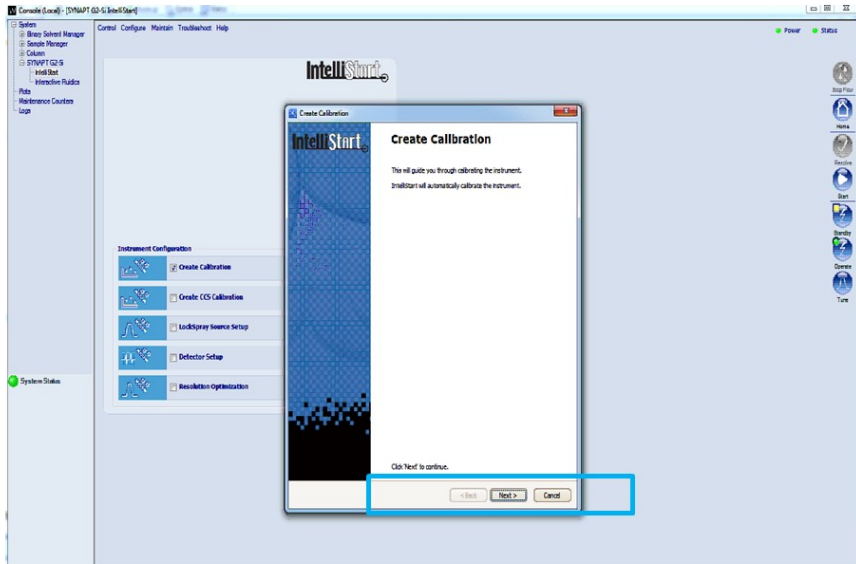
点击SYNAPT G2-Si选项下intelli start



1. 勾选create calibration选项

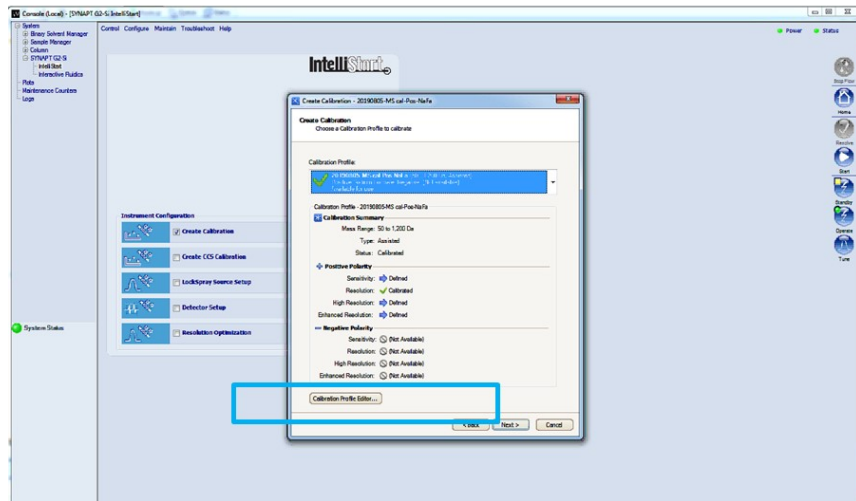
2. 点击Start按钮

(c)



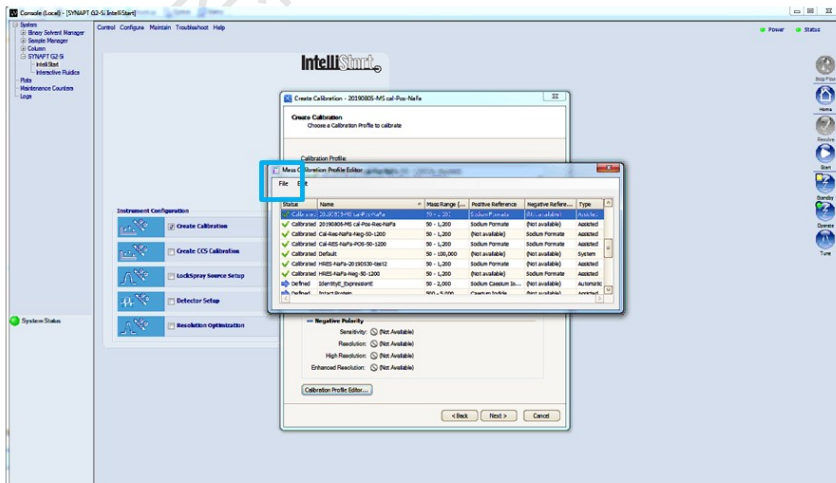
点击next,进入下一步

(d)

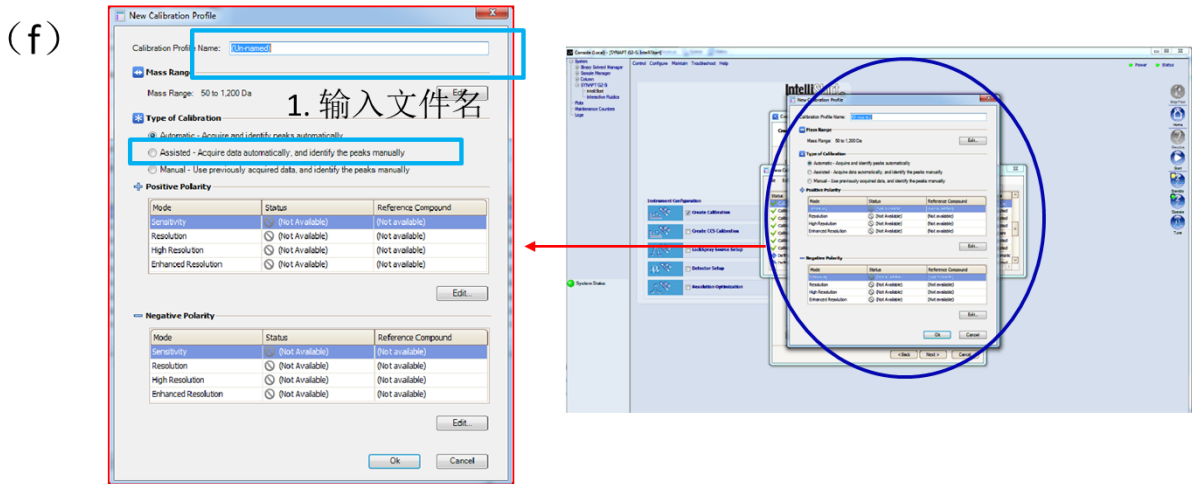


点击calibration profile editor

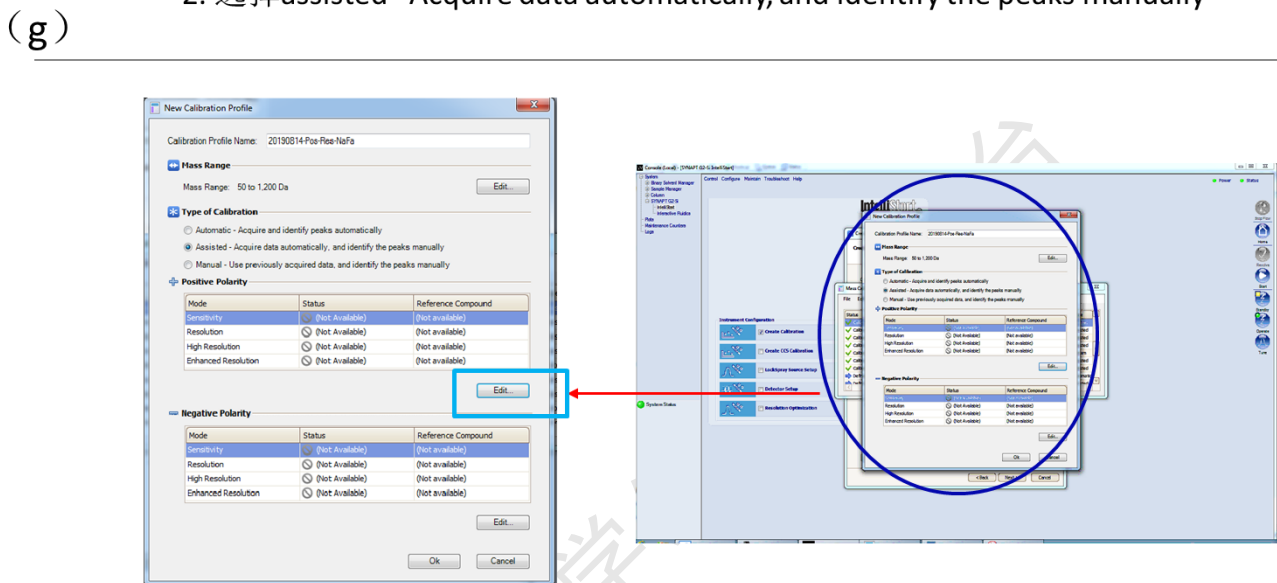
(e)



File-new 新建质量校正文件文件



2. 选择assisted–Acquire data automatically, and identify the peaks manually



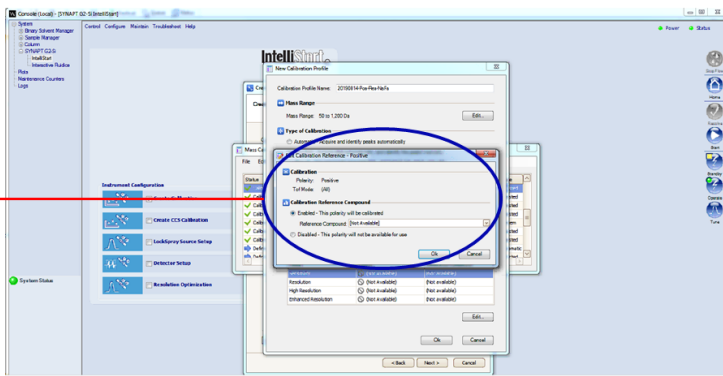
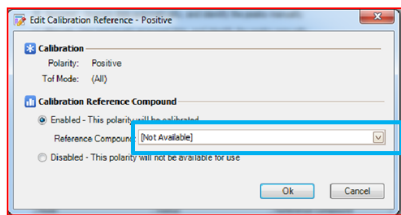
根据自己样品测试需求, 选择positive polarity 或者negative polarity下的edit选项

图 2-8 质量轴调谐文件操作

完成图 2-8(g)操作后, 请按图 2-9(a)-2-9(e)显示进行如下操作:

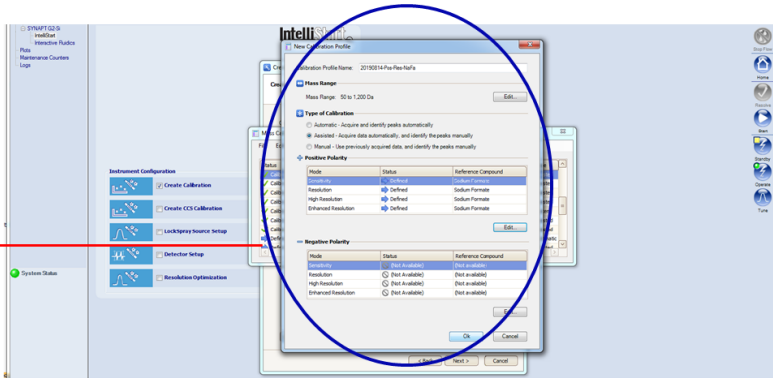
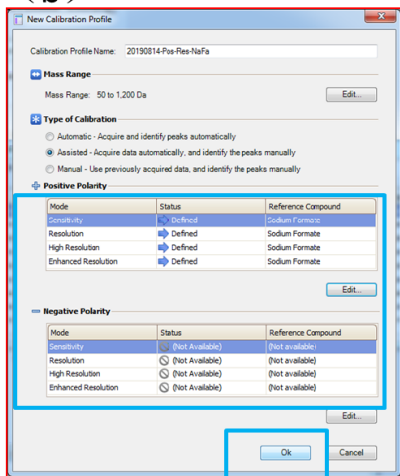
- ① 图 2-9(a): 下拉选择 Sodium formate (Positive)后, 点击 OK, 显示图 2-9(b);
- ② 图 2-9(b): 核实: Positive polarity: 显示蓝色箭头; Negative polarity: 灰阶显示。点击 OK, 显示图 2-9(c);
- ③ 图 2-9(c): 核实文件名等信息, 点击 Next, 显示图 2-9(d);
- ④ 图 2-9(d): 1.Calibration to perform: 至勾选 Resolution 模式, 去掉其他分辨率模式;
- 2.勾选 Display report 和 Make the calibration profile active 选项
- 3.点击 Next, 进入下一步点击 Calibration profile editor 显示图 2-9(e);
- ⑤ 图 2-9(e): 点击 Next, 进入下一步。进入图 2-10 操作步骤。

(a)



下拉选择 Sodium formate (postive)
后, 点击OK

(b)



核实:
Positive polarity:显示蓝色箭头;
negative polarity: 灰阶显示
点击OK

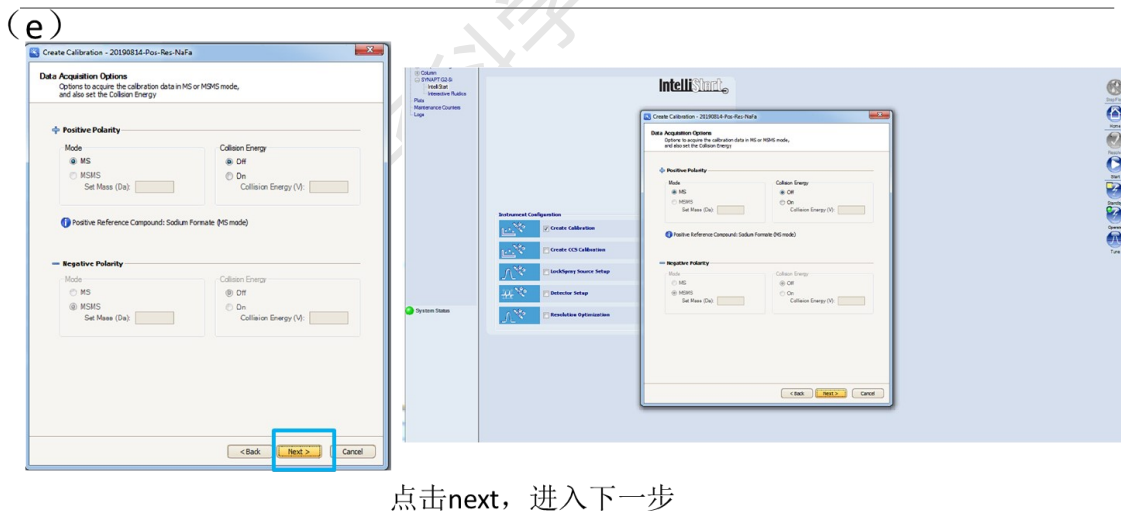
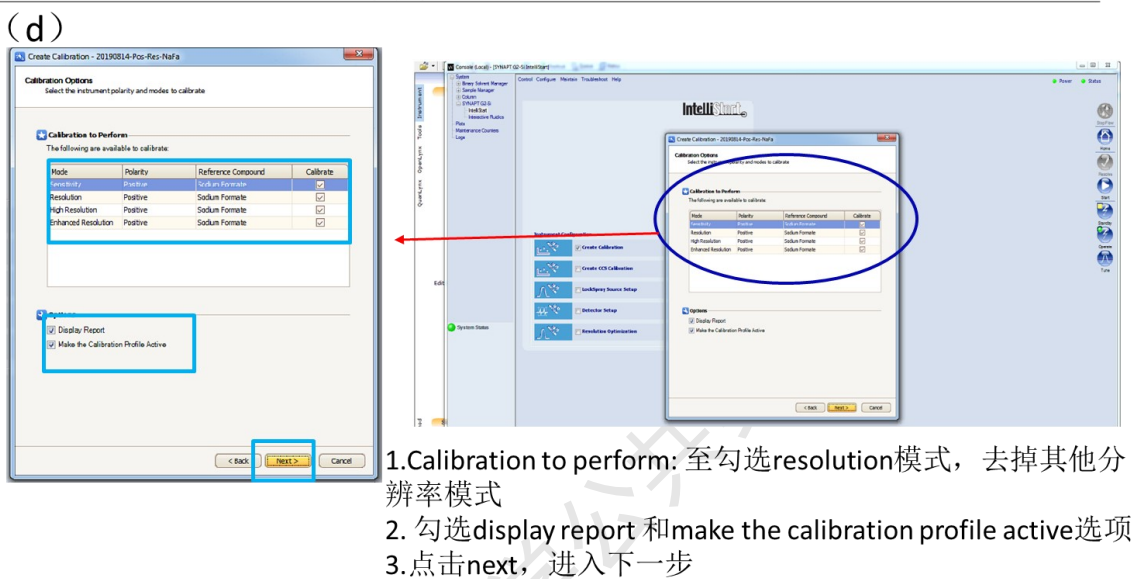
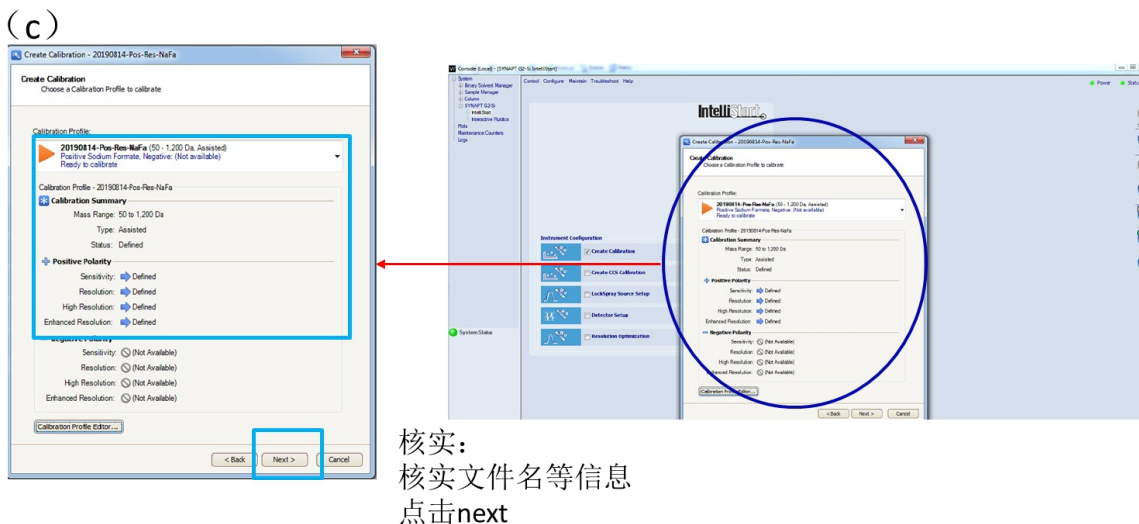


图 2-9 质量轴调谐文件操作

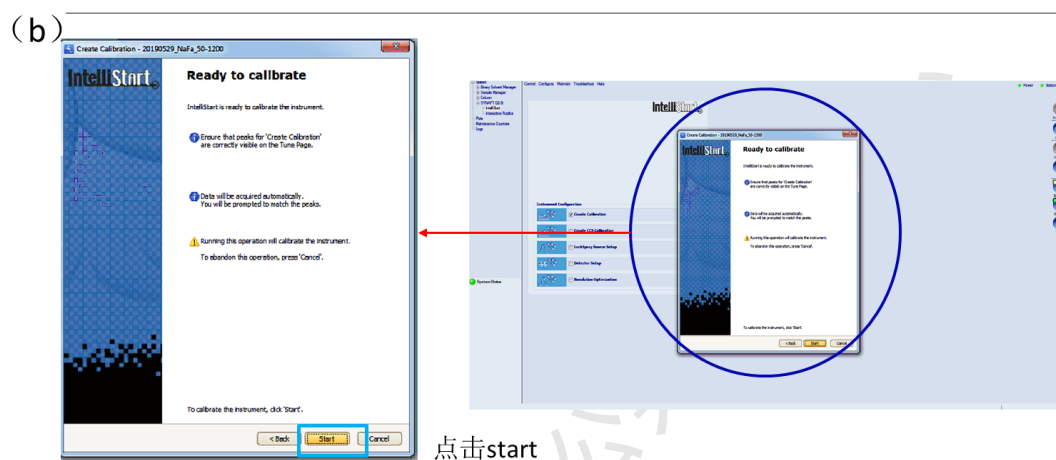
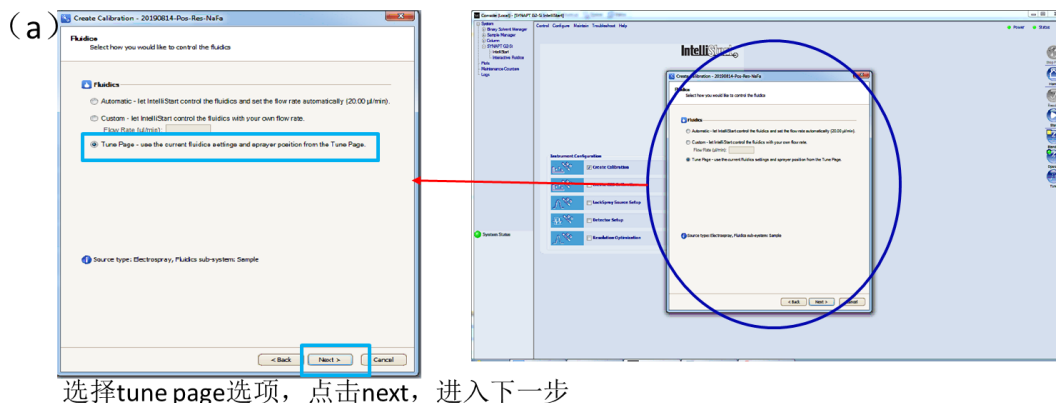
图 2-9(e)操作完成后, 请按图 2-10(a)-2-10(e)显示进行如下操作:

- ① 图 2-10(a):选择 Tune page 选项, 点击 Next, 显示图 2-10(b);
- ② 图 2-10(b): 点击 Start 显示图 2-10(c);
- ③ 图 2-10(c): 核实显示绿色进度条, 弹出显示图 2-10(d)调谐报告;

④ 图 2-10(d): 1. 核对数值均 $< 1 \text{ ppm}$; 2. 点击左上角对号进行确认显示图 2-10(e);

⑤ 图 2-10(e): Create calibration 选项前出现绿色对勾。

至此完成Create calibration操作。



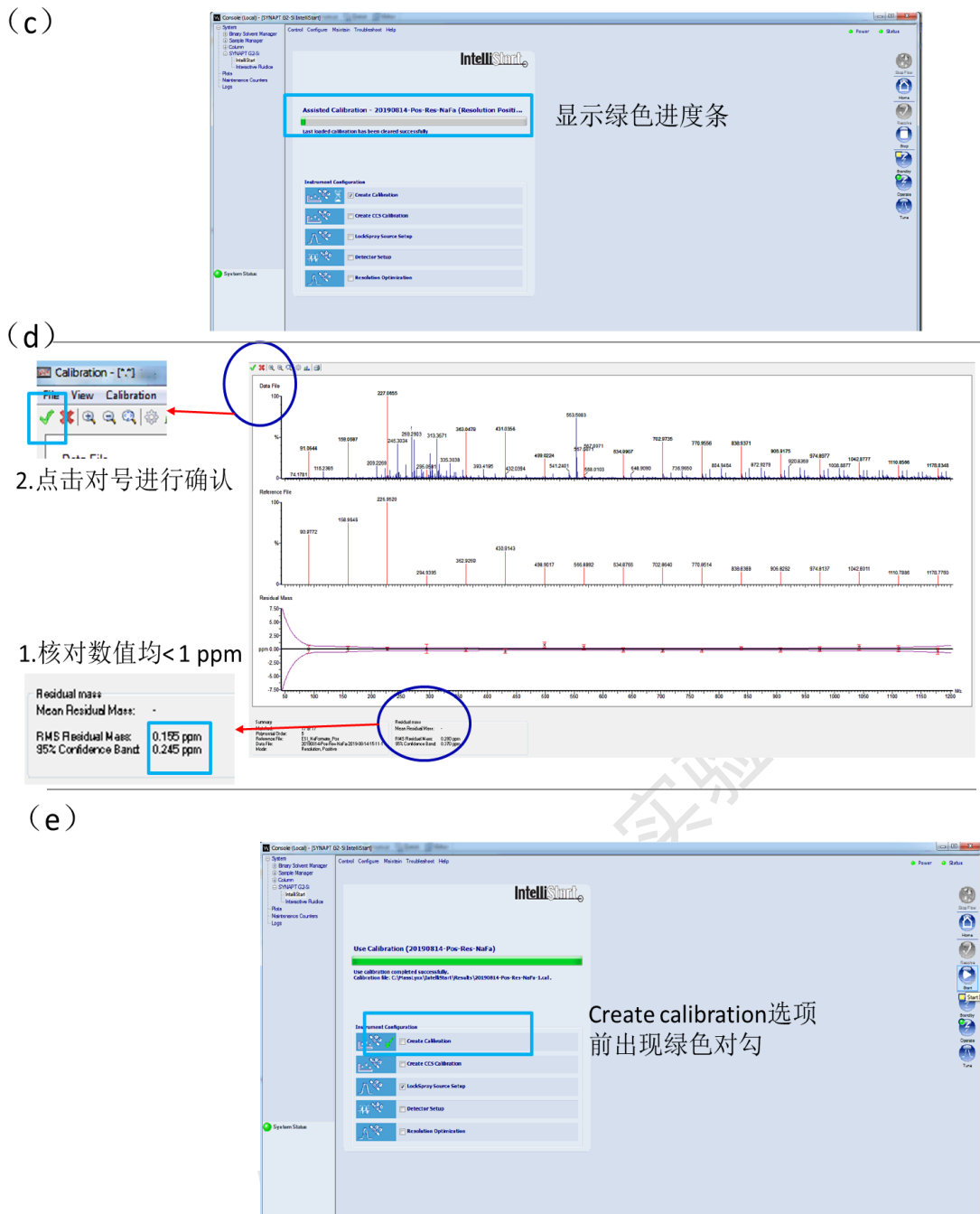


图 2-10 质量轴调谐文件操作

附录三 Lockspray setup

完成 Create calibration 校正后, 返回到在 MS 操作界面(图 3-1)在 **Sample flow control** 操作栏, 先点击 **Stop infusion**, 随后按以下步骤进行 Lockspray source setup 校正。

Step1. 在 MS 操作界面, Fluidics 选项下, 查看 Lockspray control, 选择 Spray position: **Lock spray**; Reservoir: **B**, Flow state: **Infusion**, 点击 Lockspray 下的 **Start infusion**。

注: 质谱图在 $m/z=556.2771$ 附近出现质谱峰。

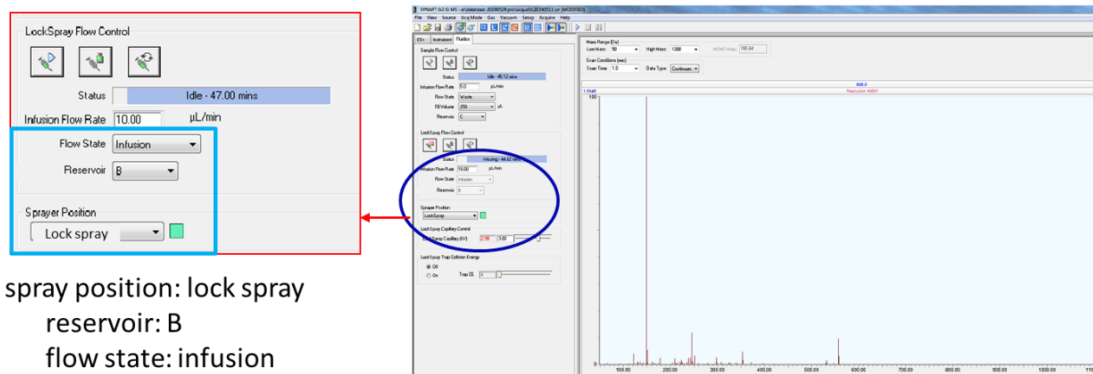


图 3-1 MS 操作界面

Step2. 建立 Lockspray 质量轴调谐文件并运行。回到在 MS Console 界面(如图 3-2)

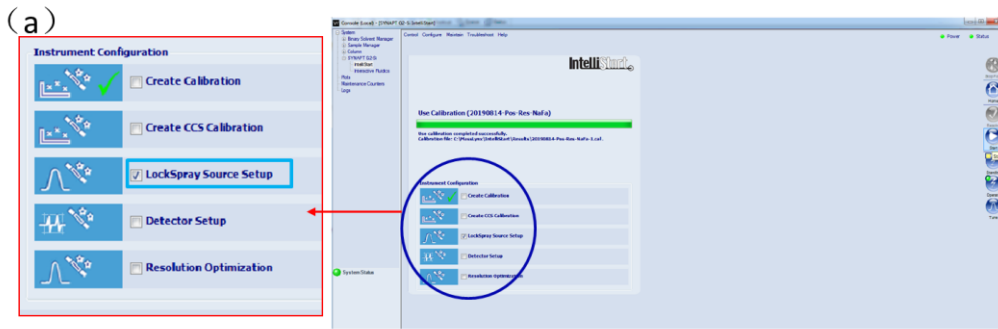
请按图 3-2(a)-3-2(f)显示进行如下操作:

- ① 图 3-2(a): 勾选 LockSpray source setup 选项并点击 Start 按钮, 显示图 3-2(b);
- ② 图 3-2(b): 点击 Next, 进入下一步, 显示 3-2(c)
- ③ 图 3-2(c): 点击 Lockspray profile editor, 显示图 3-2(d);
- ④ 图 3-2(d): 选择 File - New, 新建文件, 显示图 2.8(e);
- ⑤ 图 3-2(e): (1)输入文件名, (2)选择 Reference compound 子菜单下的 Leucine enkephalin 选项, (3)根据自己样品测试需求, 选择 Positive polarity 或者 Negative polarity 下的勾选正/负离子模式下的 LE 精确分子量(正离子: 556.2771, 负离子: 554.2615) (4)点击 OK 进入下一步, 显示 3-2 (f);

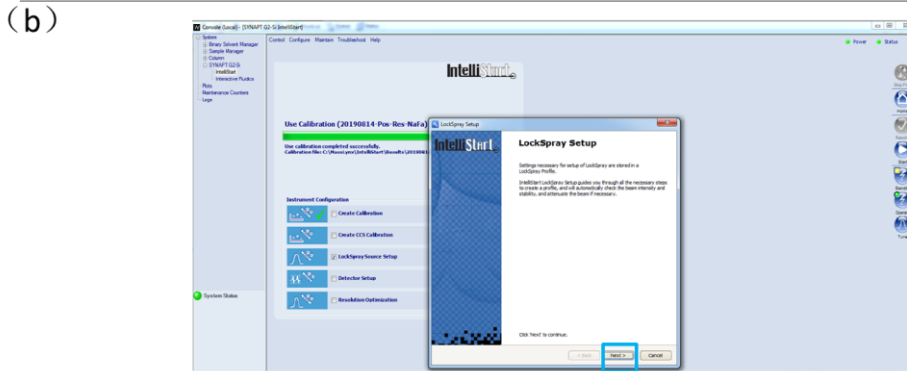
注: 文件名命名原则: 日期-离子模式-分辨率模式-调谐溶液

离子模式与分辨率模式均须与 calibration 中的选择一致, 以正离子, 分辨率模式, 调谐溶液为亮氨酸脑啡肽为例, 命名文件名为: 20190814-Pos-Res-LE

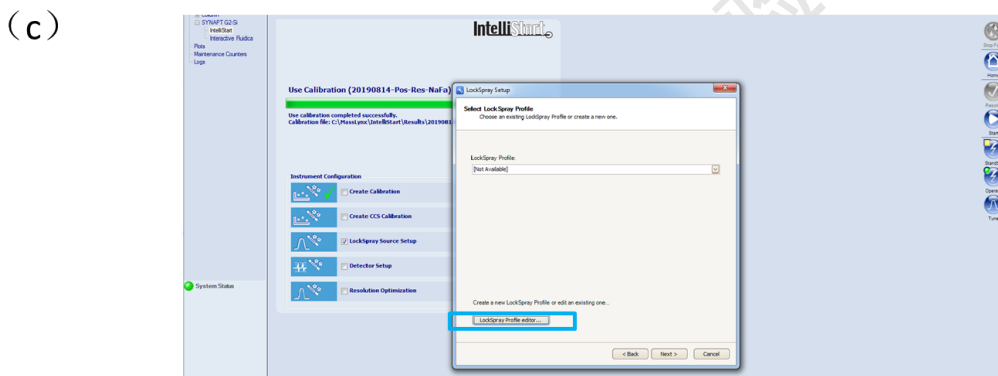
- ⑥ 图 3-2(f): 点击 Next, 进入下一步, 显示图 3-3。



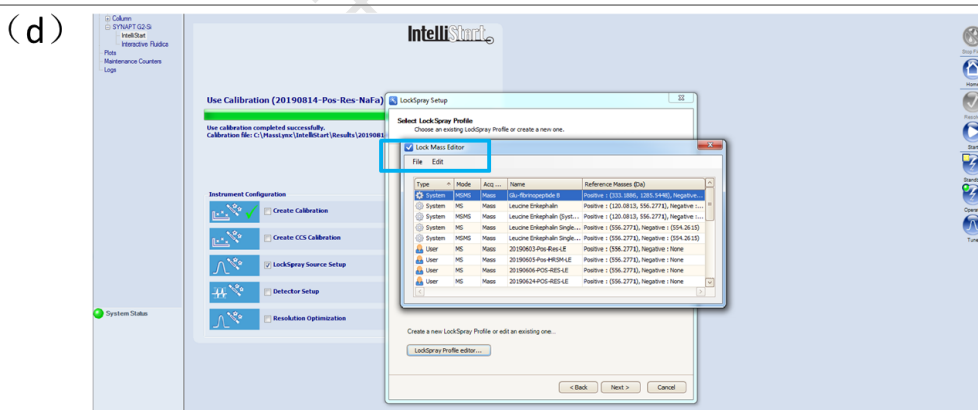
勾选Lockspray source setup选项



点击next,进入下一步



点击Lockspray profile editor



File-new 新建lockspray校正文件

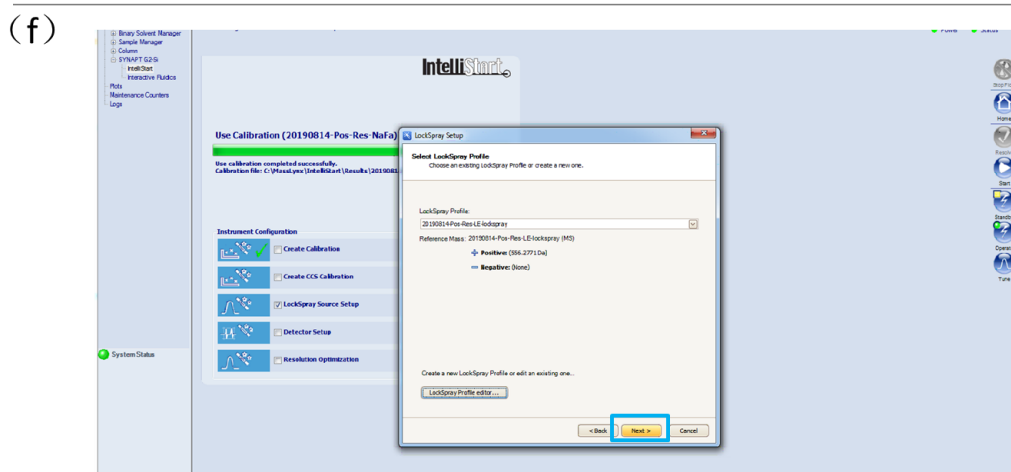
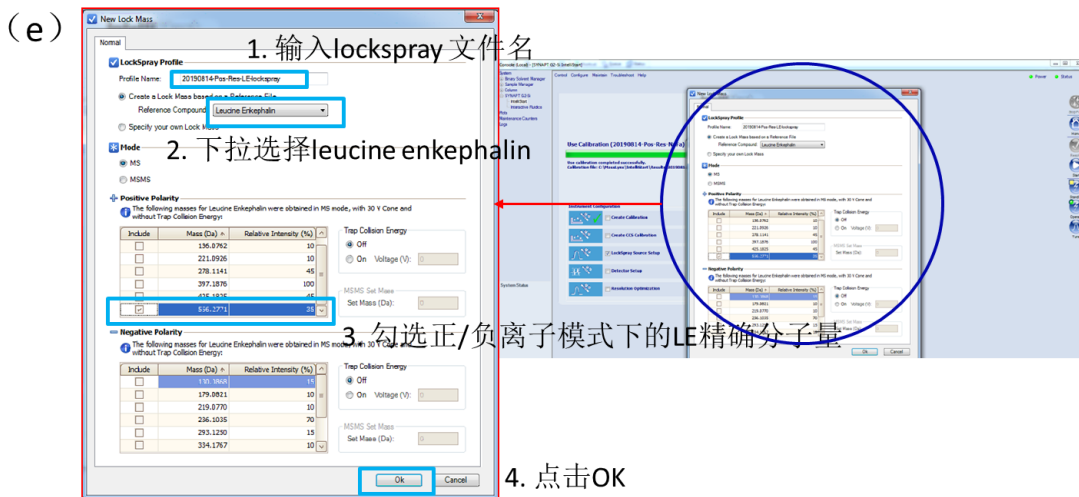
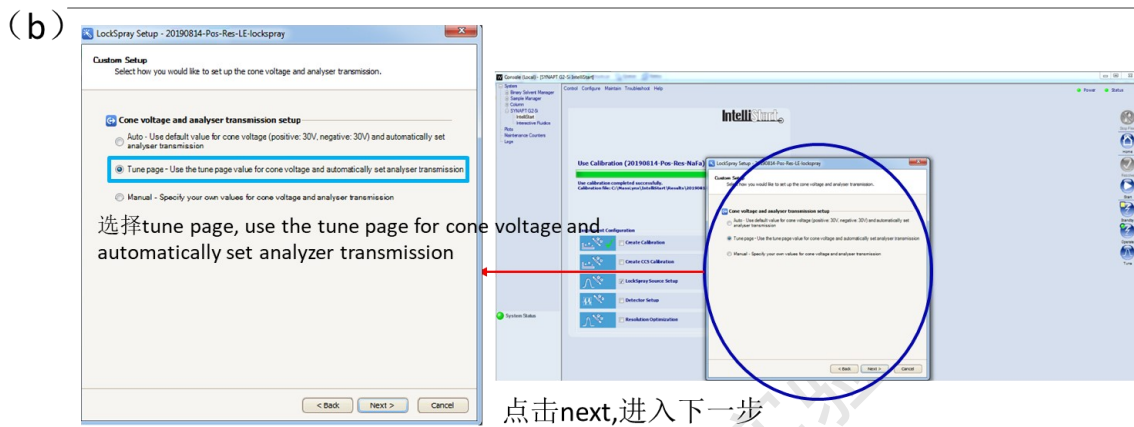
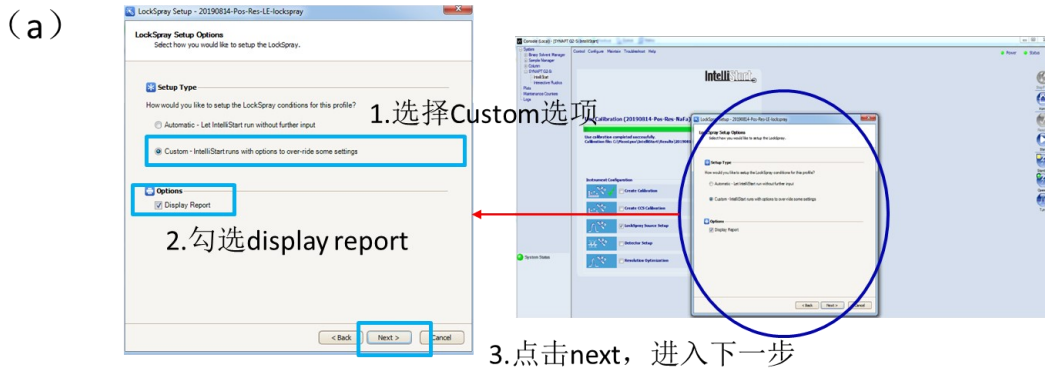


图 3-2 Lockspray 调谐文件操作

完成图 3-2(f)操作后, 请按图 3-3(a)-3-3(e)显示进行如下操作:

- ① 图 3-3(a):选择 Custom 选项, 勾选 Display report, 点击 Next, 显示图 3-3(b);
- ② 图 3-3(b): 选择 Tune page, use the tune page for cone voltage and automatically set analyzer transmission, 点击 Next, 显示图 3-3(c);
- ③ 图 3-3(c): 选择 Tune page, use current fluidics settings from the Tune Page, 点击 Next, 显示图 3-3(d);
- ④ 图 3-3(d): Lockspray 校正进度条显示绿色;
- ⑤ 图 3-3(e): Lockspray 校正报告弹出, 出现对勾。

至此完成 Lockspray 操作。



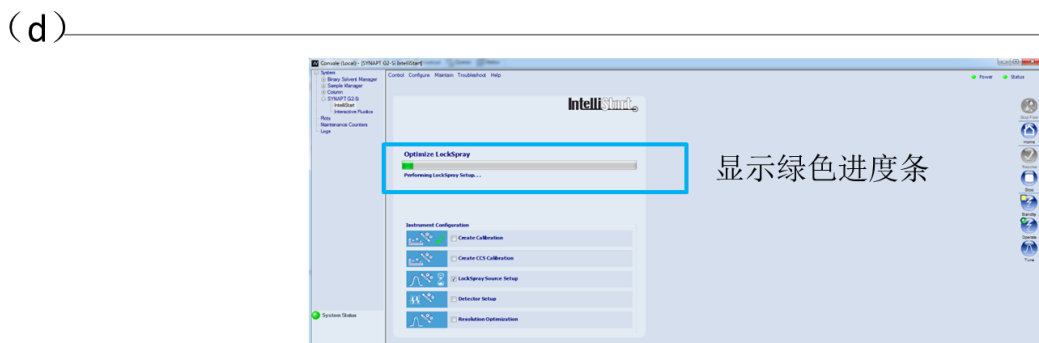
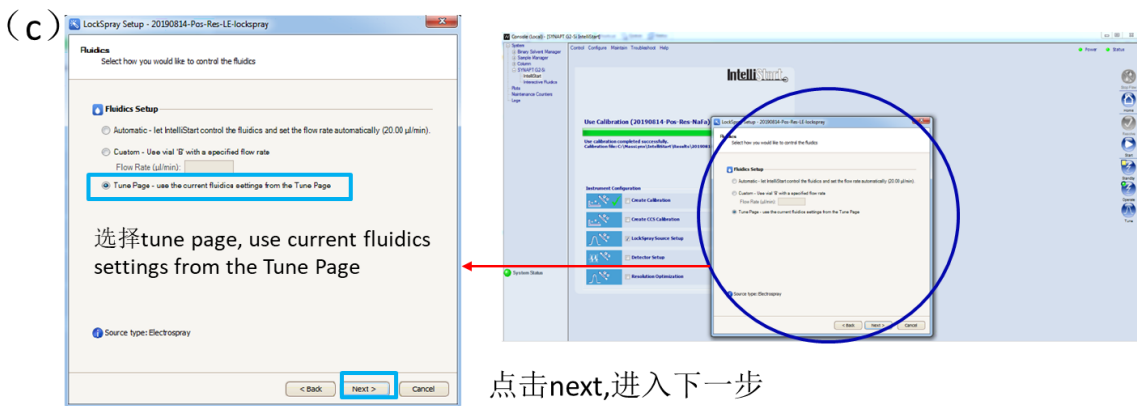


图 3-3 Lockspray 调谐文件操作

附件四 简版操作流程

(仅供操作熟练的用户使用)

- 1) 申请上机培训-培训-两周内上机考核-取得上机资格;
- 2) check 流动相的更换情况及体积: A: 水相(超纯水,+0.1%甲酸); B: 有机相(LC-MS);
- 3) 打开文件: Masslynx 主界面, file-open project 打开项目文件; file-open 打开 sample list;
- 4) 液相准备: 灌注操作:
 - binary solvent manger-control-prime seal wash;
 - binary solvent manger-control-prime A/B solvent;
 - 清洗注射器: sample manger-control-prime string;
- 5) 质谱准备 (技术人员完成): create calibration: SYNAPT-G2-SI 界面, (1) 点击 operate;(2)sample flow control;(3)MS console 界面建立校正文件。弹出校正报告后, 确认相关参数<1 ppm, 勾选;
- 6) 放样: 样品盘缺口位于左上角为正, 记住样品瓶位置(样品盘贴合, 水平放置);
- 7) 建立序列: file name: PI 姓名缩写_个人姓名缩写_日期_样品名_01;
 - MS file: 直接调用, 请右键 edit, 双击颜色栏修改扫描范围, 更新 lockspray 文件;
 - Inlet file: 直接调用; 请右键 edit, 在编辑窗口 load method, 观察系统压力差<30psi;
 - Bottle: 样品瓶位置;
 - Volume: 2 ul 或 1 ul
- 8) 保存序列并运行: Save, 选中序列行, 点击 Start run;
- 9) 查看并处理、上传数据;
- 10) 确认无信号残留, 关闭流动相, 温度, 标品, 质谱仪器 Standby;
- 11) 登出基理系统;
- 12) 取出样品;
- 13) 登记测试信息;
- 14) 整理实验桌, 离开。

使用记录												20__年
日期 (年月日)	使用人	课题组	样品代号	检测方式 (√)		测试内容(√)		样品数	存储路径 项目文件-sample list	仪器使用后状态		备注
				送样	自主	MS	LC-MS			正常	报错及问题描述	
20220506	张三	王五	蛋白质		√	√		2	iscms-chenyinjuan1	√		

**请注意：使用前先检查谱仪状况，一切正常方可操作；一旦开始实验，默认为使用前谱仪状况良好；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。

分子科学公共实验平台