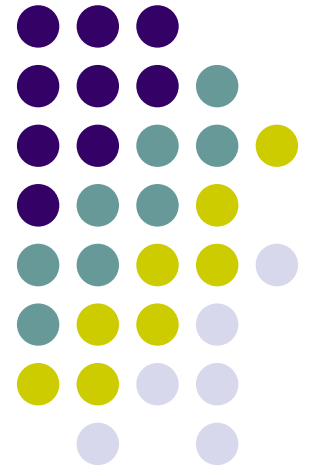


气相色谱-质谱 (GC-MS)联用技术

韩芳

2008年11月18日





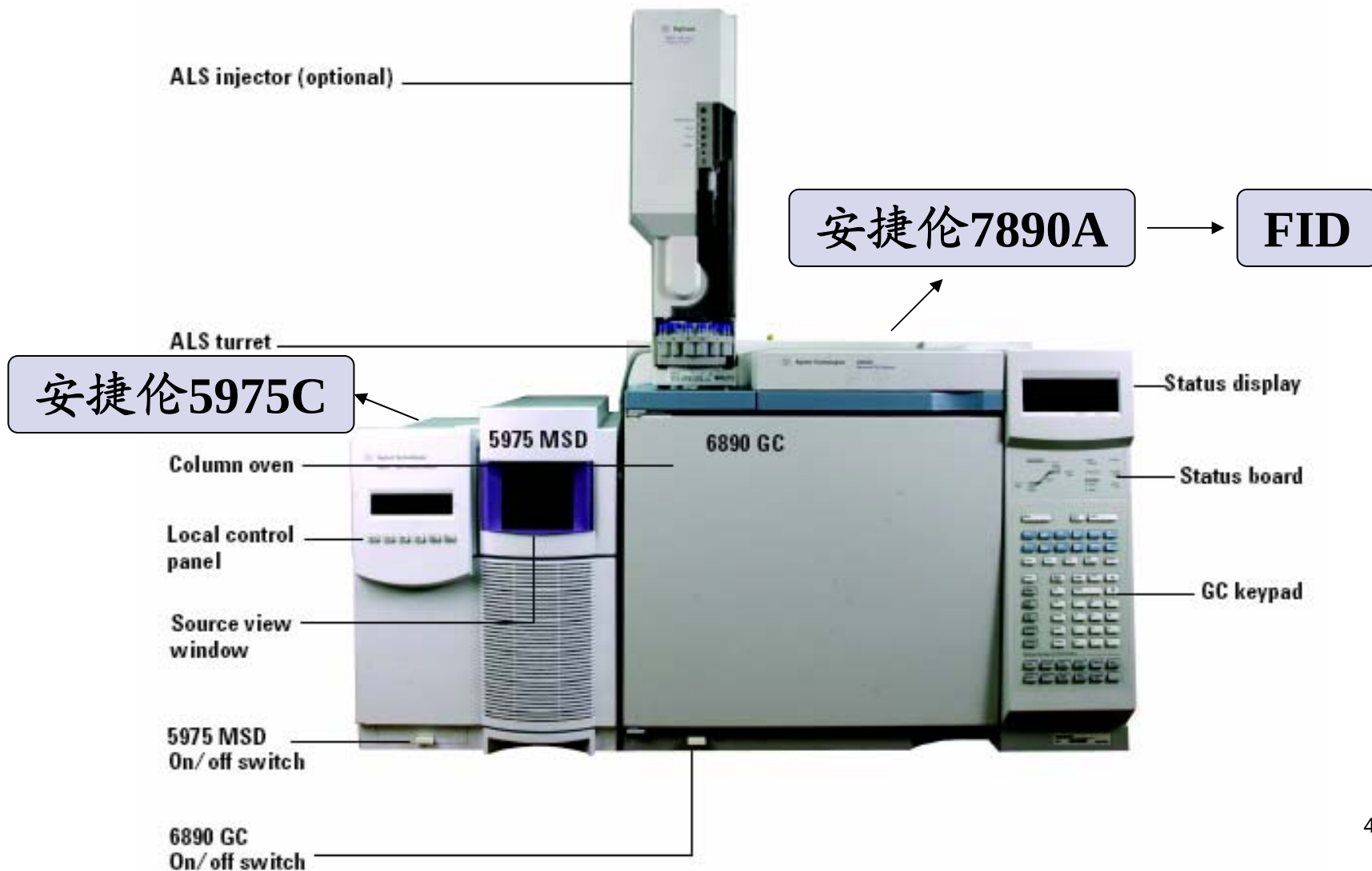
- GC-MS基本原理 { GC
MS
- GC-MS应用
- GC-MS仪器使用与维护



GC-MS联用技术特点

- 气相色谱法定性依据是色谱峰的保留时间，定量依据则是色谱峰高或峰面积。作为定性和定量方法，气相色谱法最大特点在于高效的分离能力和高的灵敏度，是分离混合物的有效手段。
- 质谱法是依据带电粒子在磁场或电场中的运动规律，按其质荷比（质量和电荷的比）实现分离分析，测定离子质量及其强度分布。主要特点是能给出化合物的分子量、元素组成、经验式及分子结构信息，具有定性专属性强、灵敏度高、检测快速的优势。

5975 MSD 和 6890 GC

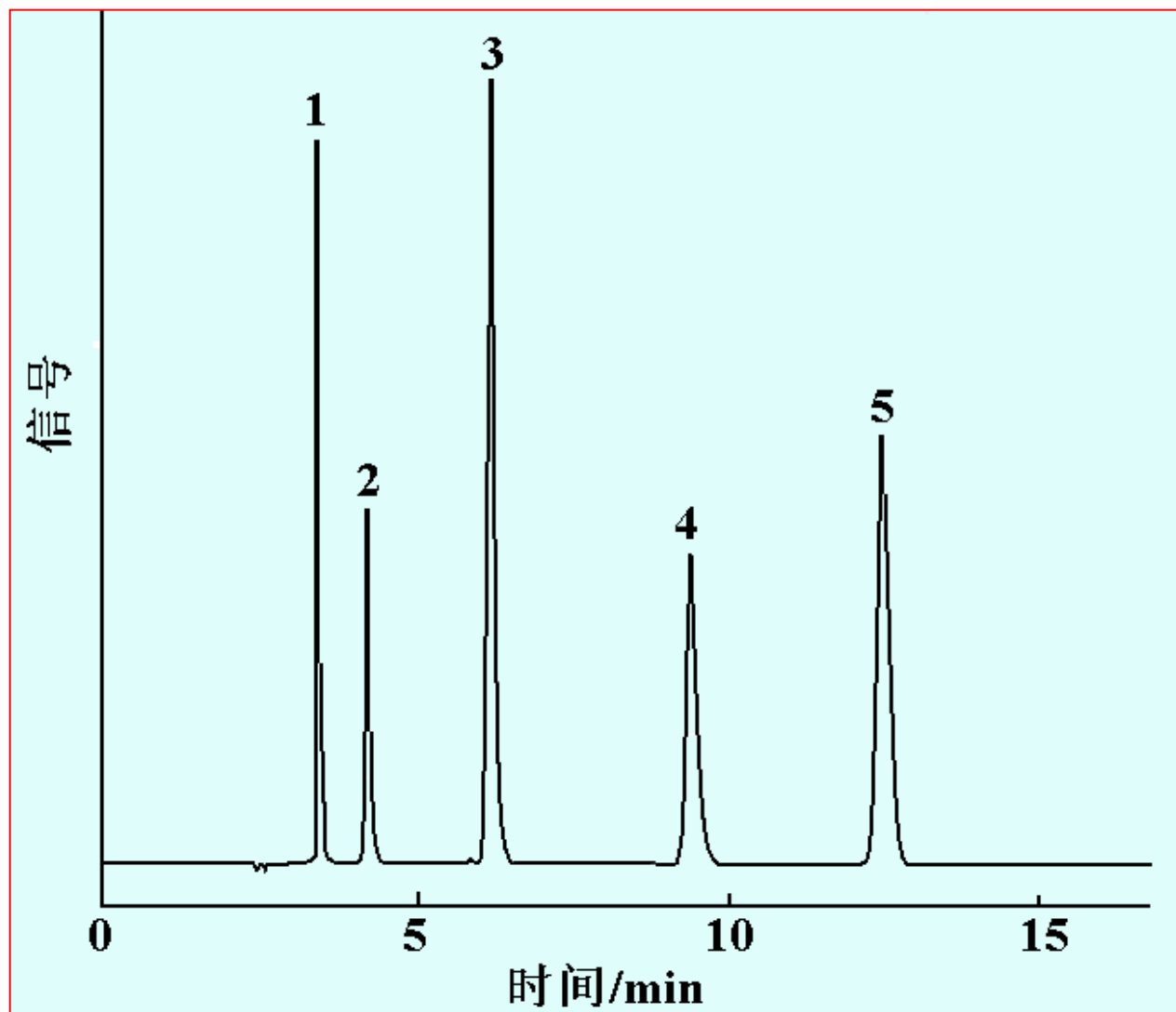


色谱基本原理



色谱法是利用混合物不同组分在**固定相**和**流动相**中分配系数(或吸附系数、渗透性等)的差异,使不同组分在作相对运动的两相中进行**反复分配**,实现分离的分析方法。

色谱流出曲线上的信息





- 1. 根据色谱峰的个数，可判断样品所含的最少组份数。
- 2. 根据色谱峰的保留值，可以进行定性分析。
- 3. 根据色谱峰的面积或峰高，可以进行定量分析。
- 4. 色谱峰的保留值及其区域宽度是评价色谱柱分离效能的依据。

色谱法的分类



根据流动相的
物态可分为

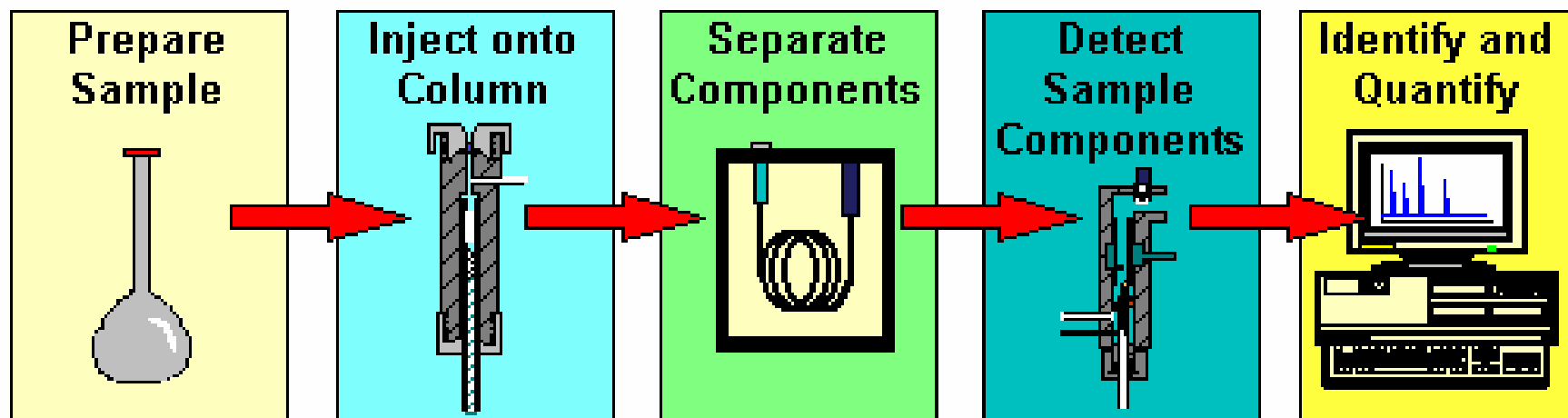
气相色谱 (GC) → 20% 化合物

↓
小分子化合物

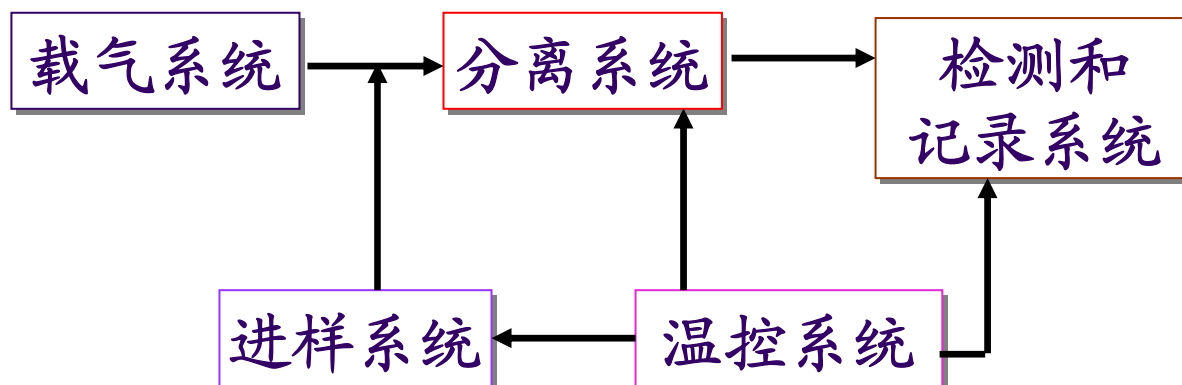
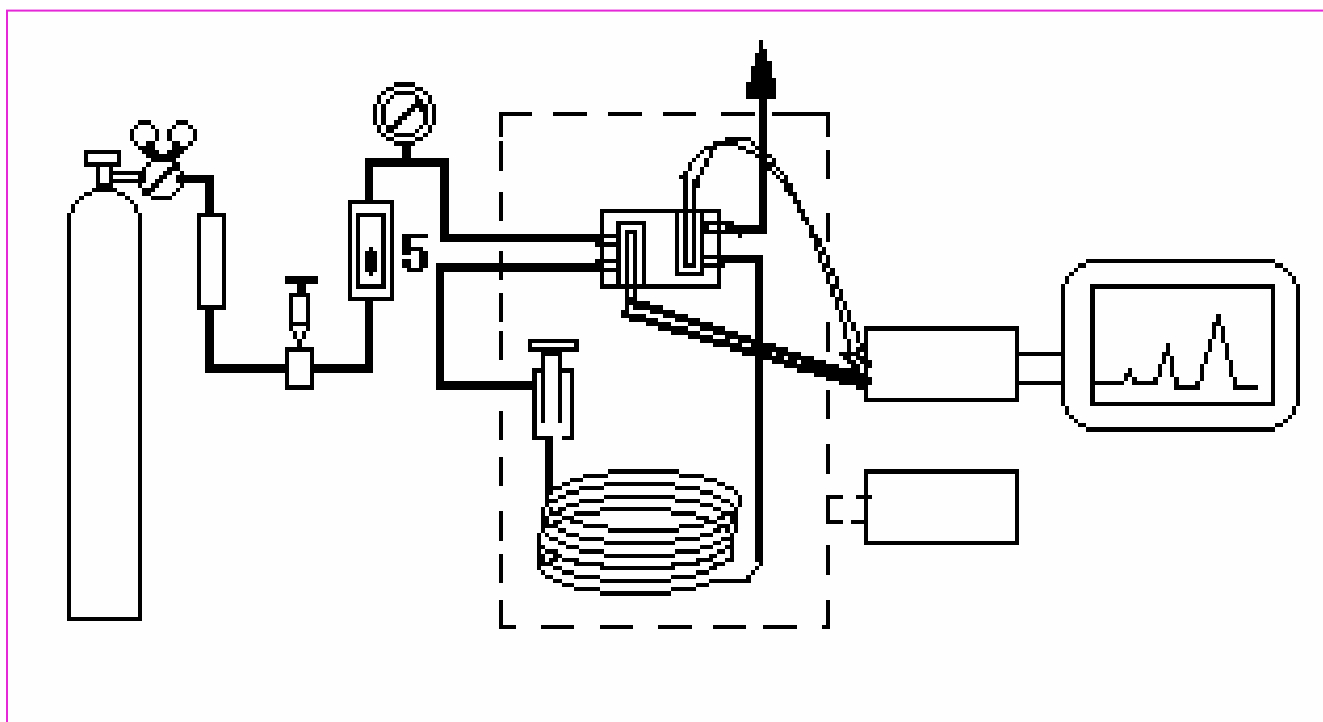
液相色谱 (LC) → 80% 化合物

超临界流体色谱 (SFC)

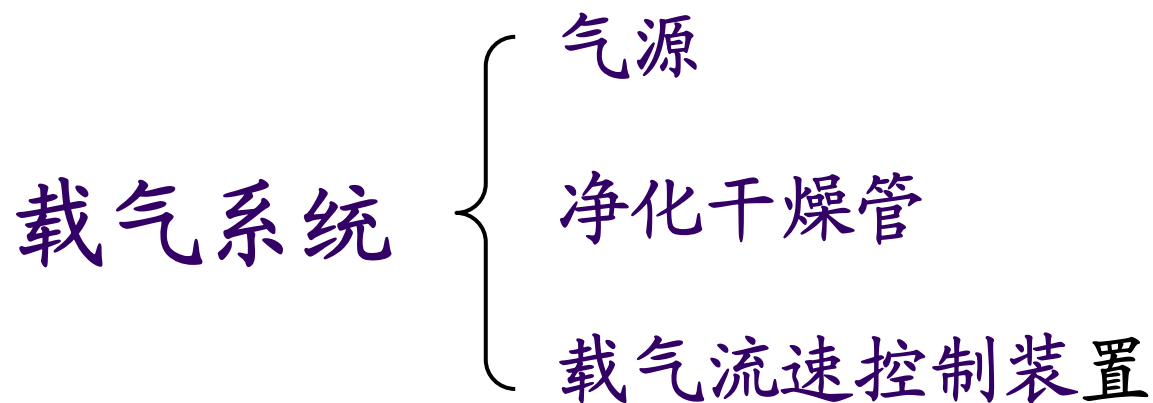
气相色谱实验技术



GC工作过程



载气系统



常用载气：氮气、氦气、氢气等

进样系统

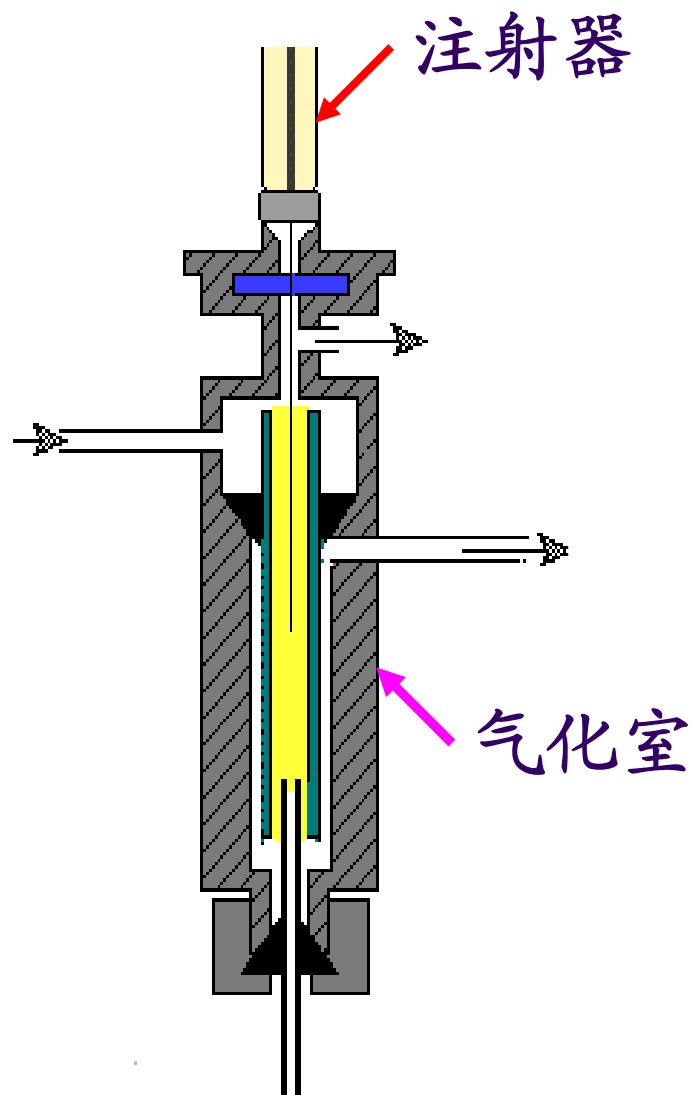


进样系统

进样器

气化室

温度比柱温高
出10 ~ 50 °C





气相色谱的进样方式

- 填充柱进样口
- 毛细柱分流/无分流进样口 ✨
- 冷柱头进样
- 程序升温（PTV）进样口
- 大体积进样
- 阀进样

手动进样应注意的问题



- 注射速度快
- 取样准确，重现
- 避免样品间互相干扰
- 选用合适的注射器，用10ul进样器进样量不要小于1ul。
- 减少注射针尖歧视：每次进样速度尽量一致，玻璃毛放在衬管中间偏下位置，即针尖到达的位置。
- 取样后可用滤纸拭去针尖外面的残留样品，但要注意不要吸去针内样品

分离系统(色谱柱)



色谱柱	填充柱	毛细管柱
柱内径	1-10 mm	0.05-0.5 mm
柱长度	0.5-10 m	10-150 m
总塔板数	$\sim 10^3$	$\sim 10^6$
样品容量	10-1000	0.1-50 μg



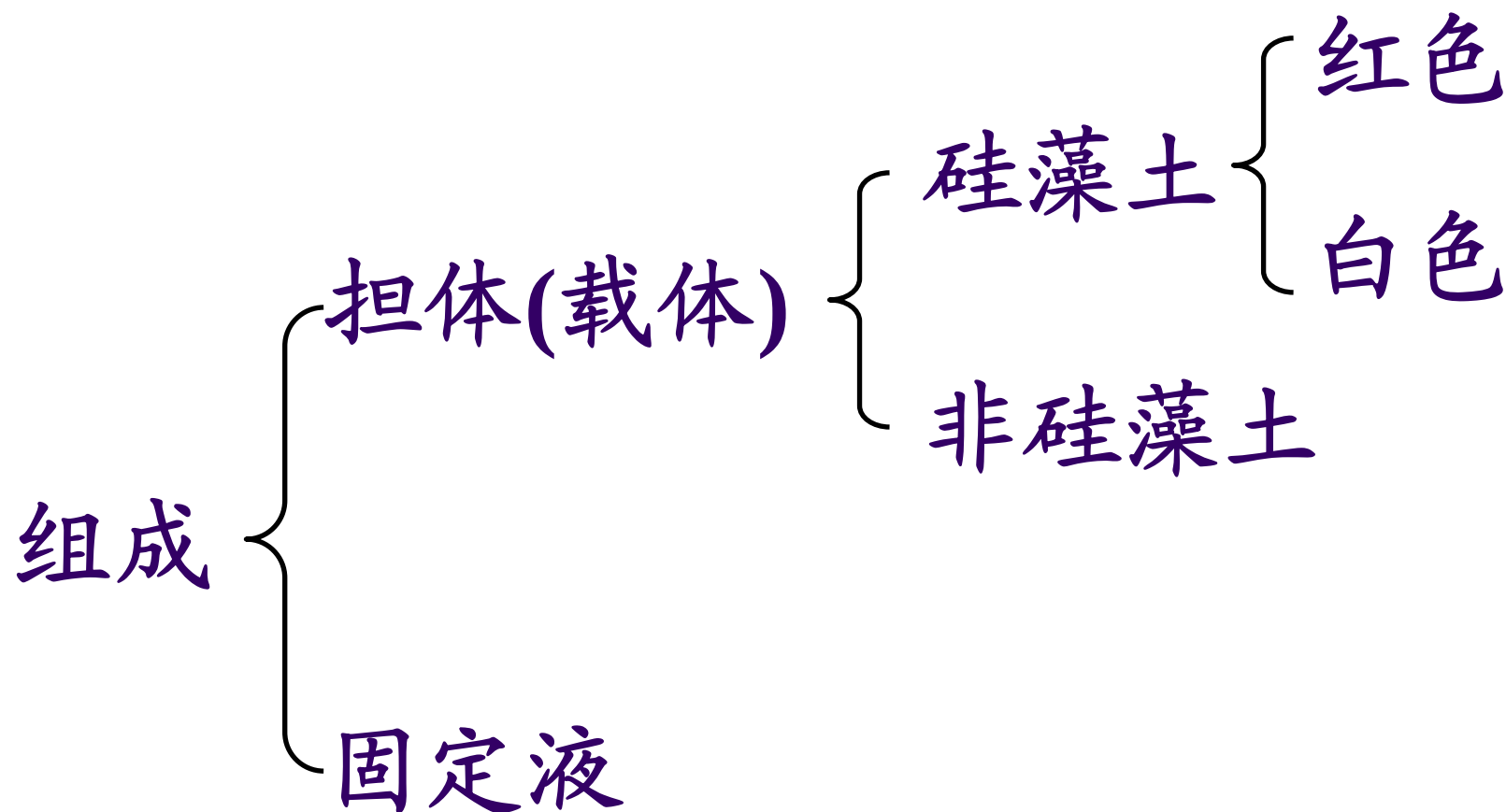
色谱柱是色谱分离的心脏!



毛细管柱分类

- 壁涂开管柱 (WCOT) ★
- 载体涂渍开管柱 (SCOT)
- 多孔开管柱 (PLOT)

气液色谱固定相





对载体的要求

- 具有**多孔性**，即比表面积大。
- **化学惰性**，表面没有活性，有较好的浸润性。
- **热稳定性好**。
- **有一定的机械强度**，使固定相在制备和填充过程中不易粉碎。

固定液－高沸点的有机化合物



◆ 对固定液的要求:

- 热稳定性好，在操作温度下不发生聚合、分解等反应；具有较低的蒸气压，以免流失。
- 化学稳定性好，不与样品或载气发生不可逆的化学反应。
- 粘度和凝固点低，以便在载体表面能均匀分布。
- 对样品中的各组分有适当的溶解度。

固定液的选择原则 – “相似相溶”



- a. 非极性物质—非极性固定液。
沸点越低的组分越早出峰。
- b. 极性物质—极性固定液。
极性越小的组分出越早出峰。
- c. 极性与非极性混合物—极性固定液。
极性越小的组分出越早出峰。
- d. 易形成氢键物质—极性或氢键型固定液。
不易形成氢键的组分先出峰，易形成氢键的组分后出峰。
- e. 复杂难分离样品—多种固定液混合。



常用毛细管色谱柱固定液

固定液	极性大小	适用范围
100 % 二甲基聚硅 氧烷	非极性	脂肪烃化合物， 石化产品
(50 % 三氟丙基)甲 基聚硅氧烷	中等极性	极性化合物，如 高级脂肪酸
聚乙二醇	中强极性	极性化合物，如 醇、羧酸酯等

检测系统



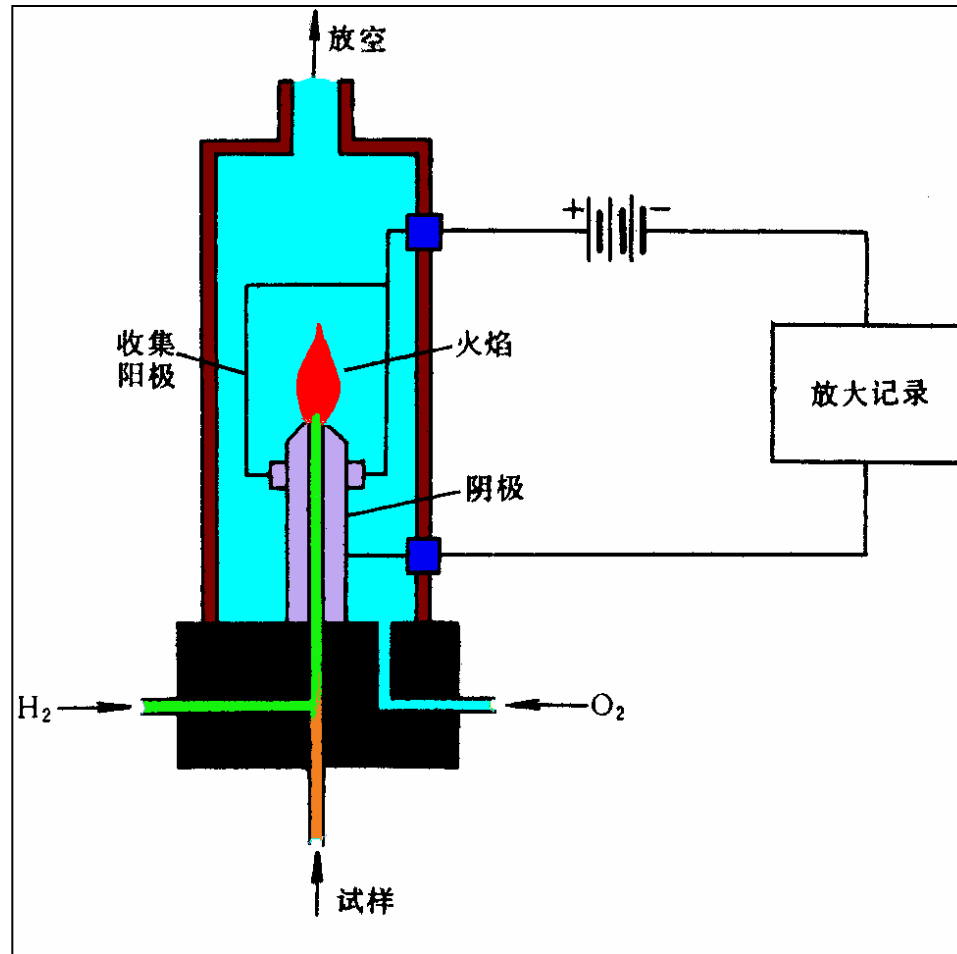
- 1. 热导池检测器 (TCD) (浓度型、通用型检测器)
- 2. 氢火焰离子化检测器 (FID) (有机化合物) ★
- 3. 电子捕获检测器 (ECD) (卤素化合物)
- 4. 火焰光度检测器 (FPD) (含硫、含氮和含磷化合物)
- 5. 氮磷检测器 (NPD) (含氮和含磷化合物)
- 6. 质谱检测器 (质量型、通用型检测器) ★

FID检测器



- 利用氢火焰作电离源，使有机物电离，产生微电流而响应的检测器。
- 对几乎所有的有机物都有响应，特别是烃类灵敏度高且响应与碳原子数成正比。
- 对 H_2O ， CO_2 ， CS_2 等无机物不敏感，对气体流速、压力和温度变化不敏感。
- 线性范围广，结构简单，操作方便。
- 死体积为零，可与毛细管柱直接相连。

FID检测器示意图



FID使用注意事项



1. 安全问题

(1) 防止氢气泄露

(2) 防烫伤

2. 保持FID的正常性能

(1) 正常点火

(2) 防止二氧化硅沉积

(3) 防止水等冷凝

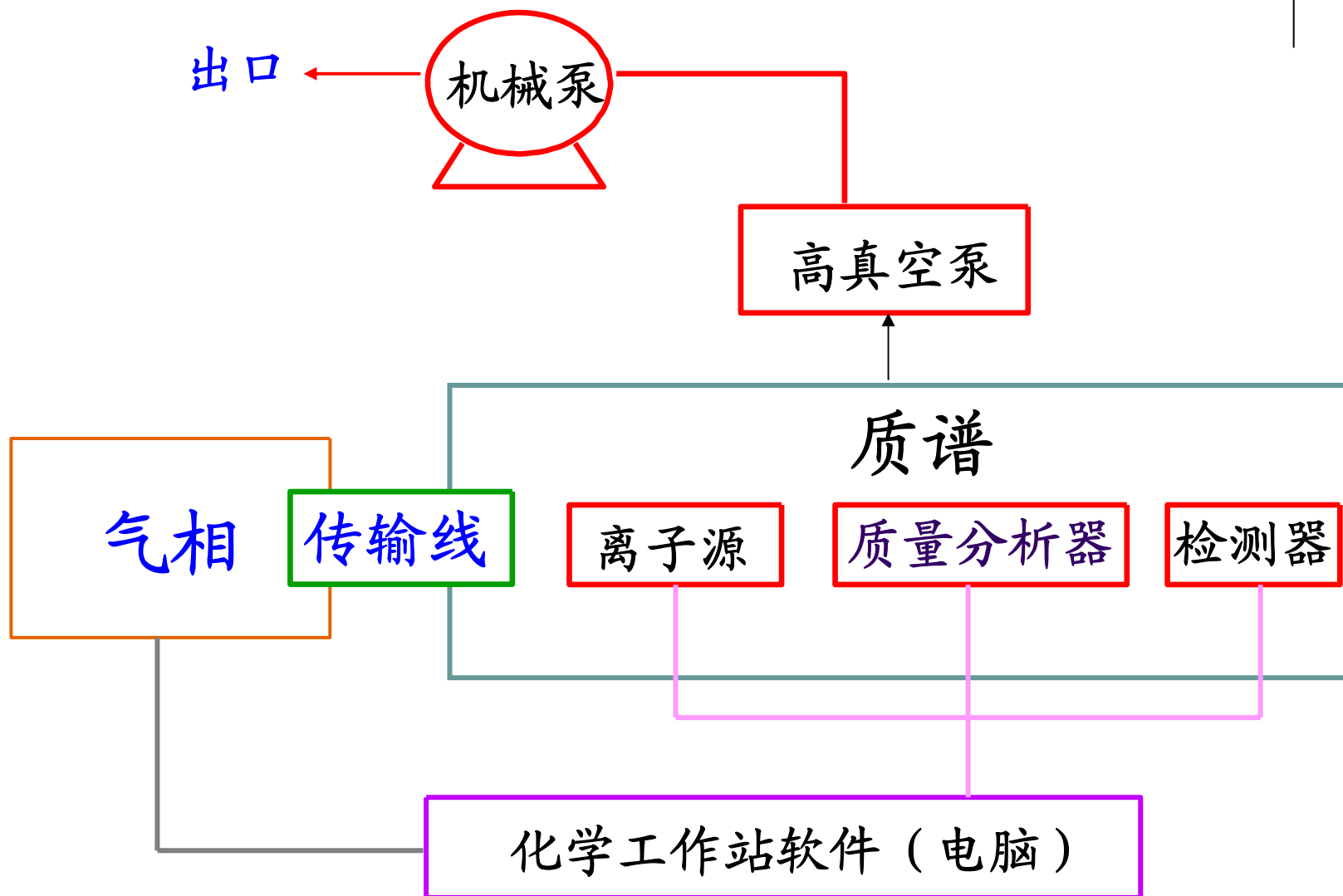
3. 注意数据正确可靠



GC-MS联用仪系统组成

- 进样部分（气相色谱）
- 离子源（对样品进行离子化，使其能被质量分析器所检测到）
- 质量分析器
- 质量检测器
- 数据分析系统

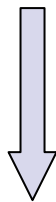
GC-MS基本流路图



GC-MS对载气选择的要求



- 必须是化学惰性的
- 必须不干扰质谱图
- 必须不干扰总离子流的检测
- 应具有使载气气流中的样品富集的某种特性



He



GC-MS 色谱柱的选择

- 柱效高
- 惰性好
- 热稳定性好

毛细管柱流失主要原因：固定液图渍不均，有缺陷；交联键合不完全，有小分子物质；老化不当，损失液膜；使用不当发生催化降解；柱子插入离子源的一头，外涂层（聚酰亚胺）也会进入离子源。



柱子老化的目的

- 可提高1/3塔版数
- 除去涂固定液时残留的溶剂
- 除去交联不全或聚合度低的小分子化合物
- 使固定液均匀铺展，掩盖某些活性点
- 对于旧柱子，除去残留物



老化柱子的方法

- **分段老化法** 从较低温度开始，在不同温度段（150，200，250，300度）分别停留一段时间。注意不能长时间停留在高温下老化。
- **程序升温老化法** 一般从50-60度开始以10度/min升温至300度（依柱的最高使用温度而定）。
- **进样老化法** 老化一定要充足载气避免干烤柱子，但也有不同载气的特殊老化法。

为什么MS需要真空？



- 提供足够的平均自由程
- 提供无碰撞的离子轨道
- 减少离子-分子反应
- 减少背景干扰
- 延长灯丝寿命
- 消除放电
- 增加灵敏度

离子源



离子源的作用是将被分析的样品分子电离成带电的离子，并使这些离子在离子光学系统的作用下，会聚成有一定几何形状和一定能量的离子束，然后进入质量分析器被分离。

- 电子轰击电离源 (EI)★
- 化学电离源 (CI)★
- 场致电离源 (FI)
- 大气压化学电离源 (APCI)
- 电喷雾电离源 (ESI)

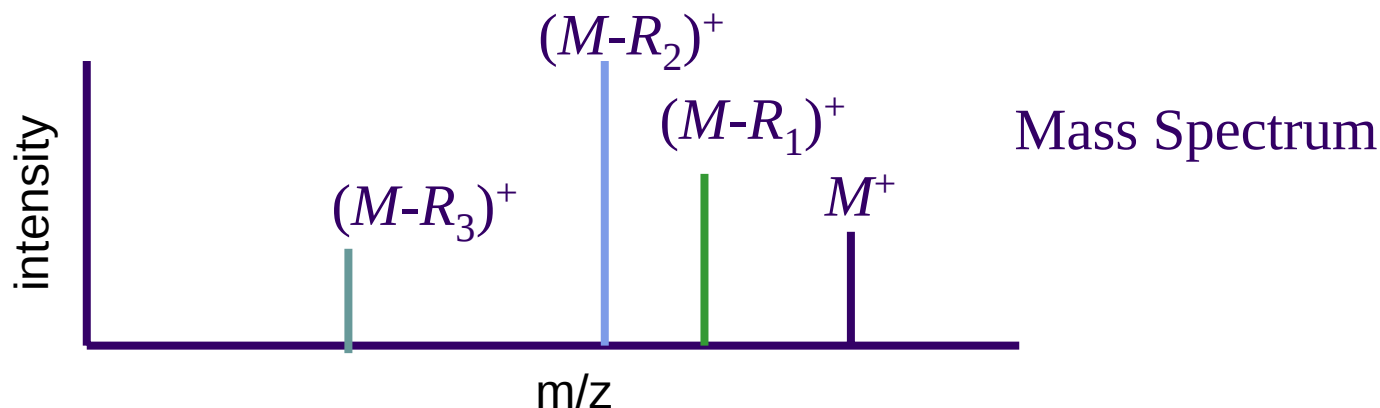
Electron Impact Ionization (EI)



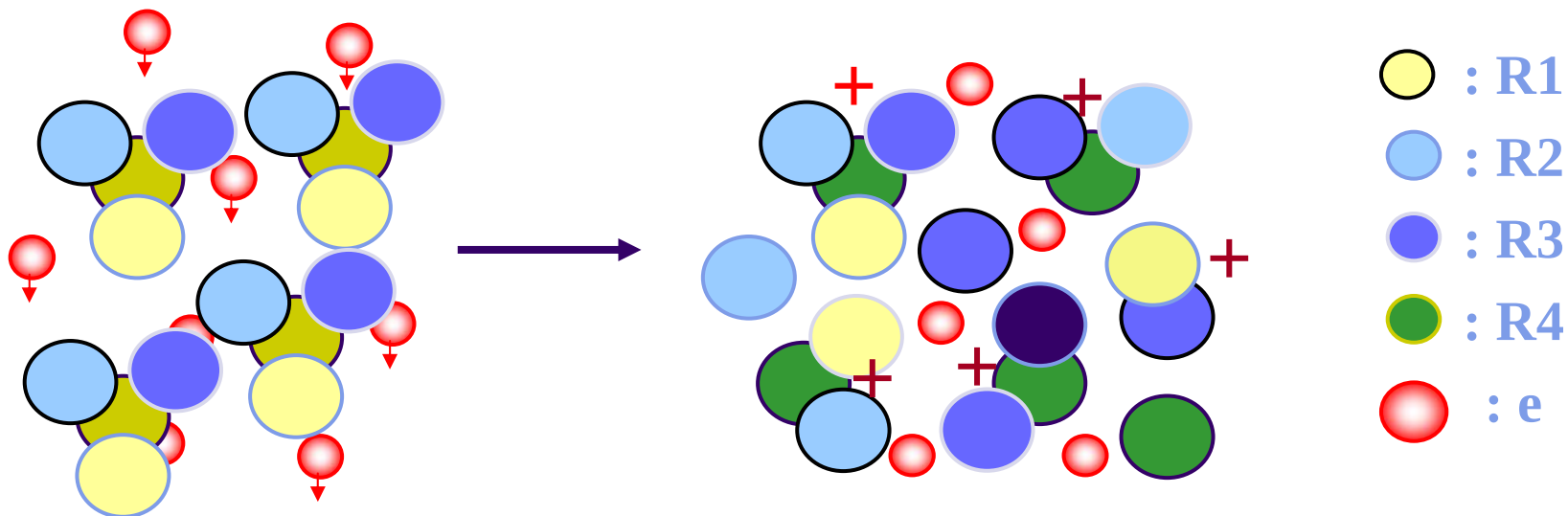
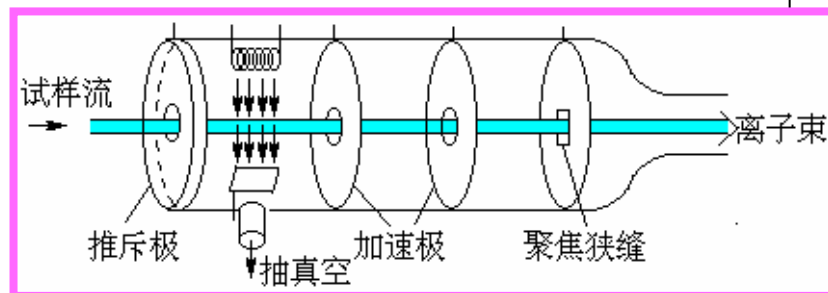
电子轰击电离又称为电子轰击，或电子电离。是应用最普遍，发展最成熟的电离方法。

轰击电压 50-70eV, 有机分子的电离电位一般为7-15eV。可提供丰富的结构信息。

有些化合物的分子离子不出现或很弱。



Electron Impact Ionization (EI)





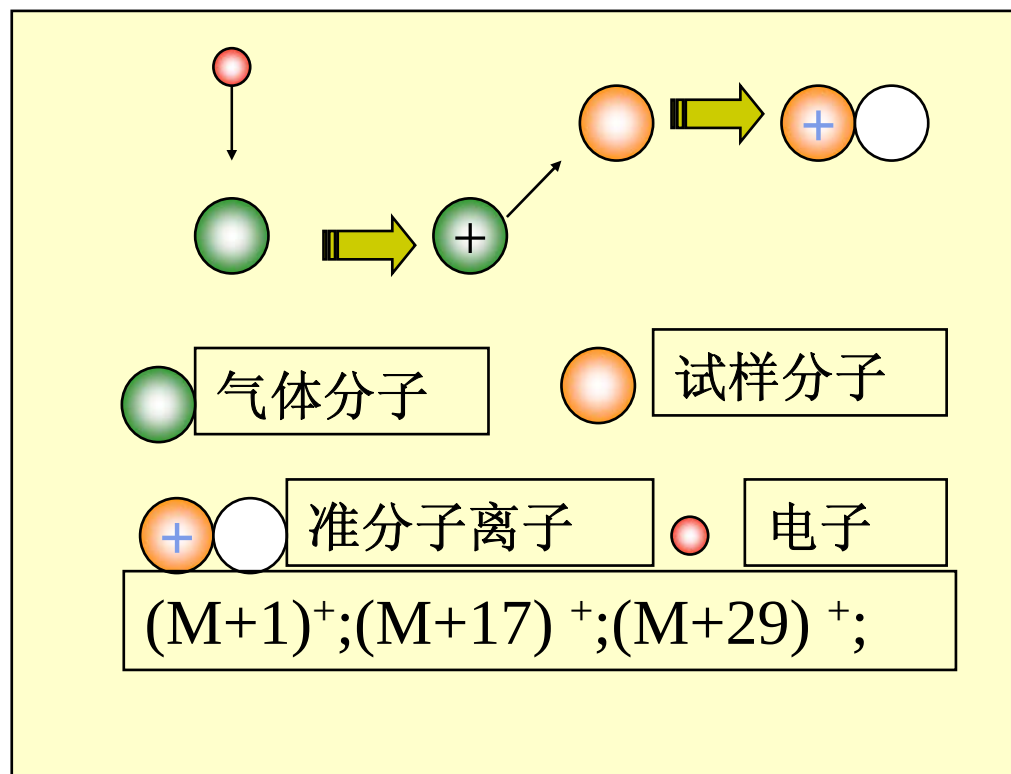
EI源的优、缺点

- 结构简单、温控和操作均较方便
- 电离效率高、所形成的离子动能分散小
- 性能稳定、所得谱图是特征的、能表征组分的分子结构（目前大量的有机物标准质谱图均是用EI源得到的）
- 样品必能气化，不适于难挥发、热不稳定的样品
- 有的化合物在EI方式下分子离子不稳定、易碎裂，得不到分子量信息，谱图复杂解释有一定困难
- EI方式只检测正离子，不检测负离子

Chemical Ionization (CI)



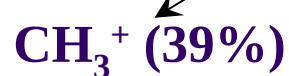
离子室内的反应气（甲烷等； $10\sim 100\text{Pa}$ ，样品的 $10^3\sim 10^5$ 倍），受电子（ $100\sim 240\text{eV}$ ）轰击，产生离子，再与试样分离碰撞，产生准分子离子。



Chemical Ionization (CI)



小分子如 CH_4 , $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 等。以 CH_4 为例



初级离子: $\text{CH}_4^{+\cdot}$, CH_3^+ , $\text{CH}_2^{+\cdot}$



.....

CH_5^+ , C_2H_5^+ , C_3H_5^+ 等为稳定的次级离子。

准分子离子: $[\text{M}+\text{H}]^+$



CI源的优、缺点

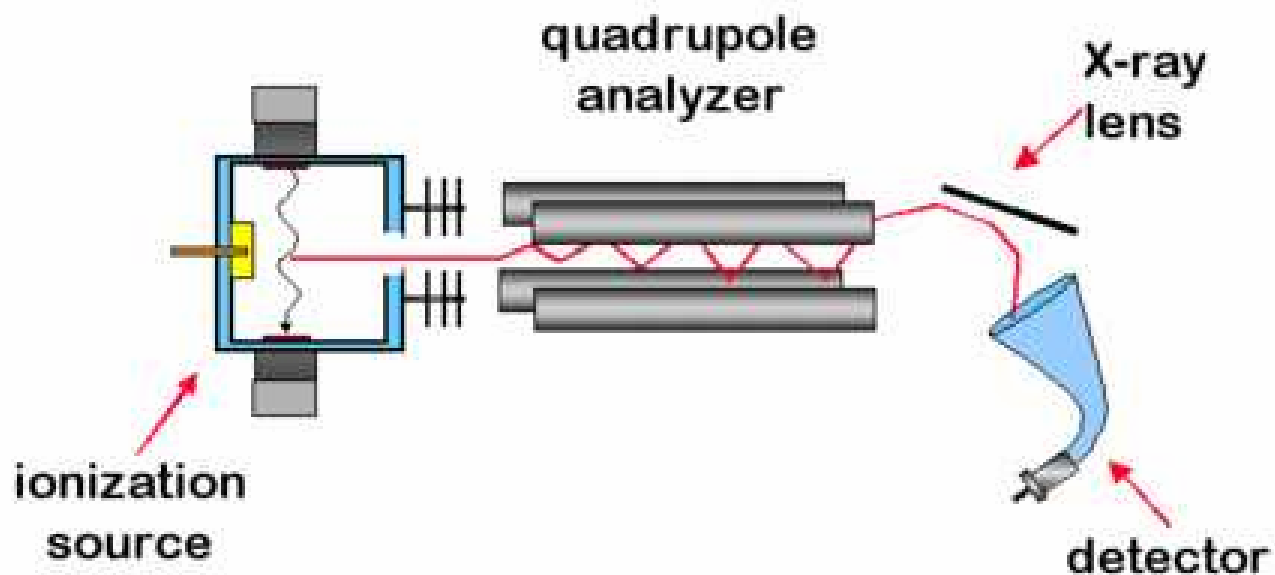


- 离子-分子反应后剩余的内能很**小**，故分子离子峰大，碎片离子峰**少**，谱图**简单**，易识别。
- CI有**选择性**，使其仅与样品中的被测组分反应，从而使该组分和检测。
- 可检测**负离子**，灵敏度高。
- 谱图重现性**差**，故谱库中无CI源标准谱图。
- 和EI一样要求样品必须能**气化**，适用于热稳定性好、蒸汽压高的样品，不适于难挥发、热不稳定的样品。

四级杆质量分析器



Schematic of a quadrupole MS system.





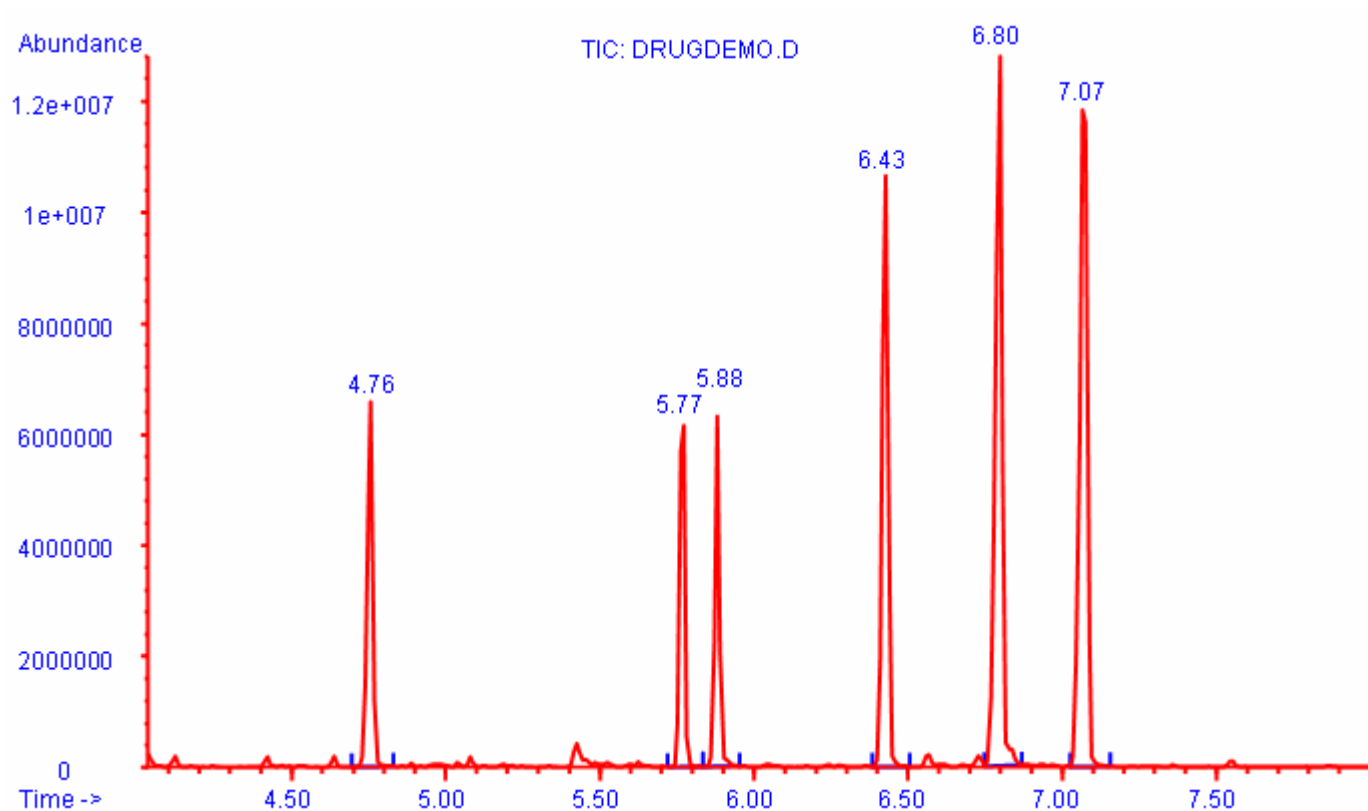
- 四极杆质量分析器是GC/MS联用最通用的一种质量分析器，有长久的应用历史，性能稳定。
- 有全扫描（Scan）和选择离子监测（SIM）两种不同扫描模式。
- 扫描速度快，灵敏度高。尤其是SIM模式，以最大的采集效率，有选择性地检测单个或几个质量离子，从而降低信噪比，提高灵敏度几个数量级，适用于各种定量分析，满足高通量分析需求。
- 可同时配置EI和正、负CI源，EI源可获得丰富的结构信息，CI源则提供EI源得不到的分子量信息。



数据再现形式

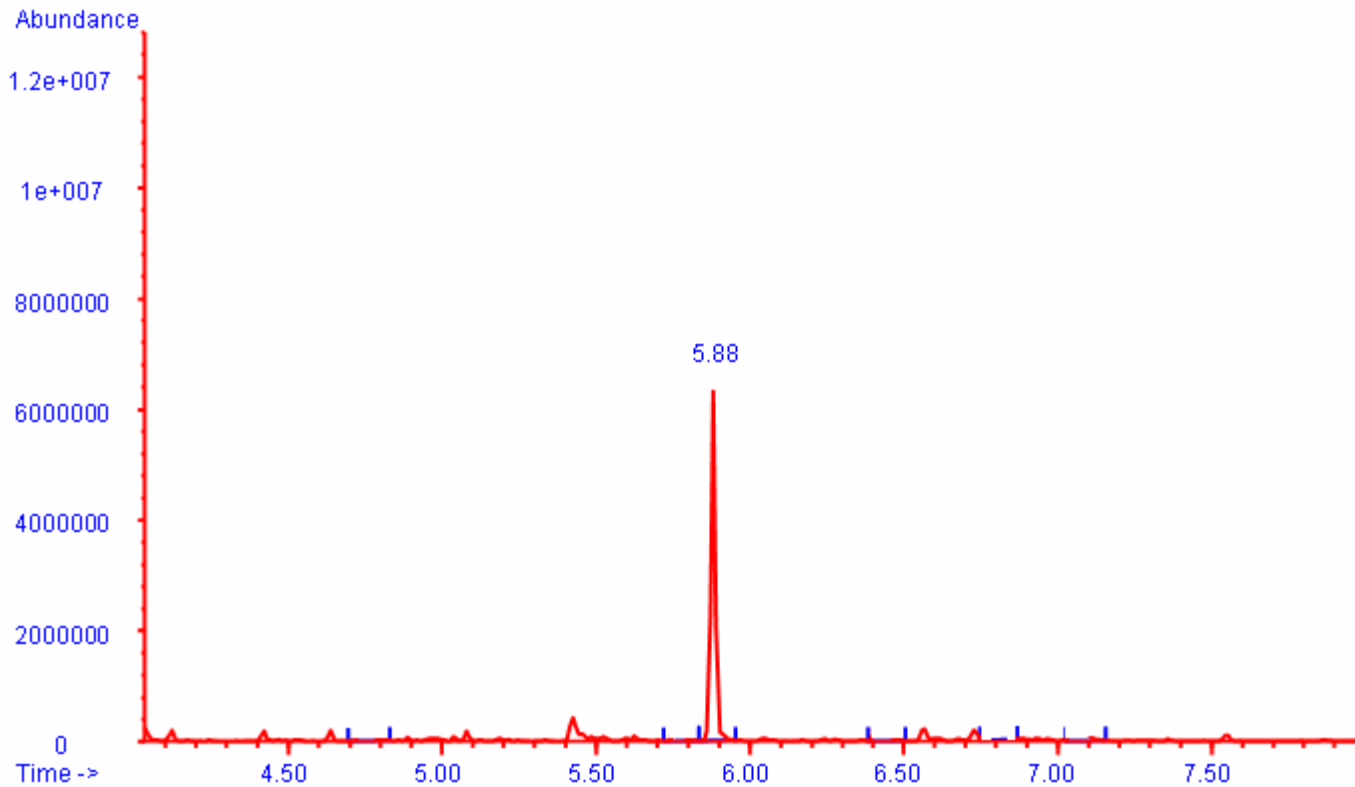
- 总离子流色谱图（total ion current, TIC）
- 质量色谱图又名提取离子流色谱图
（extracted ion chromatography）
- 质谱图（mass sepcturm, MS）

总离子流色谱图



Total ion current, TIC

质量色谱图（提取离子流色谱图）



Extracted ion chromatography



质量色谱图用途

- 利用质量色谱法搜寻目标化合物，以快速鉴别化合物类型。
- 可以检查色谱峰的纯度，即利用化合物特征离子质量色谱保留时间的差异，分辨共流出的色谱峰。
- 质量色谱图比总离子流色谱图简洁，消除了背景干扰，信噪比更好。



质谱扫描技术

❖ 全扫描 (Scan) —————→ 定性

❖ 选择离子 (SIM) —————→ 定量

全扫描方式



最常用的一种扫描模式，扫描的质量范围覆盖被测化合物的分子离子和碎片离子的质量，得到的是化合物的全谱，可以用来进行谱库检索。

- **扫描质量**起点和终点的选择，取决于待测化合物的分子量和低质量的特征碎片。
- **阈值**的设置不仅影响质谱峰数多少，而且影响色谱图的基线和峰的分离，**倍增器工作电压**影响全质量范围离子丰度。
- **扫描时间**指在设置的质量范围内完成一处扫描所需要的循环时间。每个色谱峰的**扫描次数**越多，峰形越好，对建立TIC有利。



选择离子检测 (SIM)

SIM是什么?

不是连续扫描某一质量范围，而是
跳跃式地扫描某几个选定的质量。

它如何做?

控制质量分析器，仅仅对感兴趣的
质量进行分析



为什么做？

提高灵敏度
改善峰形
改善精确度

应用：

痕量分析
复杂基质
常规定量



定量方法

- 面积归一化法
- 校正面积归一化法
- 外标法
- 内标法



- **面积百分率法（面积归一）**

各组分浓度以面积百分率表示，该结果可以确认大概的浓度，但有误差。

- **校正面积百分率法（校正面积归一）**

用重量响应因子对峰面积进行修正，用该法测定的浓度比前者准确，但前提是样品中所有组分都出峰，否则也有误差存在。

这两种方法应用的**必需条件**是：

- 1.样品中所有组分都出峰；
- 2.所有峰面积计算必须准确。



3.外标法

该法是应用**最广泛**的方法之一，其误差来源主要是进样误差，因此，分析前一定要做面积重复性（即进样重复性）实验。

4.内标法

在样品中添加**内标物**，通过组分与内标峰的面积比，对组分进行定量。该方法减小了**进样误差**对定量结果的影响。



内标物的选择

- 内标物的峰与试样中的所有成分的峰完全分离。
- 内标物的峰与目标成分的峰保留时间不应差太远。
- 内标物具有与分析目标成分类似的化学性质。



分析方法的建立

- 样品来源及其前处理方法
- 确定仪器配置
- 确定初始操作条件
- 分离条件优化
- 定性鉴定
- 定量分析



GC-MS联用中衍生化的作用

- 改善了待测物气相色谱性质
- 改善了待测物的热稳定性
- 改变了待测物的分子量
- 改善了待测物的质谱行为
- 引入卤素原子或吸电子基团
- 通过一些特殊的衍生化方法，可以拆分一些难分离的手性化合物



衍生化方法不当引起的弊端

- 柱上衍生化有时会**损失色谱柱**
- 某些衍生化试剂需在氮气流中吹干除去，方法不当会**有损失**
- 衍生化反应不完全，会**影响灵敏度**
- 衍生化试剂选用不当，会使待测物分子量增加过多，**接近或超过一些小型质谱检测器的质量范围**

GC-MS联用中常用的衍生化方法



- 硅烷化衍生化

- (1) BSTFA和BTA衍生化胺基和羟基
- (2) MTBSTFA常用于药物、类固醇类检测
- (3) MSTFA是最常用的硅烷化试剂（苹果酸、富马酸、柠檬酸等）
- (4) 单糖硅烷化时一般用三甲基硅烷咪唑（甘露糖、半乳糖、海藻糖等）

- 酰化衍生化

- (1) 乙酰化（体内药物筛选，大多数的临床药物）
- (2) 三氟乙酰化/五氟丙酰化/七氟丁酰化（苯丙胺类和麻黄碱类）

- 烷基化衍生化（农药和杀虫剂）



确定仪器配置和初始操作条件

- 选择分析系统：进样方式、色谱柱等
- GC参数：载气流量、分流比、温度条件等
- MS参数：

扫描模式：SCAN, SIM

离子源：EI, PCI, NCI

检测器电压等

进样口、色谱柱、检测器的温度设定



- 进样口温度

考虑样品中各组分的沸点，设定温度使样品瞬间汽化。

- 色谱柱温度

考虑样品中各组分的沸点，及希望的分析周期，宽沸程样品应使用程序升温。

- 检测器温度

防止检测器污染，一般比色谱柱温度高20-30℃。

$$\text{DET.T} \geq \text{INJ.T} \geq \text{COL.T} + 20^{\circ}\text{C}$$



GC-MS应用

- **MSD**不但可用于未知物的鉴定，还可用于痕量组分的定量，所以应用面比一般气相色谱检测器广得多。
- **MSD**已广泛应用与环境、农业、食品、生物、医药、法庭和工业等诸多科学领域。

环境分析



- 大气污染分析（有毒有害气体，气体硫化物、氮氧化物等）
- 饮用水分析（多环芳烃、农药残留、有机溶剂）
- 水资源分析（包括淡水、海水和废水中有机污染物分析）
- 土壤分析（有机污染物）
- 固体废弃物分析



食品分析

- 脂肪酸甲酯分析
- 农药残留分析
- 香料香精分析
- 食品添加剂分析
- 食品材料中挥发物的分析

药物和临床分析



- 雌三醇测定
- 尿中孕二醇和孕三醇测定
- 尿中胆甾醇的测定
- 儿茶酚胺代谢产物分析
- 血液中乙醇、麻醉剂以及氨基酸衍生物的分析
- 血浆中的睾丸激素分析
- 某些挥发性药物分析



石油和石油化工分析

- 地球化学分析
- 原油分析
- 炼厂气分析
- 含硫和含氮化合物分析
- 汽油添加剂分析
- 脂肪烃分析和芳烃分析
- 油品分析
- 模拟蒸馏和工艺过程色谱分析

ICS 67.100

C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 22388—2008

原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法

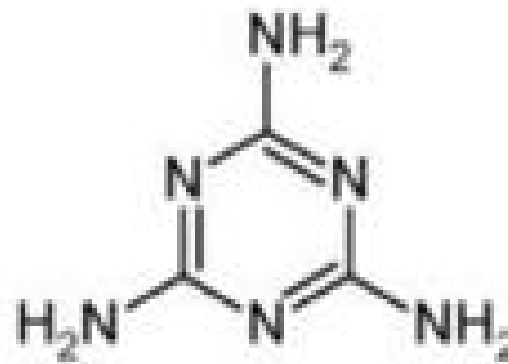
**Determination of melamine in raw
milk and dairy products**

气相色谱-质谱法联用 (GC-MS)



●原理

试样经超声提取、固相萃取净化后，进行硅烷化衍生，衍生产物采用选择离子检测质谱扫描模式 (SIM)，用化合物的保留时间和质谱碎片的丰度比定性，外标法定量。



三聚氰胺 (Melamine)

液体样品提取



液态奶、奶粉、酸奶和奶糖等

称取5 g（精确至0.01 g）样品于50 mL具塞比色管，加入25 mL三氯乙酸溶液，涡旋振荡30 s，再加入15 mL三氯乙酸溶液，超声提取15 min，加入2 mL乙酸铅溶液，用三氯乙酸溶液定容至刻度。充分混匀后，转移上层提取液约30 mL至50 mL离心试管，以不低于4000 r/min离心10 min。上清液待净化。

固体样品提取



奶酪、奶油和巧克力等

称取5 g（精确至0.01g）样品于50 mL具塞比色管中，用5 mL热水溶解（必要时可适当加热），再加入20 mL三氯乙酸溶液，涡旋振荡30 s，再加入15 mL三氯乙酸溶液超声提取及以下操作同前液体样品提取。若样品中脂肪含量较高，可以先用乙醚脱脂后再用三氯乙酸溶液提取。



样品净化

准确移取**5 mL**的待净化滤液至固相萃取柱（**SPE**）中。再用**3 mL**水、**3 mL**甲醇淋洗，弃淋洗液，抽近干后用**3 mL**氨化甲醇溶液洗脱，收集洗脱液，**50℃**下氮气吹干。



衍生化

取上述氮气吹干残留物，加入**600 μ L**的**吡啶**和**200 μ L**衍生化试剂（*N,O*-双三甲基硅基三氟乙酰胺（**BSTFA**）+ 三甲基氯硅烷（**TMCS**）（99 + 1），色谱纯。），混匀，70℃反应30 min后，供GC-MS法定量检测或确证。

GC-MS实验条件



- a) 色谱柱: 5% 苯基二甲基聚硅氧烷石英毛细管柱, 30 m $\times$ 0.25 mm (i.d.) $\times$ 0.25 μ m, 或相当者。
- b) 流速: 1.0 mL/min。
- c) 程序升温: 70°C 保持1 min, 以10°C/min 的速率升温至200°C, 保持10 min。
- d) 传输线温度: 280°C。
- e) 进样口温度: 250°C。
- f) 进样方式: 不分流进样。
- g) 进样量: 1 μ L。
- h) 电离方式: 电子轰击电离 (EI)。
- i) 电离能量: 70 eV。
- j) 离子源温度: 230°C。
- k) 扫描模式: 选择离子扫描, 定性离子m/z 99、171、327、342, 定量离子m/z 327。

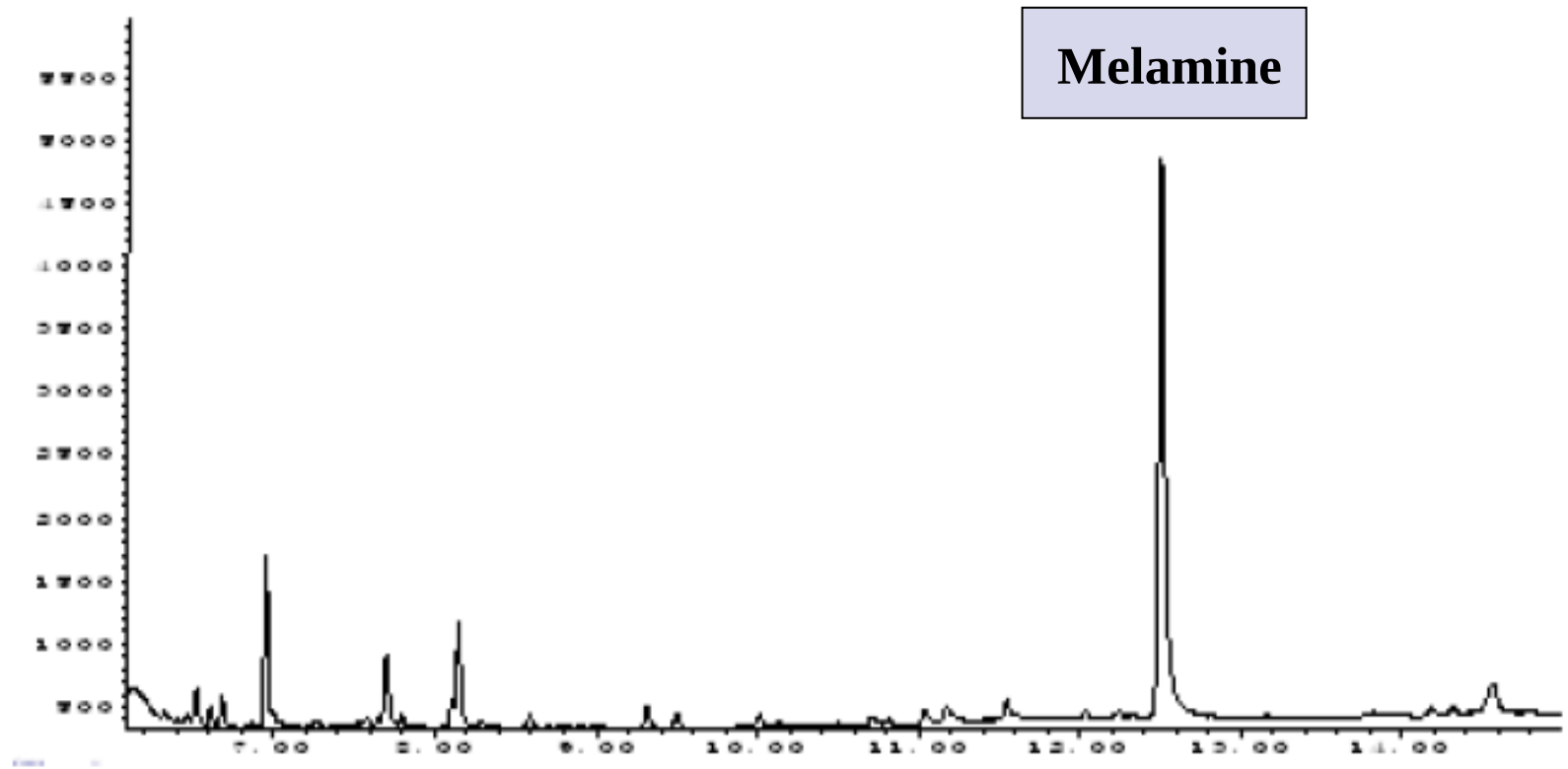


图 A.3 三聚氰胺衍生物 GC-MS 选择离子色谱图
(保留时间 12.514 min)

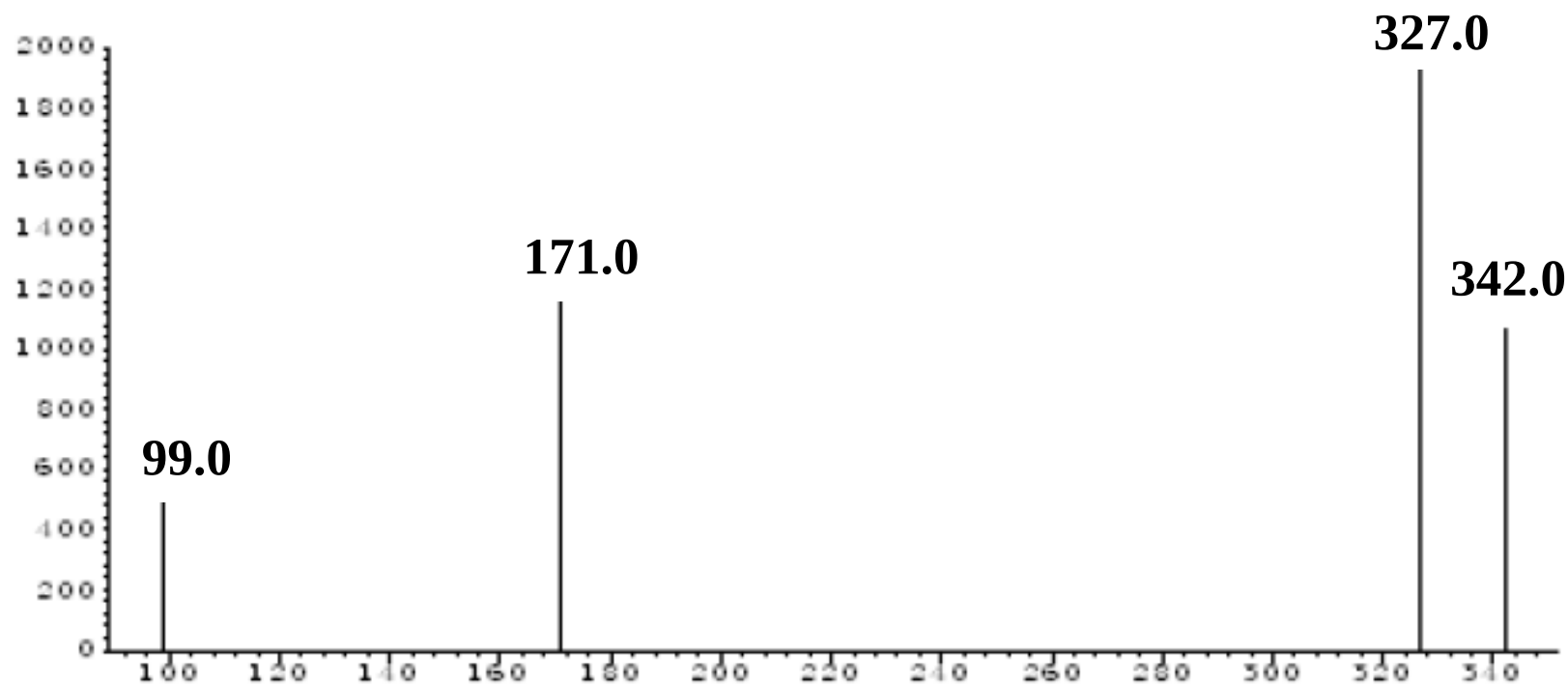


图 A.4 三聚氰胺衍生物 GC-MS 选择离子质谱图
(定性离子: m/z 99、171、327 和 342)

GC-MS测定氨基酸



- 样品前处理

- (1) 实际样品的水解

- (2) 氨基酸的衍生化 (MSTFA or BSTFA)

- 定性分析

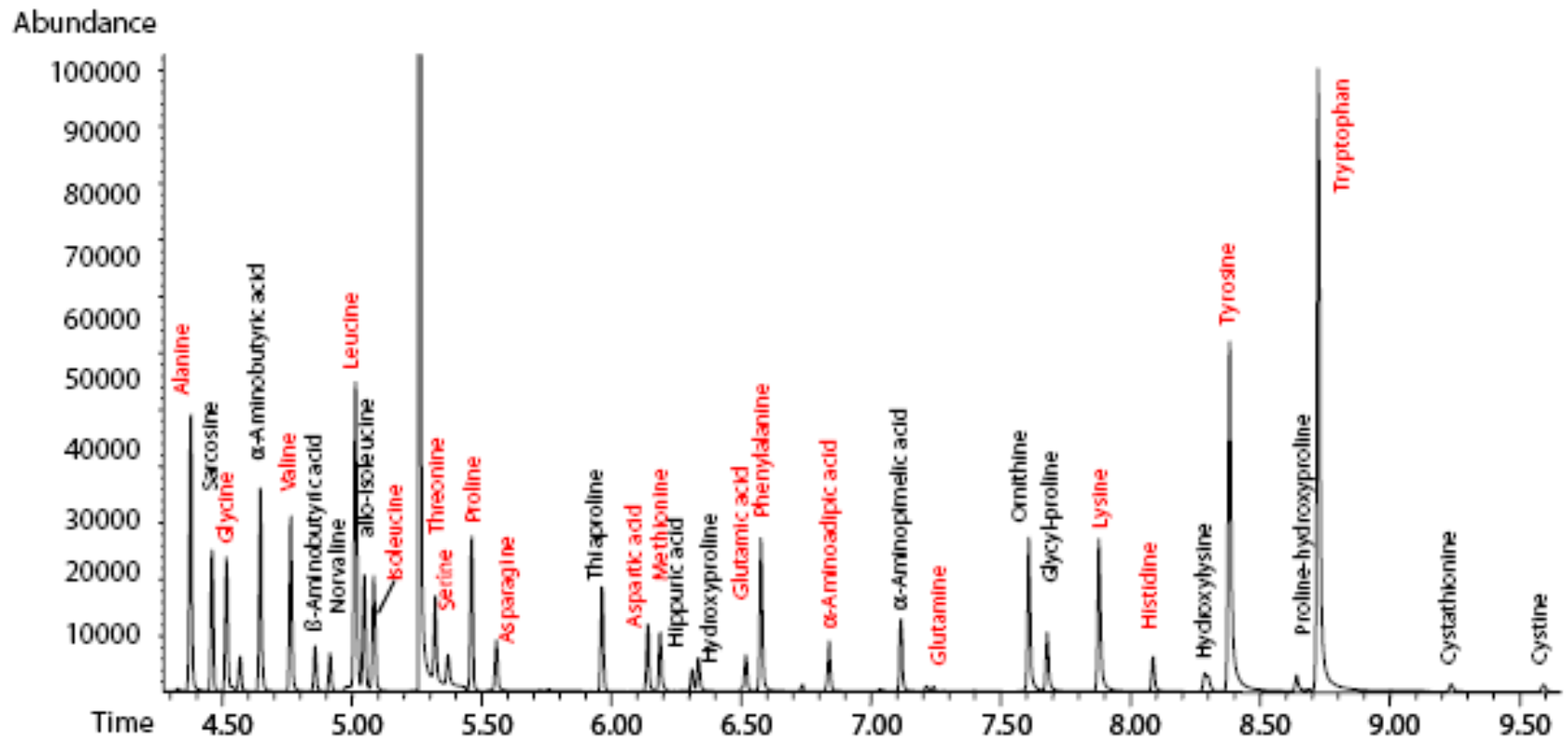
- (1) 质谱定性

- (2) 保留时间定性

- 定量分析

- (1) 内标法

- (2) 制定工作曲线



LOD: 0.03-12 $\mu\text{mol/L}$



开机前的准备:

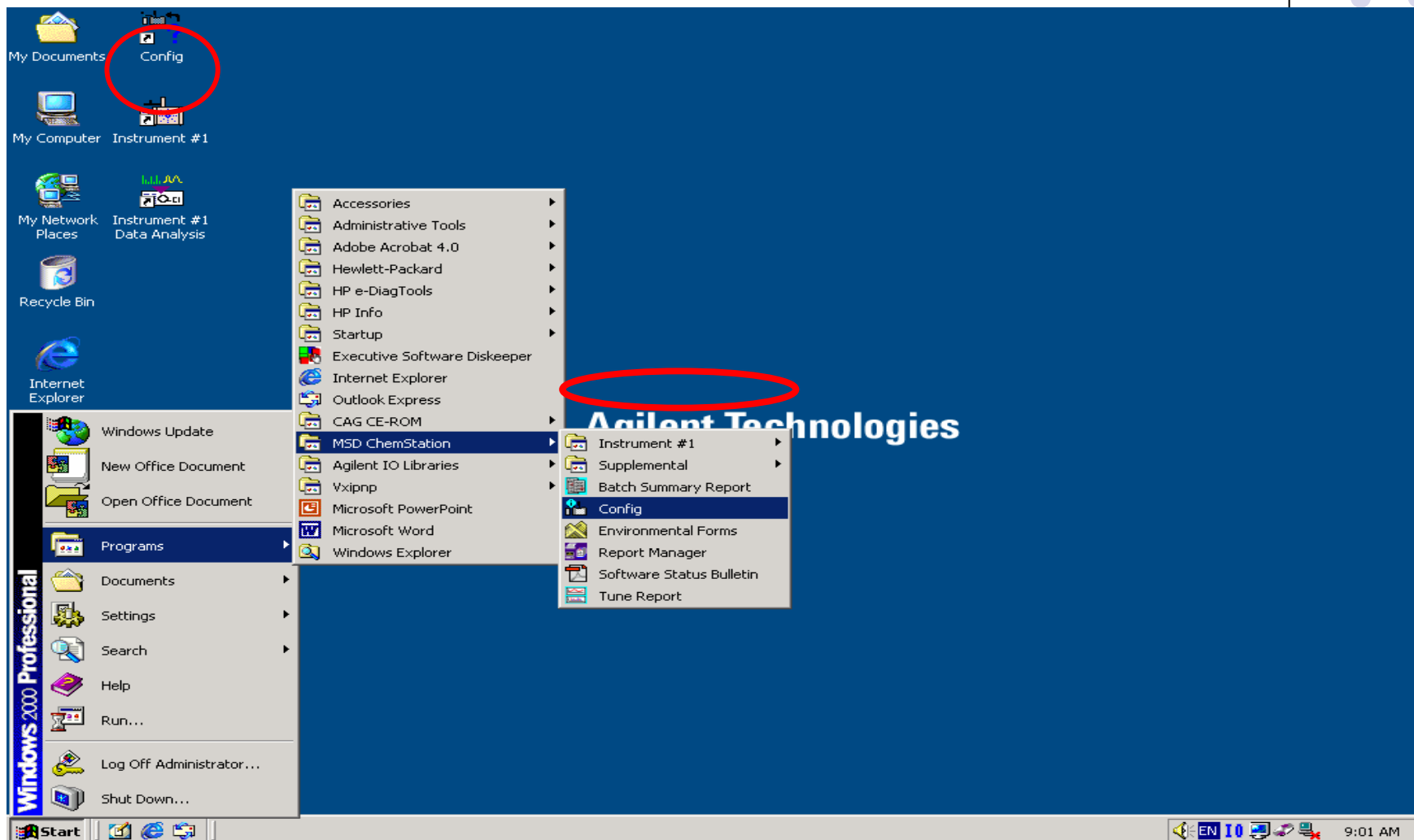
- 放气阀须关好
- MSD连接到接地的电源上
- MSD的接口伸入柱温箱
- 老化好的毛细柱接好两端
- 99.999%的氮载气接到GC上,推荐使用净化器



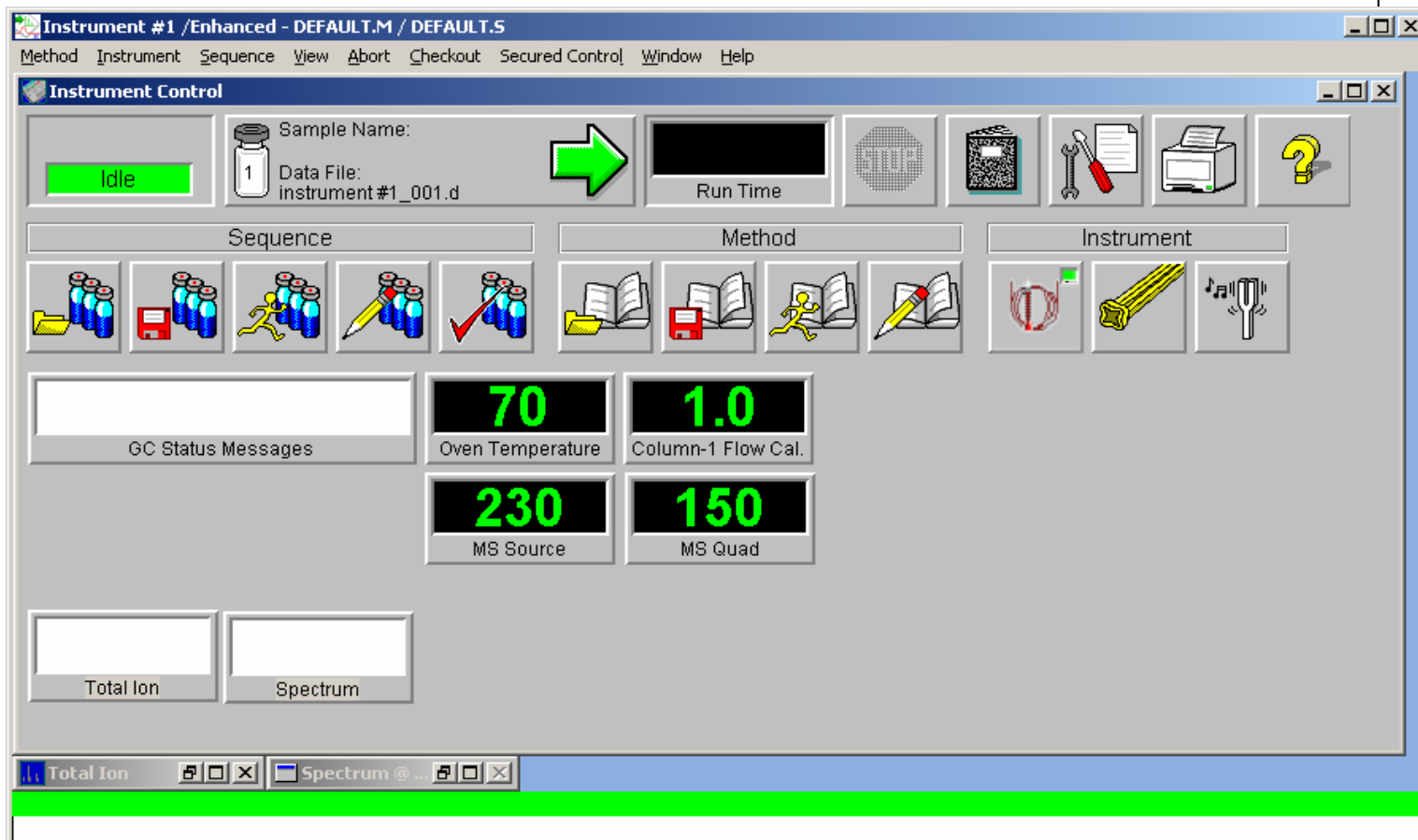
597X MSD开/关机顺序

- 打开计算机
- 打开气相色谱及597X质谱电源。待气相色谱完成自检， 597X质谱真空泵工作正常（如果机械泵声音不正常，检查侧门和放空阀是否关闭）
- 进入化学工作站
- 从view菜单选tune/vacuum control
- 从vacuum 菜单选pump down

开机图标

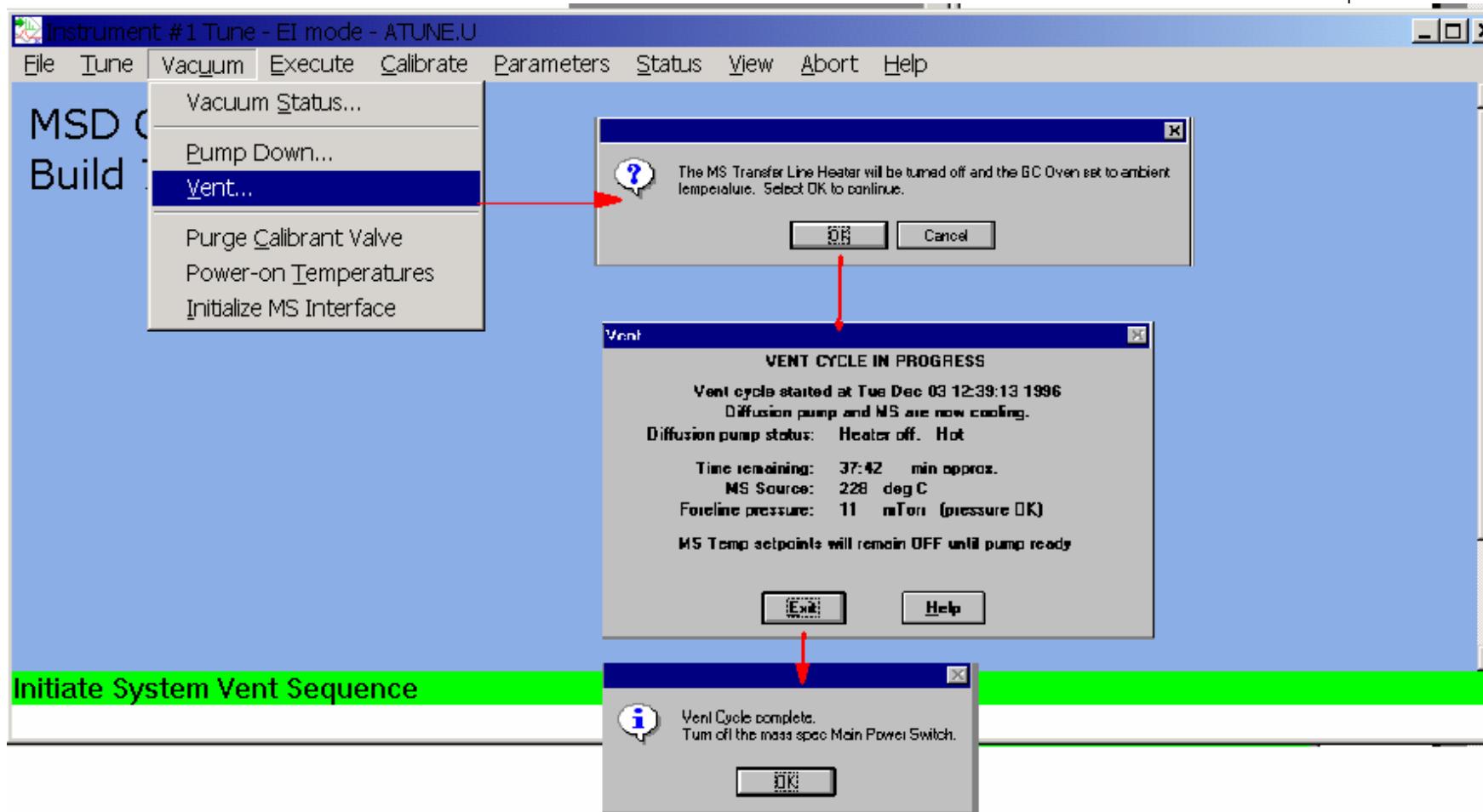


仪器控制

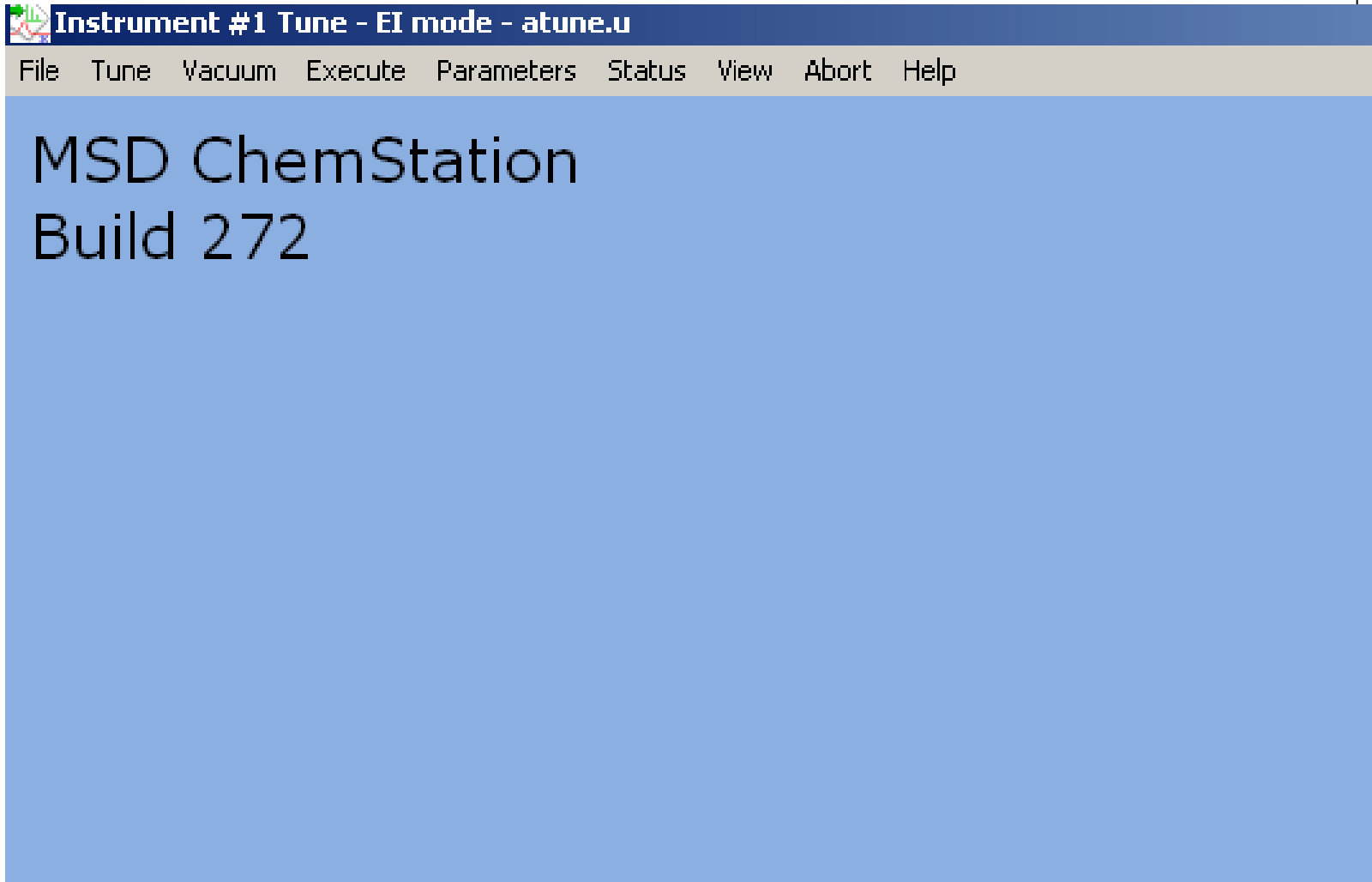


- 所有的仪器控制界面都可以从这一界面看到
- 当前的方法和序列可以在标题栏看到

系统放气, 关机



调谐与真空控制窗口





调谐做什么？

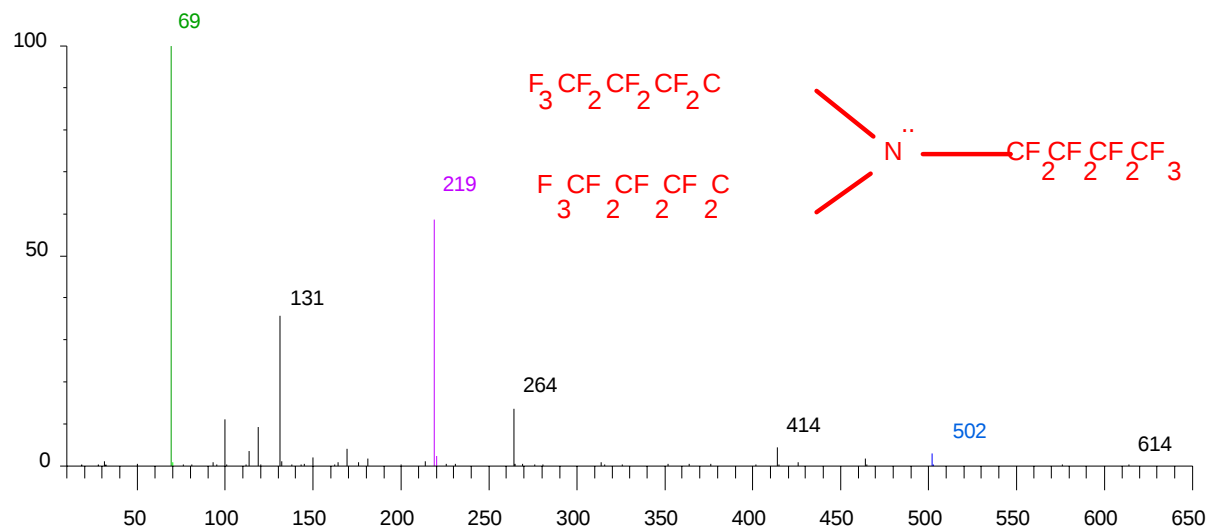
- 设定离子源部件的电压,以得到良好的灵敏度
- 设定 amu gain 和 offset 以得到正确峰宽
- 设定 mass gain 和 mass offset 以保证正确的质量分配
- 设定 EM 电压

调谐标样



全氟三丁胺(PFTBA)

Scan: 10.00 - 650.00 Samples: 16 Thresh: 500
117 peaks Base: 69.00 Abundance: 1974784



Mass	Abund	Rel Abund	Iso Mass	Iso Abund	Iso Ratio
69.00	1974784	100.00	70.00	20344	1.03
219.00	1161216	58.80	219.95	45968	3.96
502.00	56648	2.87	503.00	5690	10.04

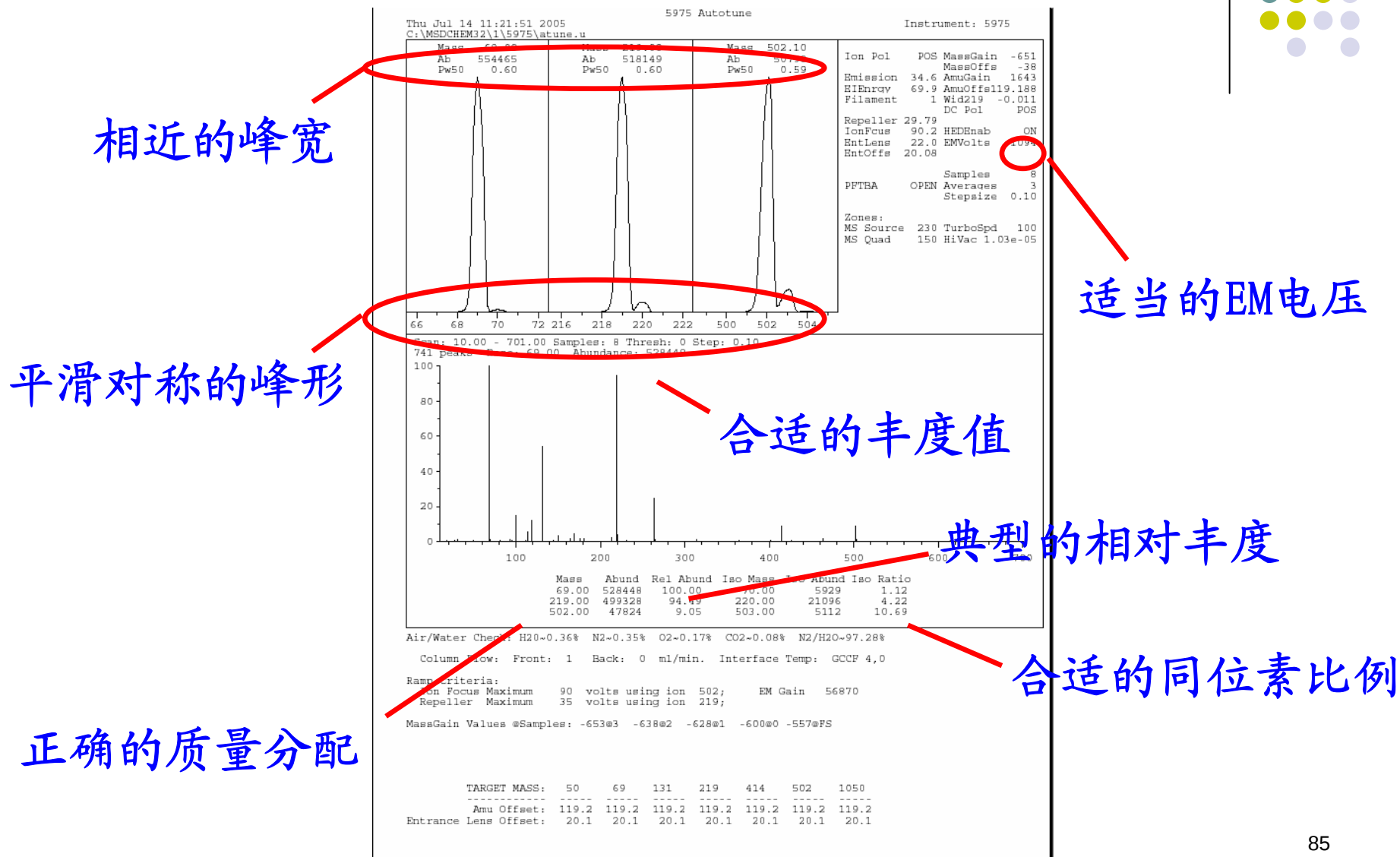
- 稳定
- 可挥发
- 碎片涵盖质量范围宽
- 仅有C-13 和 N-15同位素
- 无质量缺陷



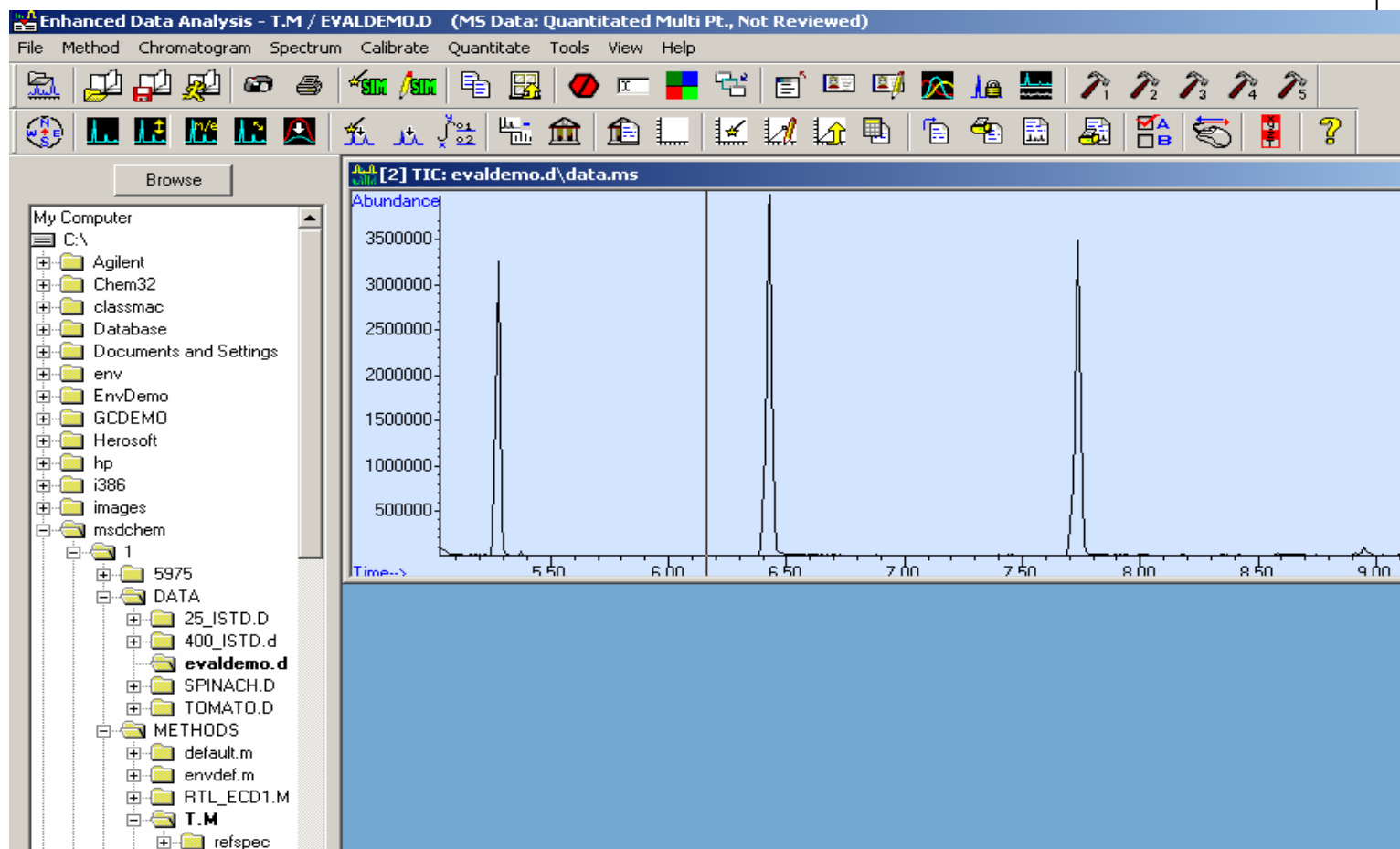
自动调谐流程图

- 寻找质量峰
- 粗调EM电压和峰宽
- 调节离子源部件使502达到最佳
- 调节EM和峰宽达到最佳
- 质量轴校正
- 保存文件

自动调谐报告



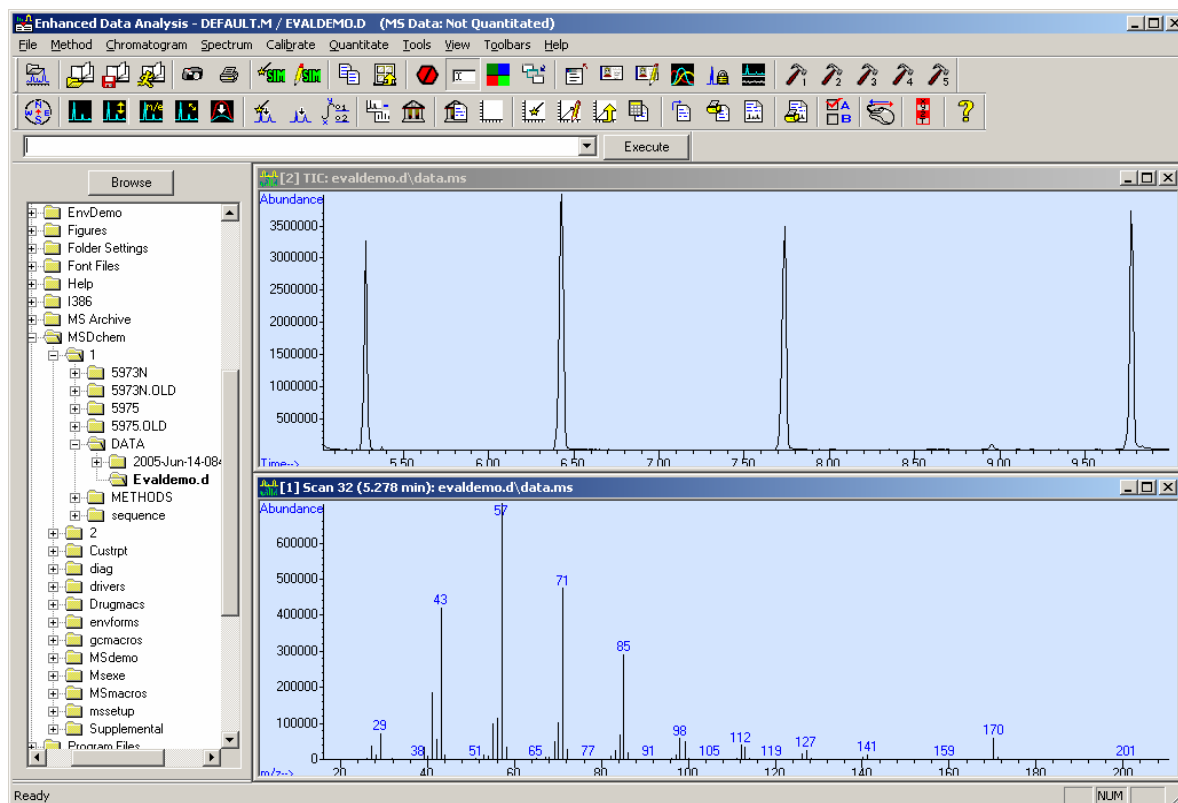
Data Analysis 数据分析窗口



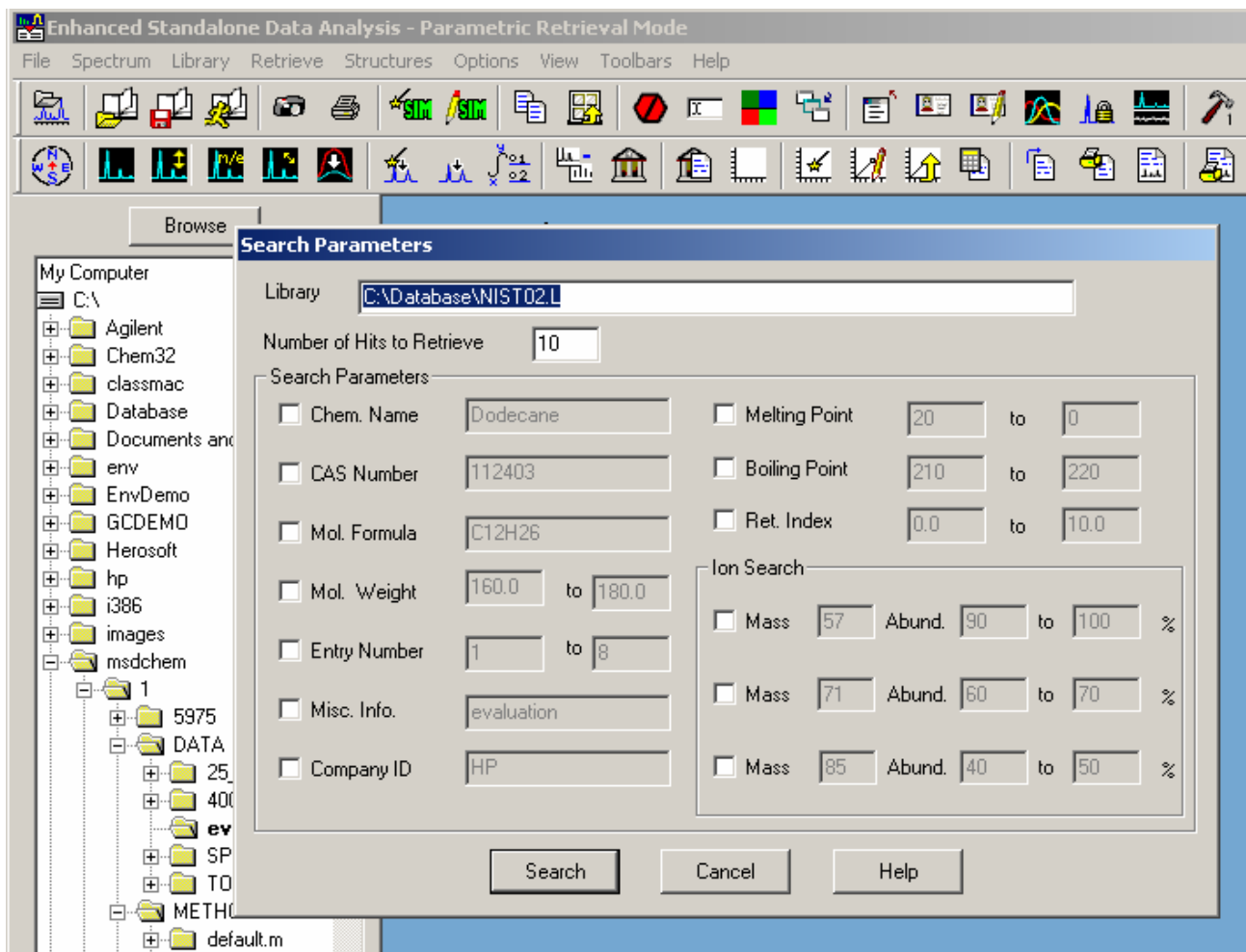
用于数据后处理（积分、本底扣除、谱库检索、定量分析等）

数据分析界面

- 用快照功能处理正在采集的数据
- 用于定性和定量分析



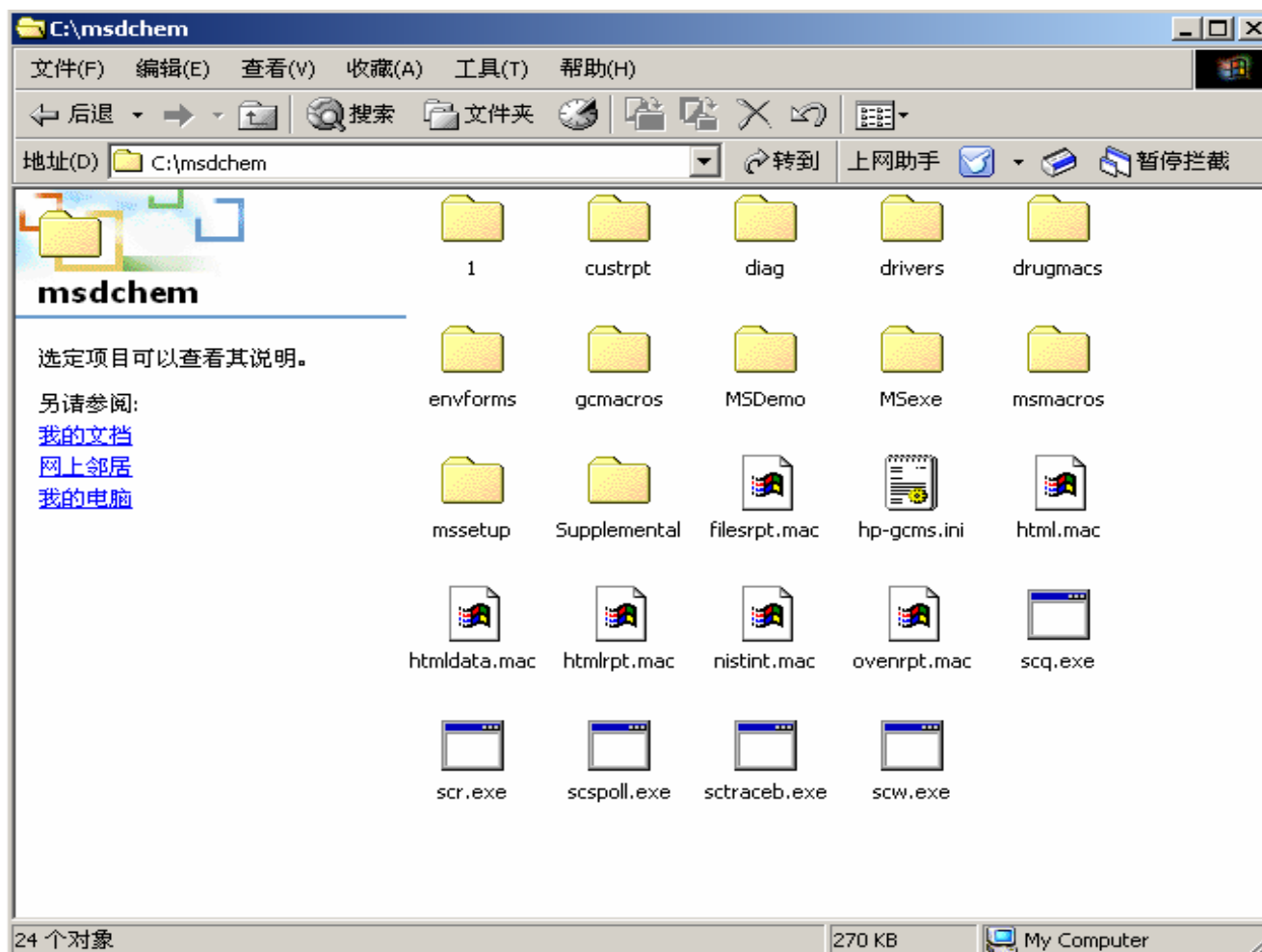
Parametric Retrival 参数检索窗口



用于反向检索、结构库编辑等



化学工作站文件夹





普通维护建议

- 了解待测样品的含量，尽量减少进样量。如果全部未知，最好先摸索色谱条件。
- 避免用大孔径柱
- 避免用厚液膜柱
- 用检测性能的标样检查系统性能
- 定期进行预防性保养，减少维修次数
- 保留仪器维护档案

送样要求



- 样品要求溶解在**有机溶剂**（如丙酮、正己烷等）中
- 样品中**不能含有水，盐类**等物质。
- GC所能直接分离的样品应是**可挥发的、且是热稳定**的，沸点一般不超过**500℃**，分子量小于**500**。
- 需要进行**衍生化**处理的样品，请处理好再送样。
- 样品含量在**ppb-ppm**级，样品不得少于**20 uL**。
- 提前**两天**预约实验。



谢 谢!

fancyhan@email.ustc.edu.cn

3607335