

## 色谱-质谱联用技术

色谱法（chromatography）是一种重要的分离分析方法，广泛地应用于复杂混合物的分离分析。虽然它可以将有数百种组分的混合物分离，但却难以确定每种组分的结构，故需要其他结构鉴定方法，如质谱（MS）、傅里叶变换红外光谱（FTIR）、核磁共振波谱（NMR）等作为色谱的检测技术。目前有多种在线联用方法，如气相色谱-质谱联用（GC-MS）、气相色谱-傅里叶变换红外光谱联用（GC-FTIR）、液相色谱-质谱联用（LC-MS）和液相色谱-核磁共振波谱联用（LC-NMR）等都是强有力的分离分析方法。这里介绍的色谱-质谱联用技术包括气相色谱-质谱联用技术和液相色谱-质谱联用技术，其核心是将色谱的高效分离能力与质谱的精准鉴定能力相结合。该技术在食品与药品安全、环境监测、化工生产的工艺控制和产品质量检验等方面都发挥着重要的作用。

### 第 1 节 气相色谱-质谱联用法测定有机磷混合物

#### 一、目的要求

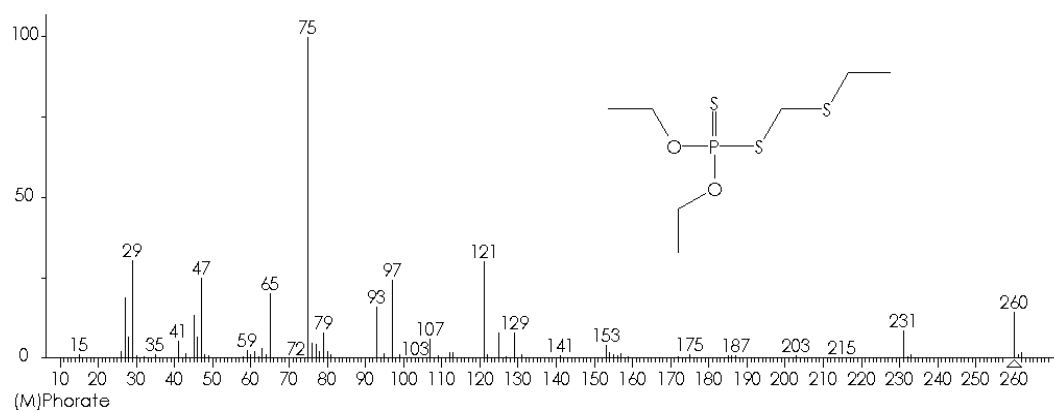
- 1.初步掌握 GC-MS 联用仪的使用方法及相关理论。
- 2.了解 GC-MS 联用对未知化合物进行定性分析的全过程。
- 3.学会用含有内标的标准曲线法求混合物中各组分的含量。

#### 二、方法原理

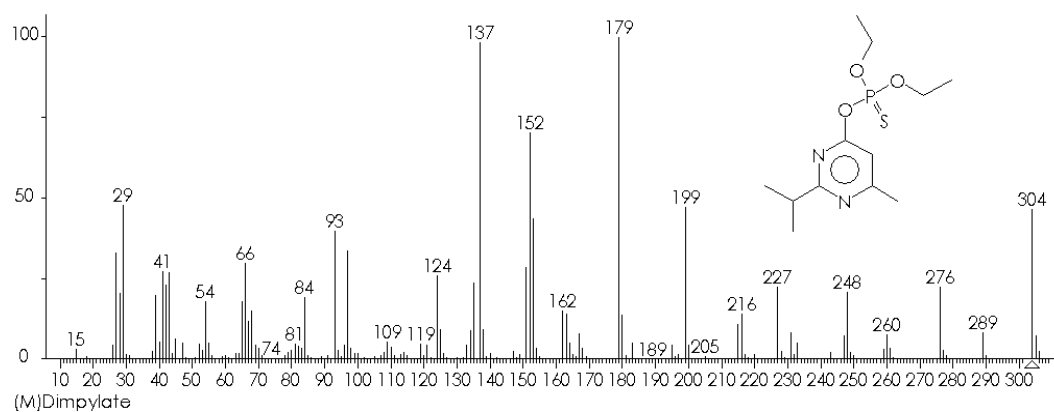
气相色谱作为一种高效分离手段能将混合物中的各组分较好地分离，在完全相同的色谱分析条件下，比较样品和纯组分色谱峰的流出时间可以对色谱峰进行初步的定性；而质谱检测所得到的特征质谱图更可以提供有意义的信息进行定性分析，因此 GC-MS 联用分析对挥发性或半挥发性有机混合物的定性比较可靠。

##### 1. 有机磷的定性分析

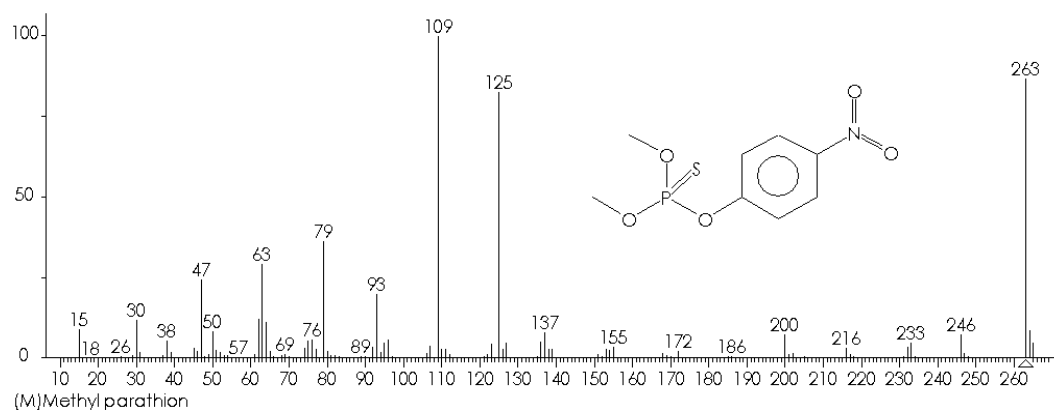
有机磷的名称、结构式、分子量和特征质谱图，如图 1 所示：



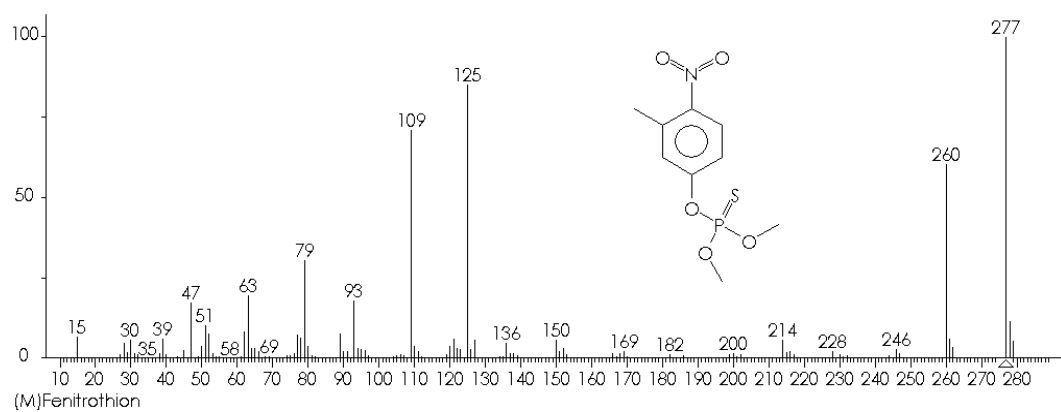
(1) 甲拌磷(Phorate, MW: 260)



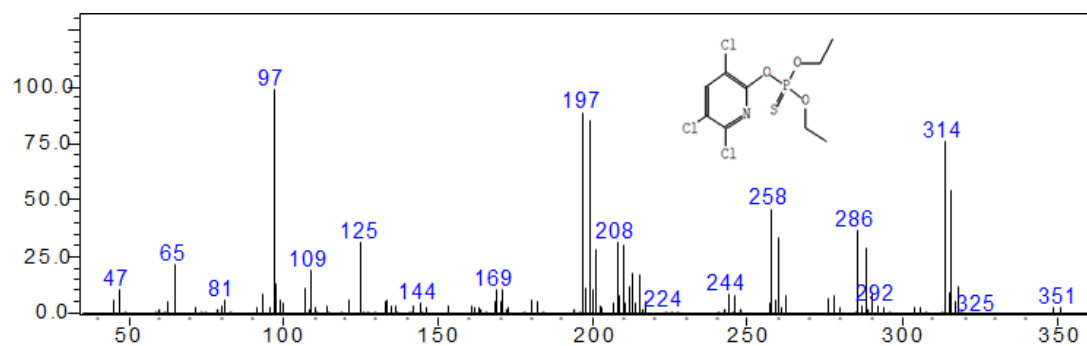
(2) 二嗪磷(diazinon MW: 304)



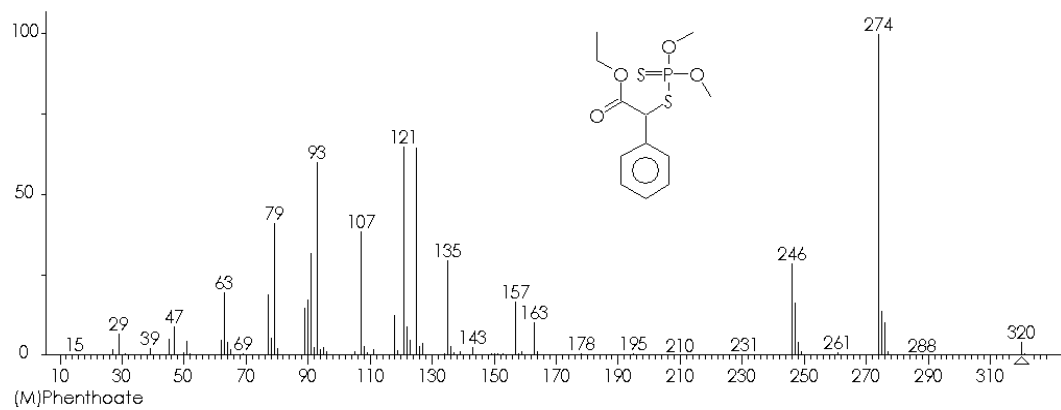
(3) 甲基对硫磷(Methyl-parathion, MW: 263)



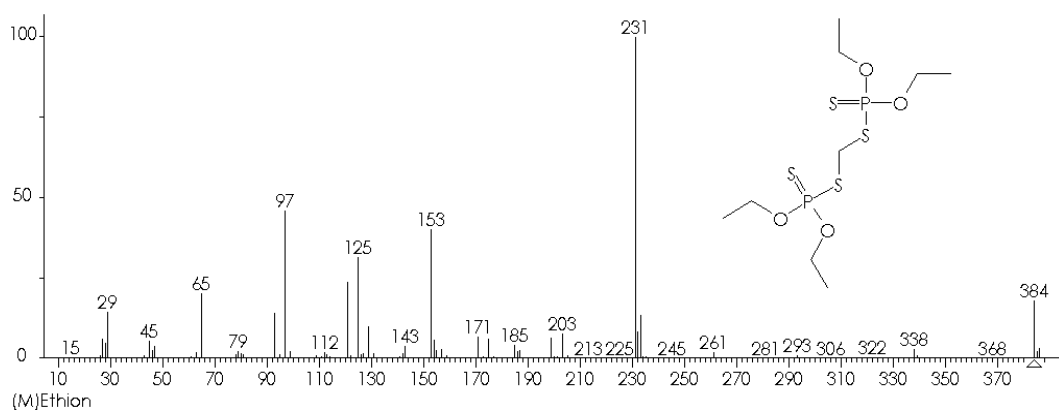
(4) 杀螟硫磷(Fenitrothion, MW: 277)



(5) 毒死蜱(chlorpyrifos, MW: 350)



(6) 稻丰散(Phenthoate, MW: 320)



(7) 乙硫磷(Ethion, MW: 384)

图 1 有机磷的名称、结构式、分子量和特征质谱图

有机磷均含带有氧、硫的含磷基团，在用电子轰击(EI)质谱法分析时，此基团的碎片离子具有较强的稳定性，据此我们可对它们进行定性分析。

## 2. 标准曲线法进行定量分析

为了校正色谱进样体积等引进的误差，实验中采用了内标法。

色谱定量的依据是被测组分的质量与所得总离子流色谱图的峰面积成正比。内标标准曲线法是在不同浓度的标准样品内加入一个已知准确量的物质(称为内标物)，在总离子流色谱图中以分析物与内标物的峰面积比值(y)对分析物与内标物的浓度比值(x)作一元线性回归方程。推导过程如下：

相对质量校正因子

$$f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i/A_i}{W_s/A_s}$$

其中 $W_i$ 、 $A_i$ 分别为标准混合物中i组分的质量和峰面积， $W_s$ 、 $A_s$ 分别为标准混合物中内标物的质量和峰面积， $f_{is}$ 为i组分与内标物相比较的相对质量校正因子。

即

$$f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i/A_i}{W_s/A_s}$$

$$\frac{A_i}{A_s} = \frac{1}{f_{is}} \times \frac{W_i}{W_s}$$

当被测组分与标准样品的进样体积一样时，此式为：

$$\frac{A_i}{A_s} = \frac{1}{f_{is}} \times \frac{W_i/V}{W_s/V} = \frac{1}{f_{is}} \times \frac{C_i}{C_s}$$

即可忽略进样体积带来的误差，总离子流色谱图中分析物与内标物的峰面积

比值和分析物与内标物的浓度比值成正比。

实际测样时在欲测样品中加入与标准样品相同浓度的内标物，以分析物与内标物的峰面积比值  $y$  代入回归方程即可计算分析物的浓度，即：

$$C_i = C_s \times (A_i/A_s) \times f_{is}$$

### 三、仪器与试剂

#### 1. 仪器

气相色谱-质谱仪岛津 GCMS-TQ8040，AOC20i 自动进样器。

#### 2. 试剂

标准混合液：浓度分别为 1.0，2.0，4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的甲拌磷、二嗪磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、稻丰散和乙硫磷混合标液（各浓度均含有浓度为 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  内标物毒死蜱）。样品混合液：毒死蜱内标浓度为 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，样品浓度待测。

### 四、实验步骤

1. 实验前仪器已开机并通过自检处于工作状态。

2. 新建方法文件，设置好仪器条件后保存方法至当天工作文件夹。

#### （1）自动进样器条件

①进样前采用溶剂冲洗微量进样针 1 次；

②进样前采用样品溶液润洗微量进样针 1 次；

③进样后采用溶剂冲洗微量进样针 3 次；

④柱塞速度、柱塞进样速度、进样器进样速度均为高速。

#### （2）气相色谱条件

①色谱柱型：SH-Rxi-5Sil MS，长 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ ；

②载气：高纯氦气；

③无分流进样；

④进样口（气化室）温度：260℃；

⑤升温程序：初始 120℃，保留 0 min；以 40  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 200℃，保留 0 min；再以 1  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 208℃，保留 0 min；再以 20  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 250℃，保留 2 min。

#### （3）质谱条件

①设置 3 min 的延时时间，避免仪器检测溶剂峰；

②设置 Q3 scan 全扫描方式时，从 3 min 至 14.10 min，扫描范围设置 60~400 amu；

③设置 Q3 sim 选择离子检测方式时，在相应的出峰时间范围内，在 3-4 个检测通道设置每种待测物响应灵敏、具有特征质荷比的碎片离子。

④MRM 多反应监测模式采用实验室已优化的程序。

3. 将 3 份标准溶液、1 份样品溶液、溶剂试剂瓶和废液瓶放在自动进样器相应的位置。

#### 4. 定性分析

①加载方法：“实时分析”窗口中的工具栏“文件”里进入，打开全扫描方法文件。

②样品登录：注册样品信息，指定高浓度的标准溶液的瓶号进行分析，预先指定保留分析结果的数据文件名，同时指定调谐文件，否则系统自动调用最近保存的调谐文件。

③点击“待机”，等待仪器自动调试至方法所设置的条件并自动完成进样分析。

④打开数据文件，显示出总离子流色谱图。观察样品的出峰情况，选择所要观察的样品峰，显示其质谱图，点击工具栏中谱图检索图标，通过检索标准谱库的质谱图进行定性分析，确定每一个有机磷色谱峰的保留时间。

#### 5. 定量分析

采用“批处理”方式，“SIM”选择离子监测方法或者“MRM”多反应监测方法，将标准溶液及未知样品溶液顺序进样。

将标准混合液和样品混合液中所有待测物及内标物的峰面积积分，通过公式正确计算样品混合液中待测物的含量。

### 五、思考题

1. GC-MS 联用分析法与一般气相色谱分析法有哪些不同点？
2. 质谱的定性分析是基于什么原理？
3. 化学电离法与电子轰击法比较具有哪些优点？
4. 计算机在近代 GC-MS 分析中起何种作用？

第 2 节 液相色谱-质谱联用法测定饮料中的添加剂

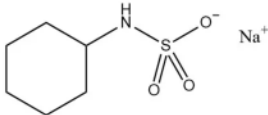
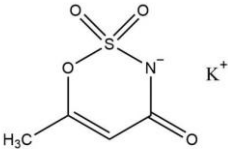
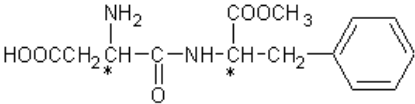
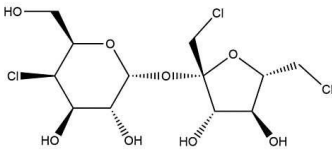
一、 目的要求

- 1.初步掌握 LC-MS 联用仪的使用方法及相关理论。
- 2.了解 LC-MS 联用对未知化合物进行定性分析的全过程。
- 3.学会用标准曲线法求混合物中各组分的含量。

二、 方法原理

常见的食品添加剂有防腐剂苯甲酸及其钠盐、山梨酸及其钾盐、对羟基苯甲酸酯类及其钠盐、脱氢乙酸、脱氢乙酸钠、双乙酸钠、稳定态二氧化氯、单辛酸甘油酯和二甲基二碳酸盐等。常见的化学合成甜味剂有糖精钠、甜蜜素、安赛蜜、三氯蔗糖、阿斯巴甜和阿力甜等。本实验选用四种最常见的甜味剂作为分析的目标物，具体信息如表 1 所示。

表 1 几种甜味剂的基本信息

化合物	分子量	结构式
甜蜜素	201.2	
安赛蜜	201.2	
阿斯巴甜	294.3	
三氯蔗糖	397.6	

若采用负离子扫描检测模式，可以得到以上几个甜味剂的质谱图，如图 1 所示。

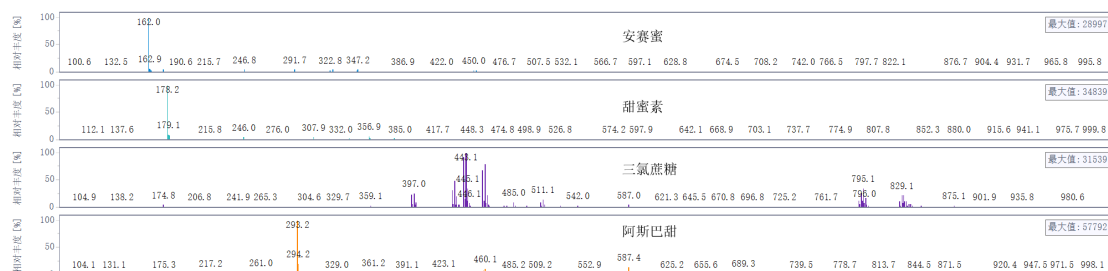


图 2 负离子扫描模式检测甜味剂的质谱图

### 三、仪器与试剂

#### 1. 仪器

安捷伦 1260 Infinity II-MSD，超声波清洗机，电子分析天平。

##### (1) 色谱条件

C<sub>18</sub> 色谱柱（长 150 mm × 内径 2.1 mm，粒径 3 μm）；流动相 C（0.1%甲酸—甲醇溶液）和流动相 D（0.1%甲酸-5 mmol·mL<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液）用等梯度洗脱（40% C，60% D）。流速 0.18 mL·min<sup>-1</sup>；进样体积 3 μL；检测器：紫外检测器，波长 230 nm 和 254 nm。

##### (2) 质谱条件

电喷雾电离，负离子模式（ESI<sup>-</sup>）；雾化气压力 40 psi，干燥气体积流量为 9.8 L·min<sup>-1</sup>；干燥气温度为 250 °C；毛细管电压为 3500 V；选择离子监测（SIM）的负离子模式，分别检测 m/z 162、178、293、397。

#### 2. 试剂

(1) 分析纯安赛蜜、甜蜜素、阿斯巴甜、三氯蔗糖、甲酸铵、甲酸，色谱纯甲醇和超纯水等。

##### (2) 流动相溶液配制

流动相 C：0.1%甲酸—甲醇溶液：取 0.5 mL 甲酸加入 500 mL 甲醇溶液中，混匀。经 0.22 μm 有机系滤膜过滤，待用。

流动相 D：0.1%甲酸-5 mmol·mL<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液：移取 1 mL 甲酸并称量 0.315 g 甲酸铵，用水溶解并稀释至 1000 mL。经 0.22 μm 水系滤膜过滤，待用。

### 四、实验步骤

#### 1. 标准溶液的配制

(1) 各取安赛蜜、甜蜜素、阿斯巴甜和三氯蔗糖 50 mg 置于 10 mL 塑料离



心管中，用色谱纯甲醇定容到 5 mL，配制得到  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的高浓度混合标准储备液。

(2) 将上述标准溶液用纯水稀释到  $6.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $12.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合标准溶液。

## 2. 饮料样品前处理

(1) 试样处理：移液枪移取 1 mL 碳酸饮料试样于 10 mL 离心管中，用超纯水定容至 5 mL。

(2) 试样加标：用移液枪另外移取 1 mL 碳酸饮料试样于另一支 10 mL 离心管中，再加入  $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合标准溶液 200  $\mu\text{L}$ ，用超纯水定容至 5 mL。

(3) 在室温下，两份试样在超声清洗机里超声 5 min 后，分别用针筒抽取 1~2 mL 溶液，过  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  水系滤膜到进样小瓶，备用。

## 3. 上机测试

(1) 将混合标准溶液按浓度由低到高依次进行 HPLC-MS 测试。

(2) 将待测的饮料试样及其加标样进行 HPLC-MS 测试。

## 4. 数据处理

(1) 根据标准物质的质谱信息进行定性分析，得到每一个待测物质的保留时间。根据色谱峰面积做标准曲线。

(2) 积分每一个待测物质的色谱峰面积。对于分离效果不好的物质，积分特征质量色谱图的色谱峰面积。如阿斯巴甜选择  $m/z\ 293$  的色谱峰进行积分，三氯蔗糖选择  $m/z\ 397$  的色谱峰进行积分。

(3) 计算试样中待测组分的浓度以及该方法的加标回收率。

## 五、思考题

1. 对于某一未知的混合样品，如何设计 HPLC-MS 实验步骤，检测出样品的组成及含量信息？

2. 如何衡量样品前处理的准确率？如何计算样品的加标回收率？

3. 比较电喷雾电离 (ESI)、大气压化学电离 (APCI)、大气压光致电离 (APPI) 所适合的化合物极性，并简单解释其工作原理。