

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 色谱法

1.1 概述

色谱法是俄国职务学家 Mikhail S. Tswett（茨维特）在 1901 年首先发现的。他在日内瓦大学研究植物叶子的成分时，用了一根竖直的、内部填充有碳酸钙粉末的玻璃管柱。然后先往色谱柱顶端加入少量浸取过植物叶子的石油醚溶液，混合色素随即被碳酸钙粉末吸附在柱头，再用大量石油醚淋洗。在重力作用下，石油醚携带着色素从上往下流经整个玻璃管柱，由于不同色素组分与碳酸钙的分子作用力不同，在石油醚中的溶解能力也不同，因此经过反复多次的吸附和脱附，橙色的胡萝卜素、黄色的叶黄素、蓝绿色的叶绿素 A 和黄绿色的叶绿素 B 在柱内得到分离，形成不同颜色的谱带，称之为色谱。若继续用石油醚淋洗，石油醚最后将携带不同色素依序流出色谱柱，这时若用分光光度计等仪器进行检测，就可以实现对不同色素的定性和定量分析。上述起分离作用的玻璃管柱称为色谱柱，固定在柱内的碳酸钙称为固定相（stationary phase），沿着柱流动的石油醚称为流动相（mobile phase）。

随着色谱技术的发展，色谱的分析对象不再局限于有色有机物质，已广泛应用到各种有色、无色、有机、无机混合物的分离；分离介质的几何形状也不再

局限于管柱状，还可以有平面。色谱的固定相不再局限于固相吸附剂，还可以用分子聚合物等作为固定相，这类材料在工作温度下为液体，又称为固定液；色谱的流动相也不再局限于液体，还可以用气体和超临界流体。

气相色谱法（gas chromatograph, GC）指的是流动相为气体的色谱分析法。GC 的流动相称为载气。常用的载气有氢气、氮气、氦气，要求不会与固定相和试样中的各组分发生化学反应，其主要作用是将试样带入 GC 系统进行分离，本身对分离结果的影响很有限，故 GC 的分离选择性主要通过不同的固定相来改变。GC 能直接分离的试样应是可挥发且热稳定的，沸点一般不超过 500°C。据有关统计，在目前已知的化合物中，有 15%~20% 可用 GC 直接分析，如天然气中的 CH₄、C₂H₆、C₃H₈ 等烃类组分及 O₂、N₂、CO₂ 等常量气体，环境中的挥发性有机物（VOCs）和多环芳烃（PAHs）等，果蔬中的有机氯、有机磷农药残留等。非挥发性的物质如高分子聚合物需经过高温裂解成可挥发的小分子后才能用气相色谱法分析。

液相色谱法（liquid chromatograph, LC）指的是流动相为液体的色谱分析法。LC 的流动相的种类较多，且与试样中的各组分能发生相互作用，对色谱分离结果的贡献很大。LC 的固定相种类有限，常用的约有十余种，因此 LC 在很大程度上要通过优化流动相的种类及极性来改变分离选择性。LC 能分析的对象很多，包括高沸点、热不稳定性的物质，如生物碱、黄酮类、多糖、多肽等天然产物，防腐剂、色素、甜味剂等食品添加剂，维生素、抗生素、蛋白质等热不稳定化合物，多环芳烃（PAHs）等环境污染物。

对于 GC 和 LC 均能检测的多环芳烃（PAHs）等半挥发性物质，首选气相色谱法进行分析。由于气体的流动性好，导致 GC 能使用更长的色谱柱，具有更好的分离效率。此外，使用气体作为流动相的成本更低，也更环保。

1.2 现代色谱法的基本理论

色谱法有经典色谱法和现代色谱法之分，前者主要指高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）出现以前的常压液相色谱技术，包括经典柱色谱和常规薄层色谱以及纸色谱。经典色谱法主要用于样品制备、纯化，以及实验条件筛选，特别是薄层色谱法在有机合成、化学工业、药物筛选、临床检验和生化分析等领域，常常作为初始分离分析的手段。这里介绍的现代色谱法

的基本理论指的是塔板理论和速率理论，但在学习有关理论之前，先介绍有关柱色谱的一些基本概念。

1.2.1 色谱分离过程

用来完成色谱分离、分析过程的仪器称为色谱仪，色谱仪的一般工作流程如图 1 所示。



图 1 色谱仪工作流程图

以气相色谱仪为例，当试样进入进样装置后，载气从进样装置经过时，将携带着试样进入色谱柱，试样中的各组分在固定相和流动相之间将反复溶解、挥发或者吸附、脱附，重复次数可达数百、数千甚至数万次，最后试样中的各组分依次流出色谱柱，并被载气携带着进入检测器检测。根据色谱分离机理，色谱分离过程存在分配平衡或吸附平衡。分配系数 $K=C_s/C_m$ ，定义为：在一定温度和压力下达到平衡状态时，组分在固定相中的浓度 C_s 与组分在流动相中的浓度 C_m 的比值。

在色谱分离过程中，试样中各组分与固定相的分子间相互作用力不同，以及试样中各组分在液体流动相中的溶解度不同，这些因素将导致分配系数小的组分在固定相中停留的时间短，先被流动相带出色谱柱；而分配系数大的组分在固定相中停留的时间长，后被流动相带出色谱柱，从而实现各组分的分离。即使两组分在同一固定相上的分配系数只存在微小差别，经过足够多次的反复溶解、挥发或反复吸附、脱附后，也能实现完全分离。如 GC 毛细管柱长可达百米，且固定相种类丰富，具有高效的分离能力。在色谱柱后配备各种性能优越的检测器用来检测流动相中组分的浓度 ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 或单位时间内的组分质量 ($\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$)，色谱又具有分析灵敏度高、选择性好、应用范围广等特点。

1.2.2 色谱流出曲线的特征

经色谱柱分离后，试样中的各组分依次从色谱柱尾流出。以出现在柱尾的组分浓度（或质量流量）为纵坐标，绘制其随时间变化的曲线，可得到色谱流出曲线，又称色谱图。如 0 所示，混合物经过色谱柱分离后，三组分得以分离，每个

色谱峰代表试样中的一个组分。从色谱峰的数目、峰的位置、峰高和峰面积、峰的宽窄以及相邻峰间的距离都可以获得色谱分析的重要信息。

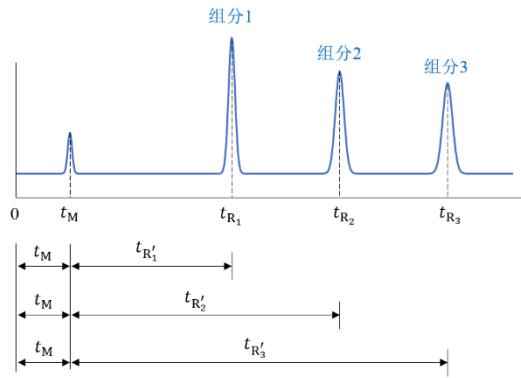


图 2 色谱流出曲线

下面是几个基本的色谱术语：

基线 (baseline): 只有流动相通过检测器时记录的响应信号。

保留时间 (retention time, t_R): 指待测组分从进样到色谱峰出现最大值时所需的时间。

死时间 (dead time, t_M): 指不与固定相作用的组分的保留时间。

调整保留时间 (adjusted retention time, t'_R): 指扣除了死时间的保留时间。

峰宽 (peak width, W): 指通过流出曲线的拐点所作的切线在基线上的截距，如图 3 所示。

峰高 (peak height, h): 色谱峰的顶点与基线之间的垂直距离。

峰面积 (peak area, A): 对一个规则的对称色谱峰，峰面积 $A=1.065\times$ 半峰宽 \times 峰高。

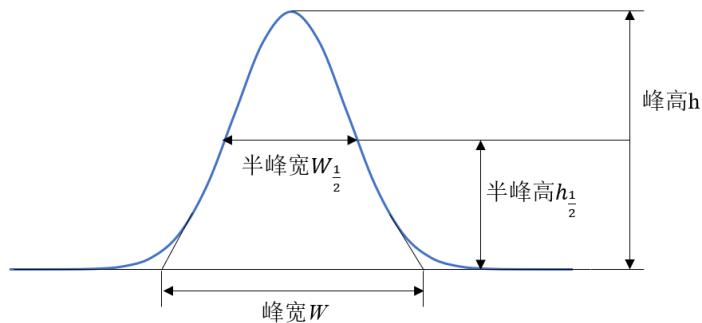


图 3 峰宽和峰高

1.2.3 色谱柱效能

色谱柱的效能常采用一对难分离的组分的分离情况进行判断。从色谱图可知，当两相邻组分的保留时间相隔越远，色谱峰的峰宽越窄，两组分就越可能分离，也就能说明色谱柱的分离效果越好。色谱峰的保留时间是由色谱过程的热力学因素控制，即由组分在两相的分配系数决定的。色谱峰的峰宽则由色谱过程的动力学因素控制。因此，两组分的分离既需考虑热力学因素，又需考虑动力学因素。下面以气相色谱为例来介绍塔板理论和速率理论。

一、塔板理论

塔板理论是个半经验的理论，马丁等人将色谱柱比作一个蒸馏塔，塔内有若干想象的塔板，在每个塔板高度间隔内，假设组分在气液两相间能瞬时达到平衡。色谱柱越长，塔板数越多，分离的效果越好。

理论塔板数的计算公式如下所示：

$$n_{\text{理论}} = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

由于死时间定义为不与固定相作用的组分的保留时间，可以认为相同的时间里该组分不与固定相作用，不参与两相的分配平衡，因此引用保留时间计算得到的理论塔板数并不能真实反映色谱柱分离性能的好坏。实际应用过程中，采用有效塔板数来衡量色谱柱的效能，计算公式如下所示：

$$n_{\text{有效}} = 16 \left(\frac{t'_R}{w} \right)^2$$

用塔板数表示色谱柱的效能时，必须说明是用哪种物质进行计算的，因为不同物质在同一色谱柱上得到的保留时间或调整保留时间不同。

二、速率理论

速率理论是由范·第姆特等人在总结前人研究成果的基础上提出的，其核心是速率方程（即范·第姆特方程）。该方程对色谱分离过程中引起色谱峰展宽的动力学因素进行了归纳，计算公式如下所示：

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

式中 u 为载气的线速度， H 为理论塔板高度。 A 为涡流扩散项， B/u 为分子扩散项（即纵向扩散项）， Cu 为传质阻力项。

组分在色谱柱内运行的多途径，浓度梯度造成的分子扩散和组分在两相质量

的传递不能瞬间达到平衡，是造成色谱峰的峰宽变宽，影响色谱柱效能的动力学因素。

此外，需注意的是，连接管线和接头等柱外效应对色谱峰的展宽也有较大的影响。

1.2.4 分离度

分离度可以用来判断一对难分离组分的分离情况。分离度 R 等于相邻两色谱峰的保留时间之差与两色谱峰的平均峰宽的比值。若两色谱峰的峰形对称，当 $R=1.5$ 时，两峰分离程度可达 99.7%，可以认为两峰完全分离。

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\frac{W_2 + W_1}{2}} = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_2 + W_1}$$

1.2.5 定性分析

定性分析就是通过确定色谱图中各个色谱峰的归属来确定试样中的各个组分是什么物质。色谱-质谱联用技术不但可以利用保留时间进行定性，还可以利用物质特征的质谱图进行定性。

1.2.6 定量分析

色谱分析中的定量分析就是通过色谱图中色谱峰的峰高或峰面积来确定试样中各组分的含量。色谱分析中常用的定量分析方法有归一化法、内标法、标准曲线法、标准加入法。按测量参数分，又可以分为峰高法和峰面积法。这些定量分析方法各有优缺点和使用范围，实际应用时需注意选择。

一、峰高法和峰面积法的选择

在气相色谱分析中，实现物质定量的仪器参数是峰高或峰面积。对于热导检测器、电子捕获检测器等浓度敏感型检测器，当进样量相同，载气流速改变时，色谱峰的峰高在一定范围内基本不变，适用于峰高定量。对于火焰离子化检测器、质谱检测器等质量敏感型检测器，当进样量相同，载气流速改变时，色谱峰的峰面积在一定范围内基本不变，适用于峰面积定量。

在液相色谱分析中，一般采用峰面积进行定量分析。当色谱峰因柱效、流动相组成或离子抑制效应等出现拖尾或前沿峰，峰面积法对非对称峰的定量更准确。

现代色谱仪自带的色谱工作站能快速对各类对称或不对称色谱峰的峰面积和峰高进行计算。

二、校正因子

响应值指的是组分通过检测器时所产生的信号强度。由于试样中每一组分都具有独特的物理化学性质，因此即便用同一个检测器，对相同质量不同组分的响应值也是不同的。为了得到可靠的定量分析结果，引入了“校正因子”这一概念。

(一) 绝对校正因子

取一定量(或一定浓度)的*i*组分作色谱分析，准确测量色谱峰的峰面积(或峰高)，可计算出绝对校正因子 f_i ，计算公式如下所示：

$$f_i = \frac{m_i}{A_i} \text{ 或 } f_i = \frac{c_i}{h_i}$$

式中， A_i 和 h_i 分别为*i*组分的峰面积和峰高， m_i 和 c_i 分别为*i*组分的质量和浓度。

绝对校正因子的大小主要由仪器的灵敏度决定。随着仪器使用时间和操作条件的改变，即使用同一个检测器，灵敏度也会发生改变，因此引入“相对校正因子”。

(二) 相对校正因子

相对校正因子 f_{is} 是*i*组分与基准物质s的绝对校正因子的比值，计算公式如下：

$$f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{m_i A_s}{m_s A_i} \text{ 或 } f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{c_i h_s}{c_s h_i}$$

式中， A_i 和 h_i 分别为*i*组分的峰面积和峰高， m_i 和 c_i 分别为*i*组分的质量和浓度。 A_s 和 h_s 分别为s组分的峰面积和峰高， m_s 和 c_s 分别为s组分的质量和浓度。

准确配制一定浓度含有*i*组分和基准物质s的标准溶液，取准确体积的试样溶液进行色谱分析，就可以计算出*i*组分相对于基准物质s的相对校正因子 f_{is} 。

三、归一化法

归一化法是将所有出峰组分的含量之和按100%计的定量分析方法。各组分含量的计算公式如下：

$$w_i = \frac{f_i A_i}{\sum_{i=1}^n (f_i A_i)} \times 100\%$$

式中， w_i 、 f_i 、 A_i 分别表示试样中各组分的含量、相对校正因子和峰面积。

当试样中各组分的校正因子相同，则计算公式可简化为：

$$w_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n (A_i)} \times 100\%$$

归一化法的操作简单，一次进样就可以得到多个组分的定量结果，对进样量和色谱条件的稳定性要求不高，适用于植物挥发油等多组分的同时测定，但要求试样中所有组分都要能产生可测量的色谱峰。

四、内标法

内标法是往试样中引入一种或多种内标物进行定量分析的方法。加入的内标物需满足以下几个条件：①是试样中不存在的纯物质；②物理化学性质与待测组分相近；③出峰时间与待测组分相近；④加入量与待测组分的含量接近；⑤已知准确的加入量。例如，人工合成的氘代物质。试样中的内标物与待测组分一起经过或不经过样品前处理后进行色谱分析，根据内标物和试样的质量以及色谱图上待测组分及内标物的峰面积（或峰高），可以计算待测组分的含量。内标法的计算公式如下：

$$w_i = \frac{m_s f_{is} A_i}{m_{\text{试样}} A_s} \times 100\% \quad \text{或} \quad w_i = \frac{m_s f_{is} h_i}{m_{\text{试样}} h_s} \times 100\%$$

式中， w_i 、 A_i 、 h_i 、 f_{is} 分别表示试样中 i 组分的含量、峰面积、峰高以及相对内标物 s 的相对校正因子； m_s 、 A_s 、 h_s 分别表示内标物 s 的质量、峰面积和峰高； $m_{\text{试样}}$ 表示试样的质量。

f_{is} 可以通过色谱分析含有待测组分 i 和内标物 s 的标准溶液获得。采用不同浓度的标准溶液分析得到的 f_{is} 存在一定差异，为了获得在一定浓度范围内相对准确的相对校正因子 f_{is} ，可以配制一系列含有不同浓度待测组分和固定浓度内标物的标准溶液，即待测组分的浓度 C_i 不同，内标物的浓度 C_s 相同。色谱分析后，以 A_i/A_s 对 C_i/C_s 作图，可以得到一条内标标准曲线，斜率为 $1/f_{is}$ 。公式推导如下：

整理 $f_{is} = \frac{m_i A_s}{m_s A_i}$ ，可得

$$\frac{A_i}{A_s} = \frac{1}{f_{is}} \cdot \frac{m_i}{m_s}$$

由于待测组分与内标物的进样体积 V 一样，可得

$$\frac{A_i}{A_s} = \frac{1}{f_{is}} \cdot \frac{m_i/V}{m_s/V} = \frac{1}{f_{is}} \cdot \frac{c_i}{c_s}$$

分析试样时，将待测组分和内标物的峰面积比值 A_i/A_s 代入内标标准曲线的线性回归方程，可以得到试样的 C_i/C_s ，又由于加入试样中内标物的量已知，由此可以快速计算得到试样中待测组分的含量。

若试样溶液中内标物的浓度与标准溶液中内标物的浓度相同，则可以 A_i/A_s 对 C_i 作图，计算更加简单。

内标法的优点是定量准确，进样量以及色谱仪器的微小变化对定量结果影响不大，特别是在样品前处理（如浓缩、萃取、衍生化等）前加入内标物，再进行样品前处理，可以部分补偿待测组分在样品前处理过程中的损失。若要获得很高精度的实验结果时，可以加入数种内标物，以提高定量分析的准确度。内标法适用于复杂体系中待测组分的分析，但找到合适的内标物是比较困难的。

五、标准曲线法和标准加入法

色谱分析中的标准曲线法和标准加入法的应用与电分析化学类似。

相对于内标法，色谱分析中的标准曲线法也称为外标法。外标法操作简单，但要求分析试样时的进样量和色谱条件与分析系列标准溶液时严格一致，适用于工厂控制分析和自动分析。

标准加入法一般在难以找到合适内标物时使用，且对进样量和色谱仪的稳定性有严格要求。

第 2 节 质谱法

2.1 概述

质谱法 (mass spectrometry, MS) 是一种能对物质进行精确定性定量的分析方法。1910 年，英国物理学家汤姆逊发明了第一台抛物线质谱仪，利用电场和磁场分离离子，并于 1913 年发现了氖的同位素 ^{20}Ne 和 ^{22}Ne 。1919 年，汤姆逊的学生阿斯顿设计出速度聚焦质谱仪，可显著提高分辨率，由此发现了 200 多种同位素，并获得 1922 年诺贝尔化学奖。1942 年，第一台用于石油分析的商品质谱仪问世。从 20 世纪 60 年代开始，质谱法更加普遍地应用到有机化学和生物化学领域。以有机化合物为研究对象的质谱法称为有机质谱法，它能提供有机物的相

对分子量、分子式、所含结构单元及连接次序等信息，是有机物结构分析的重要工具之一。

2.2 质谱法的基本理论

质谱法是分离和记录离子化的原子或分子的方法。质谱法所使用的仪器称为质谱仪（Mass Spectrometer），一般由进样系统、离子源、质量分析器、检测器和真空系统组成，如图 4 所示。试样通过进样系统引入离子源中，通过特定的方法将气态的试样分子转化为离子，再通过一个加速电场将引入质量分析器，其动能与加速电压及电荷有关，即

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

其中， z 为电荷数，为 e 元电荷 ($e = 1.60 \times 10^{-19}\text{C}$)， U 为加速电压， m 为离子的质量， v 为离子被加速后的运动速度。再通过电场或者磁场将带电离子按质荷比（mass-charge ratio, m/z ）从小到大依次分离，分离后的离子最终在检测器上检测输出信号，所得结果即为质谱图，如图 5 所示。质谱图的纵坐标为离子相对强度，横坐标是离子质荷比，即离子质量 m （以相对原子量单位计）与其所带电荷 z （以电子电荷量为单位计）之比。

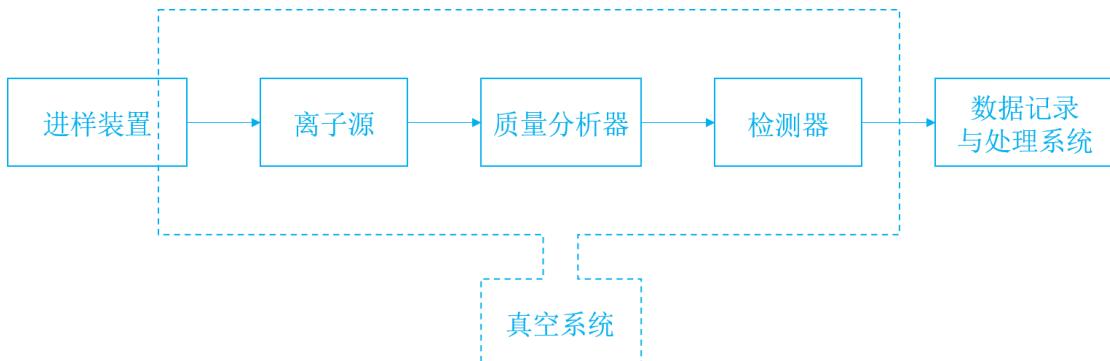


图 4 质谱仪结构示意图

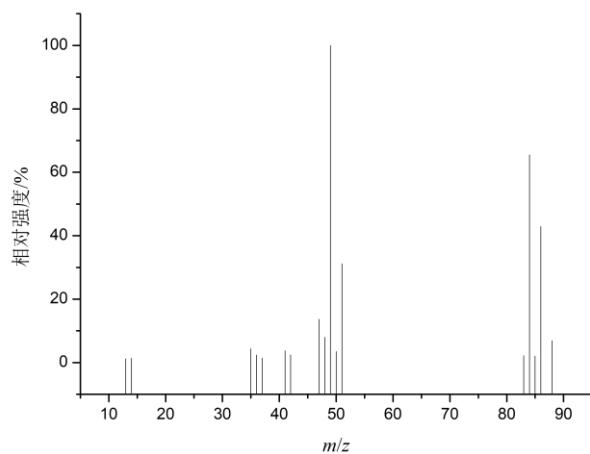


图 5 二氯甲烷的电子轰击质谱

第3节 色谱-质谱联用技术

3.1 概述

色谱-质谱联用技术的发展始于 20 世纪中叶，其核心是将色谱的高效分离能力与质谱的精准鉴定能力结合。色谱仪作为质谱仪的进样装置，质谱仪作为色谱仪的检测器。从定性角度来看，色谱-质谱联用技术比色谱技术具有更强大的定性能力，不但可以利用待测组分的保留时间进行定性，还可以利用待测组分特征的质谱图或特征离子进行定性，具有双重定性的能力。类似“两条直线相交有且只有一个交点”，色谱-质谱联用技术的双重定性能力将获得更高的定性准确度。此外，现代色谱-串联质谱（MS/MS）联用技术还可以实现第三重定性，通过第一级质谱筛选出待分析的母离子，再使选定的母离子进入碰撞室，与惰性气体碰撞后断裂形成子离子和中性碎片，该断裂模式与分子结构直接相关，可进一步提高定性的准确度。从定量角度来看，色谱-质谱联用技术和色谱技术一样，可以利用色谱峰的峰面积或峰高对待测组分进行定量分析。需说明的是，MS 作为 GC 的检测器，GC-MS 实验得到的色谱流出曲线是总离子流色谱图。质谱仪是一种通用型检测器，对大多数物质都具有较好的灵敏度。气相色谱（GC）常用的检测器，如氢火焰离子化检测器（flame ionization detector, FID）和电子捕获检测器（electron capture detector, ECD）都属于选择性检测器，其中 FID 对含碳、氢的有机物，例如苯、甲苯、二甲苯等的检测比较灵敏，ECD 对电负性强的有机物，例如有机氯农药、多溴联苯等的检测比较灵敏。虽然热导池检测器（thermal

conductivity detector, TCD) 也是一种适用于 GC 的通用型检测器，但其灵敏度远不及 MS。高效液相色谱（HPLC）常用的检测器，如紫外-可见吸收检测器（ultraviolet-visible detector, UV-Vis）、光电二极管阵列检测器（photodiode array detector, PDA）和荧光检测器（fluorescence detector, FLD）都属于选择性检测器。虽然示差折光检测器（refractive index detector, RID）属于通用型检测器，但其灵敏度远不及 MS。

1964 年，Bob Finnigan 团队开发出第一台商业化四极杆质谱仪，并于 1968 年推出 GC-MS 的早期原型，标志着 GC-MS 联用技术进入实用阶段。1978 年，Yost 和 Enke 提出三重四极杆设计，更是显著提升了 GC-MS 检测灵敏度和选择性。电喷雾电离（ESI）和大气压化学电离（APCI）等软电离技术的出现，解决了液相色谱(LC)与质谱联用的关键难题。到了 21 世纪，高分辨质谱(如 Orbitrap) 和超高效液相色谱（UHPLC）的联用，使 LC-MS/MS 在蛋白质组学、代谢组学等领域成为核心工具。

3.2 气相色谱-质谱联用技术

气相色谱（GC）和质谱（MS）两种技术的联用具有许多独特的优势，主要表现在：(1) 气相色谱分离和质谱检测过程都是在气态下进行的，因此，质谱法在过去研究中累积下的质谱图可以直接用来检索和比对；(2) 气相色谱分析的化合物的沸点范围适用于质谱分析，气相色谱仪和质谱仪的检测温度匹配，检测灵敏度也相当；(3) GC 毛细管柱的载气流量低，不影响质谱仪的高真空，两台仪器可以很方便地直接联用，不需要复杂的接口设计。因此，在气相色谱仪出现后，气相色谱-质谱联用仪也很快推出面世。

受到 GC 分析条件的限制，GC-MS 只能用来分离分析一些挥发性、半挥发性的物质，且在分析温度范围内，待测组分需具有热稳定性。由于 GC-MS 在复杂体系多组分分析中具有独特的优势，越来越多地应用到国家推荐标准和行业标准。目前已发展的 GC-MS 分析方法主要涉及环境污染监测、食品安全监测、工业制造过程及产品的质量控制、滥用药物检测等领域中多组分挥发性、半挥发性物质的测定。

3.2.1 GC-MS 联用仪

GC-MS 联用仪的仪器结构示意图如图 6 所示，从外观看起来，是一台气相色谱仪和一台质谱仪紧邻相连。GC 作为 MS 特殊的进样器，MS 作为 GC 特殊的检测器，两者之间以可温控加热的传输线相连，使待测组分可以被载气顺利地从 GC 进入 MS。GC 的载气由钢气瓶提供，一般外置在气瓶室，由管路直接连通到 GC；MS 的真空系统由外置的机械泵提供初级真空，内置的涡轮分子泵提供高级真空；仪器控制、数据采集和数据处理都由计算机中的色谱工作站进行控制。试样通过进样口注入进样装置并发生气化，再被载气带入色谱柱进行分离，分离后得到相对纯的待测组分依次进入离子源被电离，再经过质量分析器分离、检测器检测，最后由计算机记录并显示。色谱柱的一端连接 GC 的进样口，另一端接入与 MS 相连的传输线。由于通过毛细管柱的载气流量不大，且质谱仪的真空泵有足够的抽速，因此，毛细管柱可以直接通过接口进入质谱仪，极大地提高了试样的利用率。

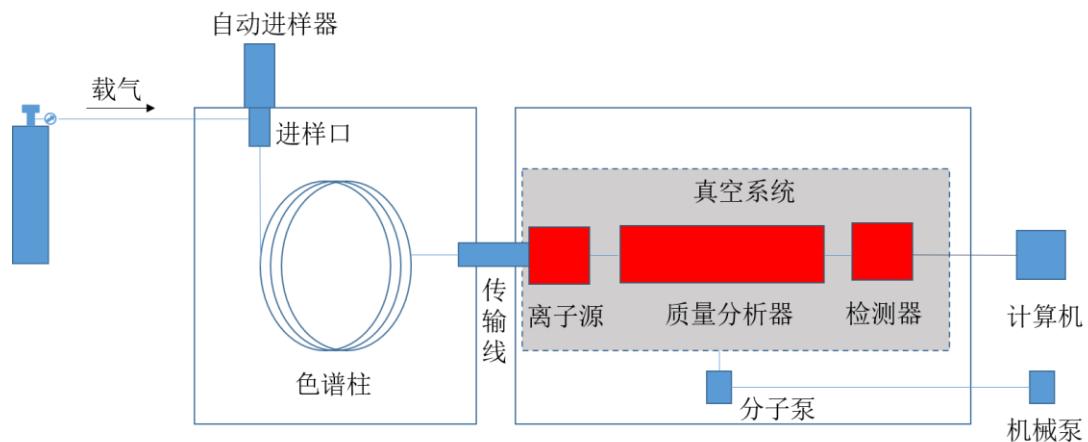


图 6 气相色谱-质谱联用仪的仪器结构示意图

一、载气系统

GC-MS 的载气采用高纯氦气，纯度可达到 99.999%，因其电离能较高，相对分子量较小，离子碎片简单，不干扰待测组分的测定；且易与待测组分分离，对样品有富集作用。

气体由气瓶输送到气相色谱中，需要对压力进行控制方能使用。这就涉及到一系列气体阀件。包括总阀、减压阀、稳压阀、稳流阀、针形阀等。这里主要介绍减压阀。

气瓶上有一个总阀，一个分压阀（减压阀）。总阀逆时针旋转为开的方向，

顺时针旋转为关的方向。减压阀则相反，顺时针为开的方向，逆时针为关的方向。从图 7 减压阀的示意图可以看出，高压气体经总阀进入到减压阀内部后，被减压阀的一个锥形顶板顶住。当旋转手柄顺时针开启减压阀时，实际上工作原理是将进气口的锥形挡板顶开露出一定的缝隙使气体进入减压腔，然后由低压出口出来。开启分压阀后，气体就会进气体过滤装置再进入气相系统中。钢制气瓶满瓶时的压力通常为 15 MPa（约 150 个标准大气压）。分压阀的压力一般为 0.5~0.8 MPa（约 5~8 个标准大气压）。分压超过 1 个标准大气压才有可能使载气远远不断地从色谱柱的柱头流到柱尾，将分离后的试样带入检测器。但压力过低可能影响载气流速稳定性，压力过高又容易损坏流路系统，因此不同的仪器选用多少分压需要详看仪器使用说明书。

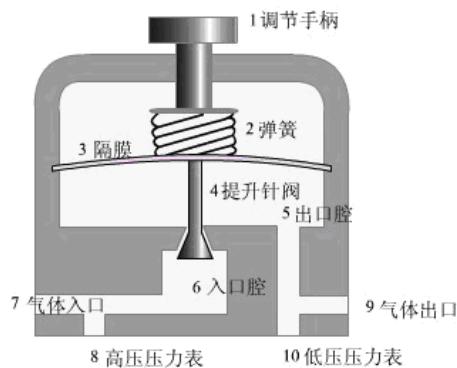


图 7 减压阀结构示意图

尽管 GC 所采用的气体纯度很高，但仍然会有极少量杂质可能对检测结果产生影响。因此在进入气相色谱仪前通常还要进行净化。主要是为了尽可能地去除载气用气中的杂质，包括氧气、水蒸气、二氧化碳、烃类杂质气，以及可能由瓶壁、接头处产生的极微细的颗粒物等。分子筛是人工合成的具有筛选分子作用的水合硅铝酸盐（沸石）或天然沸石，借助于其多孔性及巨大的表面积而净化气体。

二、进样装置

气相色谱的进样装置包括样品引入装置（如注射器和自动进样器）和气化室（进样口）。进样口连接到色谱柱头，其作用是使样品气化，然后通过载气将样品快速“扫入”色谱柱。常见的 GC 进样技术有：填充柱进样口、分流/不分流进样、程序升温气化进样、阀进样，另外还有顶空进样、热解吸进样和固相微萃取进样技术。

GC 进样口要注意几项技术指标：①操作温度范围。一般最高气化温度为 350~420℃，部分仪器配置有程序升温功能。②载气压力和流量设定范围。常见仪器的载气压力范围为 0~100 psi (约 6.8~6.9 个标准大气压)，流量范围在 0~200 mL·min⁻¹。当配置了电子压力控制 (EPC) 后，压力和流量范围更大，如快速 GC 往往需要很大的分流比，载气流量应足够大。③死体积。常见气化的死体积为 0.2~1 mL。气化室的死体积应足够小，以保证样品进入色谱柱的初始谱带尽可能窄，从而减小柱外效应；但死体积太小时，样品气化后体积膨胀引起压力剧烈波动。④惰性。气化室应具有足够的惰性，不对样品产生吸附作用或化学反应，也不能对样品的分解有催化作用。为此，在气化室的不锈钢套管中要插入一个石英玻璃衬管。⑤隔垫吹扫功能。进样隔垫一般为硅橡胶材料制成，会不可避免地含有残留溶剂及低分子寡聚物，且由于气化室高温的影响，硅橡胶会发生部分降解。这些杂质如果进入色谱柱，可能出现鬼峰，影响分析。隔垫吹扫就是消除这一现象的有效方法：小部分载气向上流动，从隔垫下方吹扫过，最后放空；而样品在衬管内气化，不会随隔垫吹扫气流失。⑥毛细管柱进样口还有分流比的设定，通常为 20:1~200:1，快速 GC 分流比通常达到 5000:1 或更高。

分流/不分流进样是最常用的毛细管柱进样口，特点在于气化后的样品由载气全部（不分流模式）或部分（分流模式）“扫入”色谱柱。在分流模式下，载气与样品气体混合后分为两部分：大部分经分流口放空，小部分进入色谱柱（图 8a）。分流进样适用于高浓度样品，能够减少样品的载量，避免色谱柱过载。在样品组分未知的情况下，应采用分流进样，防止色谱柱污染。不分流进样是先将分流阀关闭，让样品全部进入色谱柱；分流阀在预设时间后打开，以清除残留气体，消除溶剂拖尾（图 8b）。其中，优化确定一个预设（不分流）时间是关键。较短的时间（如 0.2 min）能减小拖尾，但信号损失；较长的时间（如 2 min）能增加信号，但拖尾严重。不分流进样的灵敏度明显较高，适用于痕量分析。在实际应用中，分流进样最为普遍，操作简单，但有分流歧视和样品可能分解的问题。只有在分流进样不能满足分析要求时，才考虑使用不分流进样。

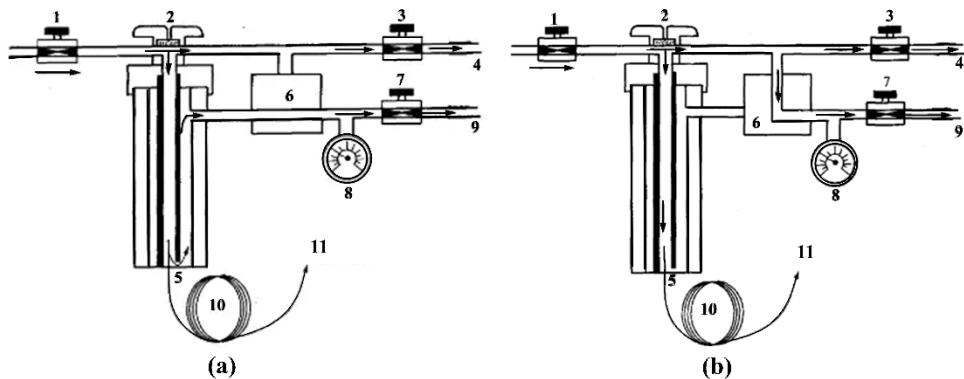


图 8 分流/不分流进样口原理示意图 (a) 分流状态; (b) 不分流状态

1-总流量控制阀；2-进样口；3-隔垫吹扫气调节阀；4-隔垫吹扫气出口；5-分流器；6-分流/不分流电磁阀；7-柱前压调节阀；8-柱前压表；9-分流出口；10-色谱柱，11-接检测器

三、色谱柱

色谱要实现对试样中组分的分离，首先要正确选择色谱柱的固定相，才有实现分离的可能；其次要选择最优的色谱分离条件，使分离变为现实。因此，气相色谱柱是气相色谱仪的核心部件，是实现分离的关键。

(一) 色谱柱的类型

气相色谱柱分为两类，一类柱内填充固定相颗粒，称为填充柱；另一类柱内中空，称为开管柱，其固定相涂覆在色谱柱的内壁上。毛细管柱一般指的是内径不超过 0.53 mm 的色谱柱。由于毛细管柱的分离效率高，目前 GC-MS 的色谱柱一般都用毛细管气相色谱柱。

气相色谱柱中固定相对组分的分离起着决定性的作用，不论是填充柱还是开管柱，柱内使用的固定相可以是固体吸附剂，也可以是液体固定相。

1. 固体固定相

固体固定相是表面具有活性的吸附剂，可以由无机材料或有机高分子聚合物制成。

由无机材料制成的吸附剂有分子筛、氧化铝、碳分子筛、石墨化炭黑等。分子筛是天然或人工合成的铝硅酸盐，具有较大的表面积和较强的极性。例如，5A 分子筛多孔层开管柱（5A PLOT 柱）能用于分离分析 H₂、He、Ne、Ar、CO、NO、O₂、N₂ 等永久性气体。

由有机高分子聚合物制成的吸附剂主要以苯乙烯、二乙烯苯为主体的高分子

聚合物，与含羟基化合物的亲和力极小，适用于水样直接分析。其中，Tenax-TA 是基于 2, 6-二苯基呋喃的多孔型聚合物，广泛应用于气体、液体和固体中的挥发性物质或半挥发性物质的吸附性采集，亦可用于高湿度样品中痕量物质的富集。

2. 液体固定相

液体固定相由载体和固定液组成，分离主要依靠固定液的作用。填充柱的载体是固体颗粒，开管柱的载体是管柱的内壁。

固定液一般是具有高沸点的有机化合物，有其特定的最高使用温度。

硅氧烷是气相色谱中应用最广的一类固定液，具有良好的化学惰性、热稳定性和选择性，但空气、水等物质会影响其稳定性。聚甲基硅氧烷的极性很低，适合分离宽沸点范围的试样。聚甲基乙烯基硅氧烷含有 1% 的乙烯基，可以加强固定液在石英表面的交联，减少高温使用过程中固定液的流失。聚甲基苯基硅氧烷一般含有 4%-75% 的苯基，不同的苯基含量使其具有不同的选择性。氰乙基和氰丙基具有较大的极性，引入后将提高各类聚硅氧烷固定液的极性，调节氰丙基的比率可使固定液具有不同的选择性。

聚醇也是气相色谱中应用较广的一类固定液，可用于含氧、氮、硫、卤化物的分离，但高温、载气中的氧、水都会引起该类固定相分解。

（二）色谱柱的选择

1. 选择固定相

了解目标组分的结构、沸点等物理化学性质，选择与目标组分性质相近的固定相。根据相似相溶原则，分离非极性组分，选用非极性色谱柱；分离极性组分，选用极性色谱柱，目的是为了增强目标组分在色谱柱的保留，防止峰形不好导致的分离度下降。表 1 列出几种常见的不同极性的商品化气相色谱固定相。如 SH-Rxi-5 MS 型色谱柱是弱极性固定相，可以适用于多环芳烃类、氯代烃类、邻苯二甲酸酯类、氯化杀虫剂、有机磷杀虫剂药物、烃类等的 GC-MS 分析，相似固定相的色谱柱还有 HP-5ms, ZB-5ms 等，不同命名是源于不同生产厂家或不同产品系列。由于质谱仪是通用型检测器，可以检测到固定液流失峰，因此可以选择低流失色谱柱，一般标志有 MS 或 ms 的色谱柱。

表 1 几种常见的不同极性的商品化气相色谱固定相

固定相	极性	分离特性	应用	色谱柱
100%二甲基聚 硅氧烷	非极性	按沸点顺序洗 脱	汽油, 溶剂相关	SH-Rxi™-1ms HP-1ms SPB-1 ZB-1ms
5%二苯基		含苯环化合物	香精, 环境相	SH-Rxi™-5MS
/95%二甲基聚 硅氧烷	弱极性	可被苯基基团 保留	关, 芳香族化合 物	HP-5ms SPB-5 ZB-5ms
6%氰丙基苯基 /94%二甲基聚 硅氧烷	中等极性	分离含氧化合 物、同分异构 体等	农药, 多氯联 苯, 含氧化合物	SH-Rtx™-1301 DB-1301, SPB-1301 ZB-624
三氟丙基甲基 聚硅氧烷	中强极性	对卤素化合物 有特异性保留	卤代化合物, 极 性化合物, 溶剂	SH-Rtx™-200MS DB-200
聚乙二醇	强极性	对极性化合物 保留强	极性化合物, 溶 剂, 香料, 脂肪 酸甲酯	SH-Stabilwax™ VF-WAX MS Supelcowax-10 ZB-Wax Plus

2. 选择色谱柱规格

色谱柱固定相确定后需选择色谱柱规格，主要考虑色谱柱的内径、膜厚和长度。

内径 0.1 mm 和 0.18 mm 的色谱柱具有很高分辨率和低载样量，适用于复杂试样的分离分析；内径 0.25 mm 和 0.32 mm 的色谱柱具有高分辨率和适中的载样量，适用于比较复杂试样的分离分析；内径 0.53 mm 的色谱柱一般具有良好的分辨率和较大的载样量，可以做直接进样、柱上进样以及大体积进样等，适用于挥发性、半挥发性合成产品的纯度分析和痕量化合物的分析。

固定相的膜厚大小不一，常用的有 0.18、0.25、0.50、1.00、5.00 μm 等规格。具有厚膜的色谱柱对高浓度组分的分离效果较好；具有薄膜的色谱柱适用于分离沸点较高的物质，薄膜中高沸点的待测组分的洗脱速度更快。

色谱柱越长，分离度越大，价格也越贵。一般毛细管柱的柱长有 10、20、30、60、100 m 等规格。由于分离度 R 与柱长的平方根 \sqrt{L} 成正比，因此当分析温度不

变，色谱柱的长度加倍时，分析时间加倍，但分离度仅增加 41%。

四、离子源

随载气从色谱柱流出的气态待测组分的离子化一般采用电子轰击电离源 (EI) 进行电离。EI 源的灯丝（钨丝或铼丝）经加热后发射出电子，经多级加速后形成高能电子，约 70 eV，轰击在气态的待测物质上，使之形成具有特征质荷比的分子离子或碎片离子。当高能电子与待测物质接近时，静电排斥力通常使待测物质的分子失去一个电子，因此形成的产物一般带一个单位正电荷。EI 源的效率高且稳定，轰击出的大量碎片离子峰可以提供丰富的结构信息用于待测物质的结构解析，且有大量标准质谱图可以检索，方便对未知物质定性分析。但由于电子轰击电离的能量比较大，一些待测物质不能获得分子离子峰，例如辛烷等物质。

GC-MS 联用仪根据需要还可以在 EI 基础上再配制化学电离源 (CI)。CI 源和 EI 源的区别在于 CI 源在工作过程中引入了反应气体，例如甲烷、丙烷等。反应气的量比试样的量要大得多，因此，灯丝发射出的电子首先将反应气电离，然后反应气离子与试样分子再进行离子-分子反应，实现试样电离，这样的电离方式作用在试样分子上的能量就比较小，属于一种软电离方式，可以较好地获得准分子离子峰 $(M+1)^+$ ，且质谱峰数少，谱图简单。此外，化学电离源包括正化学电离和负化学电离两种方式，其灵敏度相当，可以根据试样情况进行选择。例如，对于含有很强吸电子基团的试样分子，检测负离子的灵敏度远高于检测正离子的灵敏度。

五、质量分析器

试样电离后得到的具有特征质荷比 (m/z) 的分子离子或者碎片离子在质量分析器中由于所受作用力不同引起运动方向或速度不同导致彼此分离。GC-MS 的质量分析器常配备四极杆、离子阱等质量分析器，虽然这类质量分析器的分辨率较低，但具有结构简单、体积较小、价格便宜、扫描速度快、真空度要求相对较低等优点，适于作为桌面小型质谱仪与 GC 联用，基本满足 GC 流出物的检测需要。

四极杆质量分析器的主要部件为四根电极杆，其大小相同、相互平行且分布均匀、四根杆的分布截面呈现双曲面，如图 9 所示。四极杆又称为四极滤质器，

其功能类似于“离子筛”。相对的两支电极杆连接在一起，施加相同的电压 $+[U + V\cos(\omega t)]$ ，另两支相对的电极杆也连接在一起，施加相同的电压 $-[U + V\cos(\omega t)]$ ，也就是两组极杆电压相反。当待测离子束进入电场后，在交变电场作用下产生了振荡。在四极杆施加一定的电压，形成一定的电场强度和频率，这时只有特定质荷比的离子能顺利通过四极杆间的电场通道达到检测器，其他离子则由于振幅增大而撞到极杆上。从而能够分别检测不同质量的离子。而施加多少的四极杆电压能够检测到多少质量大小的离子，则实验前需要采用标准气体全氟三丁胺（PFTBA）进行校准。

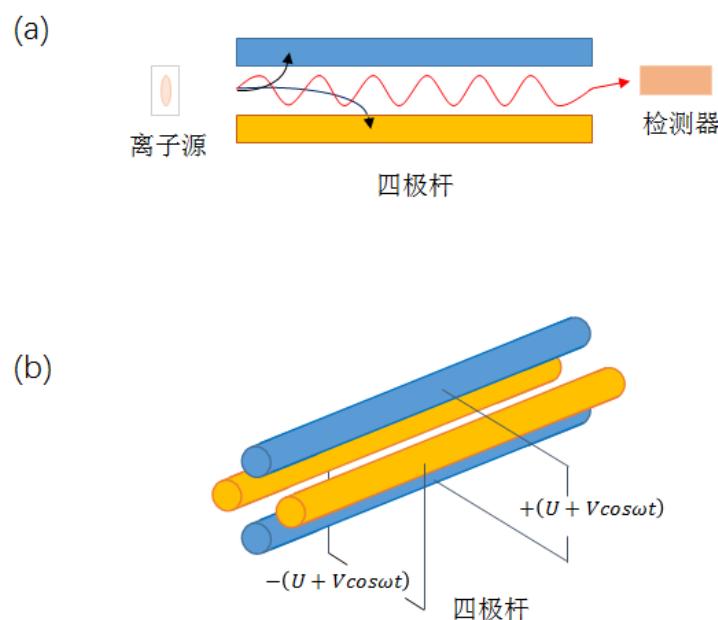


图 9 四极杆质量分析器结构示意图

将几个四极杆串联，则可以形成多重四极杆质量分析器，常用的有三重四极杆，如图 10 所示。第一个四极杆可以用来筛选出特定的母离子，例如分子离子峰；第二个四极杆（现在多数为六极杆或八极杆）并不施加电压，而是作为一个含有气体的碰撞池，例如碰撞气体氩气在这里与从第一个四极杆筛选出来的母离子发生低能碰撞，形成诱导碰撞解离（collision-induced dissociation, CID），形成具有特征质荷比的子离子，子离子进入第三个四极杆后，同样可以在第三个四极杆施加合适的电压扫描或选择检测特定的离子碎片。由于碰撞能量的选择会显著影响子离子检测的灵敏度，是需要优化的实验参数。

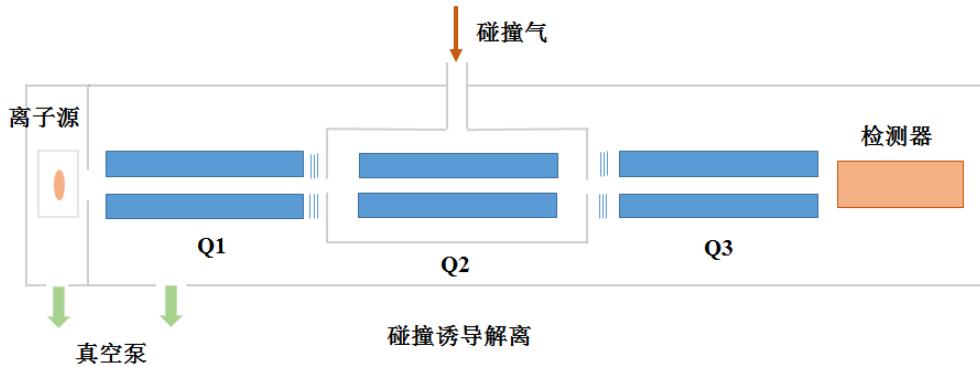


图 10 三重四极杆质量分析器结构示意图

若质量分析器采用三重四极杆，则可以实现全扫描（Full Scan）、选择离子监测（SIM， Selected Ion Monitoring）、多重反应监测（MRM， Multiple Reaction Monitoring）等检测模式，以获得好的定性定量数据。

全扫描模式可以选择 Q3 Scan 模式，此时，Q1 四极杆不工作，所有离子均顺利通过 Q1 四极杆，而 Q3 四极杆的工作模式与单四极杆气相色谱-质谱仪的全扫描模式一致。Q3 Scan 的采集浓度在 $1\sim100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，浓度过低的待测物容易淹没在本底背景中，而浓度过高的待测物则可能导致信号饱和出现一条横线。分析标准溶液时，采用全扫描模式可以获得标准物质的特征质量碎片等重要信息，通过谱库检索可以确定该组分的保留时间。全扫描模式可以获得待测物的特征离子峰，记录并选择几个信号高的碎片离子峰可以用于选择离子监测。

选择离子监测可以选择 Q3 SIM 模式，此时，Q1 四极杆不工作，所有离子均顺利通过 Q1 四极杆，而 Q3 四极杆的工作模式与单四极杆气相色谱-质谱仪的 SIM 模式一致。Q3 SIM 模式检测的灵敏度比 Q3 Scan 高，可以用来分析复杂基质中微量或痕量组分。Q3 SIM 模式中的通道 m/z 可以选择 3~4 个信号强度高的分子离子峰或者碎片离子峰。选用 SIM 检测模式进行定性分析时，需有标准品做辅助判断。

多重反应监测模式可以选择 MRM 模式，同样可以用来分析复杂基质中微量或痕量组分。此时 Q1 四极杆和 Q3 四极杆均采用 SIM 模式。Q1 按质荷比不同分离出所需选择检测离子，该选择离子到 Q2 碰撞室内与氩气撞击后产生特征的碎片离子，这些碎片离子通入 Q3 四极杆后再检测选择碎片离子。由于串联四极杆检测的是碰撞诱导活化的图谱，与常规的质谱图不完全相同，因此，在定性分

析中还需有标准品做辅助判断。

六、检测器

检测器用来采集和放大质量分析器中分离开的离子的信号，常用电子倍增器作为检测器。

当一高能量的带电粒子撞击金属或半导体表面时，二次电子会从表面激发出 来。二次电子在电场的作用下加速继续撞击到金属或半导体表面，释放出更多的 二次电子，经过 12-18 次连续放大后可以释放出足够量的电子，产生的电流也足 够被灵敏的电流前置放大器检测到。常见的电子倍增器有：打拿级电子倍增器 (discrete dynode electron multipliers)、通道电子倍增器 (channel electron multipliers) 和微通道板 (microchannel plates, MCP)。

七、真空系统

为了减少离子在质谱仪中发生离子-分子反应及碰撞，提供试样分子足够的 平均自由程，使试样分子能够顺利通过质量分析器到达检测器，需要对质谱仪抽 真空以减少背景干扰，进而增加检测灵敏度。

GC-MS 的真空系统由机械泵和涡轮分子泵提供，真空一般需要达到 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ Pa。机械泵可以提供高真空泵所需要的前级真空，高真空则可采用双入口 差动式涡轮分子泵排气系统 ($200 \text{ L}\cdot\text{sec}^{-1} + 200 \text{ L}\cdot\text{sec}^{-1}$)，重新启动或恢复真空速 度快。

八、温控系统

GC-MS 的进样口、色谱柱、传输线和离子源均需控制适宜温度。

进样口中气化室的主要功能是使注入的试样瞬时气化，而不同的物质的气化 温度以及热稳定性不同，因此，气化室都配有温度控制装置。气化室温度需足够 高以利于试样气化，但又不能太高而导致试样分解。

色谱柱的温度（简称柱温）是个十分重要的操作参数。所选柱温应低于固定 液的最高使用温度，否则固定液随载气流失，不但影响柱的寿命，而且固定液随 载气进入检测器，将污染检测器。柱温又直接影响分离效能和分析时间。柱温过 高，会使各组分的分配系数变小，保留时间差值减小，分离变差。柱温过低，不 仅传质速率显著降低，柱效能下降，峰形变差，而且会延长分析时间。因此，柱

温的选择应使试样气化后的所有组分均能流出色谱柱，且难分离的两组分达到预期的分离效果，峰形正常而又不太延长分析时间为宜。对沸点范围较宽的试样，宜采用程序升温，即柱温按预定的加热速度，随时间呈线性或非线性地增加。

GC-MS 传输线（Transfer Line）是连接气相色谱柱出口与质谱离子源的关键部件，其核心功能是将经色谱柱分离后的气态组分高效、无损失地导入质谱离子源，确保分析物在传输过程中不发生冷凝或吸附，因此传输线温度的设置需综合考虑色谱柱保护、样品传输效率及仪器性能要求。传输线温度可以与最高柱温相同，该温度既可有效防止高沸点化合物冷凝，又能避免色谱柱过热损伤。

离子源进行温度控制可以保证样品在进入高真空的质量分析器前保持气态。

3.2.2 岛津 GC-MS TQ8040 的操作方法

仪器使用前均需检查仪器使用记录本。

一、开机

①通气：再旋开氦气管路所有开关及氦气瓶，检查载气有 10%以上的钢瓶气保有量，调节减压阀到适当的输出压力（约 0.6~0.8 Mpa），通气 10 min。若使用 MRM 功能，还需旋开氩气管路所有开关及氩气钢瓶，调节减压阀到合适的输出压力（约 0.35~0.45 Mpa）。

②接通电源：检查仪器电路开关、仪器电源插头，依次打开 GC、MS 和计算机电源开关。

③进入工作站：双击实时分析系统 GCMS 实时分析图标，确定仪器硬件配制：点击在 GCMS 实时辅助栏的系统配置，选择并核实仪器已经安装的硬件，包括自动进样器、离子源、直接进样 DI、碰撞诱导解离 CID 等的具体设置。

④启动仪器：进入辅助栏中的真空控制，点击其中的自动启动，则质谱的真空装置开始自动运行。

二、检漏与调谐

质谱抽真空 2 小时以后，等待离子规的高真空读数小于 10^{-3} Pa，再进行仪器的检漏与调谐操作。

①检漏：点击实时辅助栏中的调谐，再打开调谐辅助栏中的峰监测窗，在监视组选择水，空气，画面出现分别对应的水、氮气、氧气的 m/z 值为 18、28、32

三个窗口；先把检测器 Detector 电压调低，设为 0.7 KV 然后点亮灯丝，观测结果。如果氮气的 m/z 28 峰的强度小于水的 m/z 18 的两倍，则认为真空正常；如果 m/z 28 峰比 m/z 18 峰大很多时，则认为空气有泄漏，必须检查。

②自动调谐：仪器在重新启动、变更离子源温度和已经运行很长时间后，为确保质谱仪的质量分析器工作准确，需进行仪器调谐。在检漏完成后，点击调谐辅助栏的自动调谐条件可显示调谐信息窗口，一般按初始化确定为默认值，点击确定。然后点击辅助栏的开始自动调谐，仪器即进入自动调谐状态，需数分钟完成这个过程，调谐完成后页面显示调谐报告，另保存调谐文件。

三、编辑分析方法

分析方法可以在实时的数据采集模块直接编辑再另存方法文件；如果仪器正在运行，则一般在 GCMS 分析编辑器完成方法的编辑。分析方法的设定主要有自动进样器、GC 和 MS 三部分。

自动进样器的设置如图 11 所示。进样前，采用溶剂冲洗进样针数次；再采用样品溶液冲洗进样针数次，若定量分析采用外标法，则需设置冲洗针至少 3 次；进样后，由于进样针会残留样品溶液，则需采用溶剂冲洗进样针至少 3 次以上。



图 11 自动进样器设置

GC 的设置如图 12 所示，设定的重要参数如下：进样口温度、柱箱程序升

温、进样模式（分流、不分流）、柱流量、电子流量控制方式（线速度、压力）、定性定量分析参数等。

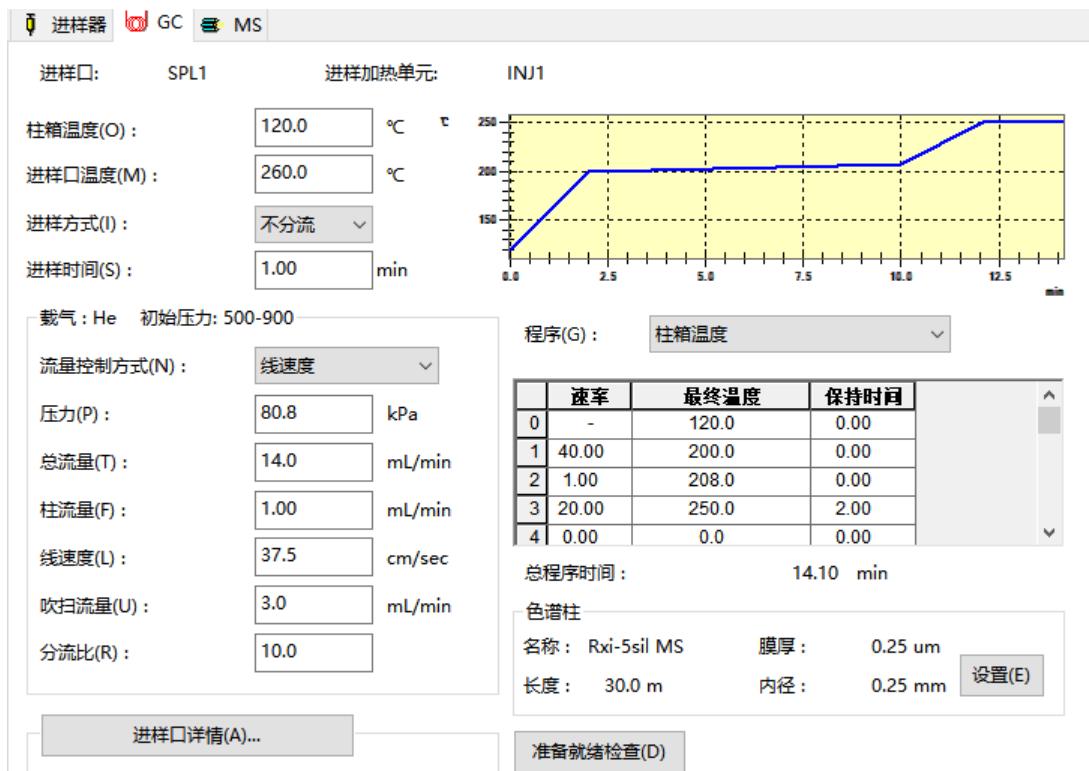


图 12 GC 实验条件设置

MS 中要设定的重要参数有：离子源温度、接口温度、溶剂延迟时间、扫描起止时间、扫描方式 (SCAN、SIM 或 MRM) 及扫描的 m/z 范围 (SCAN) 或 m/z 通道 (SIM 和 MRM) 或碰撞电压 (MRM)，如图 13 所示，方法编辑完毕后保存备用。

四、运行

- ①加载方法：在实时分析的数据采集窗口下通过工具栏的文件，打开方法文件。
- ②样品登录：在自动进样器的相应位置放置溶剂瓶、废液瓶和样品瓶。点击数据采集窗口的样品登录，注册样品信息，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待机和开始运行：点击数据采集窗口的待机，仪器接收到控制指令，并开始调整到准备进样状态。若采用自动进样器，则待系统状态准备完毕后开始自动进样；若采用手动进样，则在进针完后还需立刻点击数据采集窗口的开始，也可以直接按 GC 仪器面板上的 start 键。

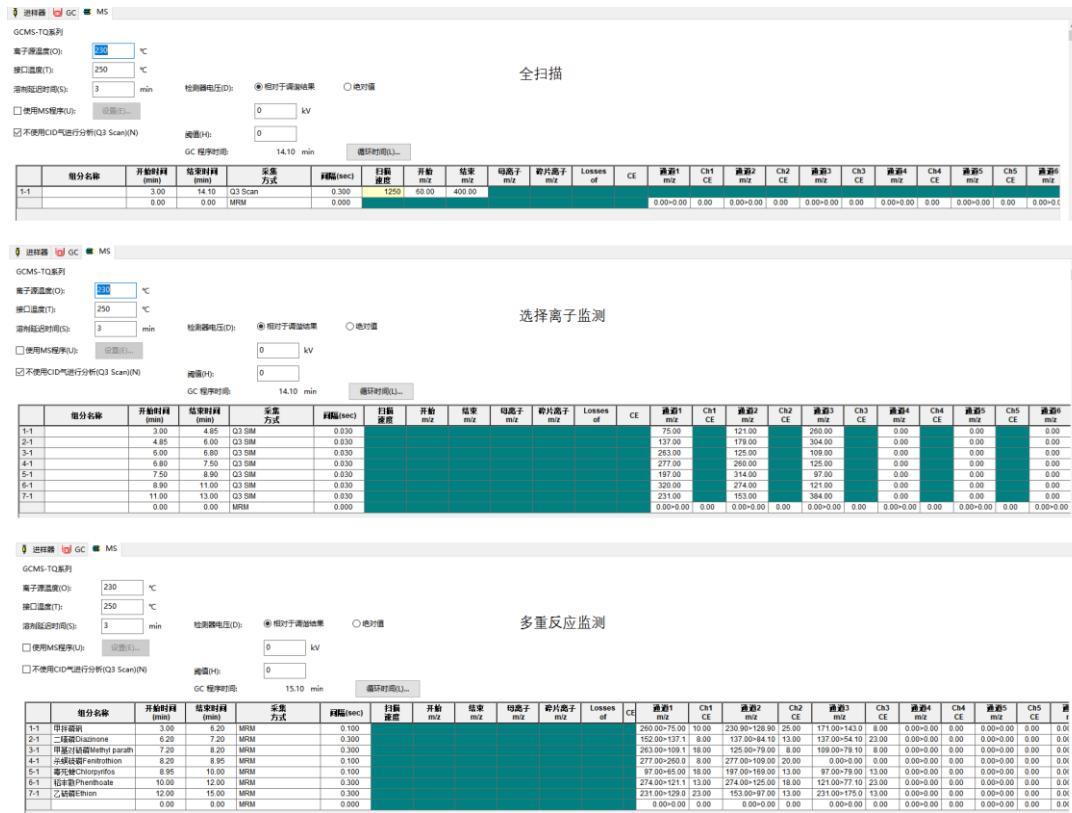


图 13 MS 实验条件设置

五、 数据处理

①打开谱图：打开 GCMS 再解析图标，即可调出需要分析的总离子流色谱图（TIC），双击谱图中某点即出现该保留时间的质谱图（MS），点击鼠标右键的碎片表，设定相应的质量数，即可显示出提取离子色谱图（MC）。

②谱图背景扣除：可以采用点扣除或平均扣除两种方式。

③ 谱库检索

④登记目标化合物

⑤定量分析：制作标准曲线，未知样品的定量分析

六、注意事项

①气相色谱开机前得先通载气，一般使用高纯氦气作载气。

②质谱检测应设置延时时间采样，避免检测溶剂峰。

③采用自动进样器进样前检查微量进样针的位置是否正确。

④分析前,需仔细研究所分析的试样类型,以选择适当的色谱柱及分离条件。

⑤不能直接分析不挥发性物质和在操作条件下易变质的物质。

3.3 液相色谱-质谱联用技术

液相色谱-质谱联用技术 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 将应用范围极广的分离方法——液相色谱法与灵敏、专属、能提供分子量和结构信息的质谱法结合起来，必然成为一种重要的现代分离分析技术。但是，LC-MS 联用的主要困难见表 2。

表 2 LC-MS 联用的主要困难

HPLC	MS
高压液相操作	要求高真空
液体进入离子源变为大量气体	只允许有限的气体进入离子传输系统
质量范围无限制	测定质量取决于 m/z 和质谱仪的类型
常常使用无机盐缓冲剂	需采用挥发性缓冲液

LC-MS 经过了约 30 年的发展，直至采用了大气压离子化技术之后，才发展称为可常规应用的重要分离分析方法。现在，该技术在生物、医药、化工、农药和环境等各个领域中均得到了广泛得应用，在组合化学、蛋白质组学和代谢组学得研究工作中，LC-MS 已经成为了最重要的研究方法之一。

3.3.1 LC-MS 联用仪

无论何种 HPLC 分离模式，其仪器组成基本都是相同的，而且与 GC 的相应部件的作用类似，即由流动相输送系统、进样系统、色谱柱、离子源、质量分析器、检测器、真空系统、数据处理和控制系统等组成，如图 14 所示。

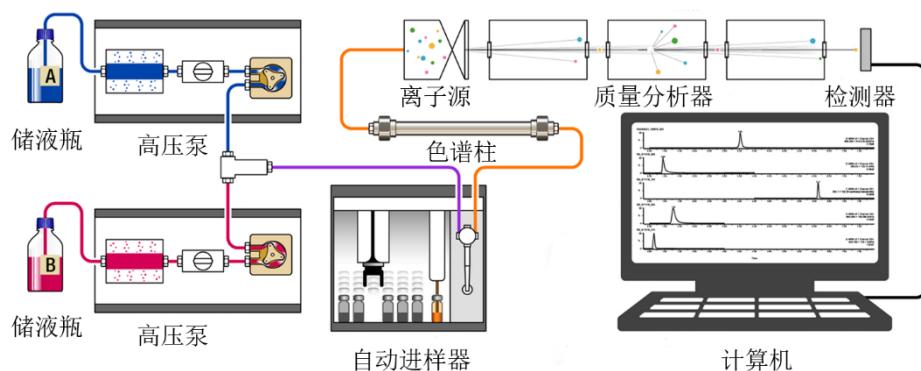


图 14 LC-MS 结构示意图

一、高压输液系统

由于 HPLC 所用固定相的粒度很小 ($3\sim10 \mu\text{m}$)，因此对流动相的阻力极大。

为保持一定的流动相流速，必须配备高压输液系统。该系统一般包括储液瓶、高压输液泵和梯度洗脱装置等。

(一) 流动相

储液瓶用于存放流动相。储液瓶中安装有输液管入口，需带溶剂过滤器，以防止流动相中的固体微粒进入输液系统。

HPLC 分析中使用的液体流动相，对分离有重要的影响。HPLC 对流动相的基本要求是：①纯度高；②与固定相不互溶；③对试样有足够的溶解度；④粘度低，以降低传质阻力，提高柱效；⑤与检测器兼容，以降低背景信号和基线噪声；⑥毒性小，安全性好。与 HPLC 分离过程密切相关的溶剂性质有溶剂强度、溶解度参数和极性参数等。

键合相色谱是目前 HPLC 的主流技术，以溶剂的极性参数和选择性参数（质子接受体、质子给予体和偶极化合物）将溶剂分为八组，如表 3 所示。

表 3 溶剂分类表

组别	代表性溶剂
I	脂肪族醚、三级烷胺、四甲基胍、六甲基磷酰胺
II	脂肪醇
III	吡啶衍生物、四氢呋喃、乙二醇醚、亚砜、酰胺（除甲酰胺外）
IV	乙二醇、苯甲醇、甲酰胺、乙酸
V	二氯甲烷、二氯乙烷
VI	磷酸三甲苯酯、脂肪族酮和酯、聚酯、二氧六环、乙腈
VII	硝基化合物、芳香醚、芳烃、卤代芳烃
VIII	氟代烷醇、间甲基苯酚、氯仿、水

正相键合相色谱中使用的流动相常以己烷为主体，必要时加入能够互溶的改性剂调节选择性，如加入质子接受体溶剂乙醚或甲基叔丁基醚（第 I 组）、质子给予体氯仿（第 VIII 组），或者偶极溶剂二氯甲烷（第 V 组）。反相键合相色谱中使用的流动相常以水为主题，加入能够互溶的改性剂调节选择性，如质子接受体溶剂甲醇（第 II 组）、质子给予体乙腈（第 VI 组），或者偶极溶剂四氢呋喃（第 III 组）。

在 HPLC 分析中，常需要在保持流动相极性参数和洗脱强度不变的情况下，通过改用不同的溶剂来改变选择性，从而优化分离结果。比如，用甲醇-水（40:60）

体系时分析时间比较合适，但分离选择性差，此时可以改用极性参数接近的乙腈-水（46:54）体系或者四氢呋喃-水（33:67）体系。其中极性参数指的是每种溶剂与乙醇、二氧六环和硝基甲烷三种物质互相作用的度量，能较全面地反应了溶剂的性质。HPLC 流动相常用溶剂的性质如表 4 所示。混合溶剂的极性参数是每种组成溶剂的体积分数与极性参数的乘积的总和。此外，在反相 HPLC 分析中有时还要加入改性剂以控制流动相的酸碱度，达到改善色谱峰形，提高分离度的目的。如在分析有机弱酸时，在流动相中加入三氟乙酸（体积分数<1%），可抑制溶质的解离，获得对称的色谱峰。在分析弱碱性化合物时，流动相中加入三乙胺（体积分数<1%），可获得类似的效果。

表 4 HPLC 流动相常用溶剂的性质

溶剂	沸点/°C	紫外吸收截止波长/nm	极性参数
正己烷	69	190	0.1
环己烷	81	200	-0.2
四氯化碳	77	265	1.6
苯	80	280	2.7
甲苯	110	285	2.4
二氯甲烷	40	233	3.1
异丙醇	82	205	3.9
四氢呋喃	66	212	4.0
乙酸乙酯	77	256	4.4
氯仿	61	245	4.1
二氧六环	101	215	4.8
吡啶	115	305	5.3
丙酮	56	330	5.1
乙醇	78	210	4.3
乙腈	82	190	5.8
二甲亚砜	189	168	7.2
甲醇	65	205	5.1
硝基甲烷	101	380	6.0
甲酰胺	210	210	9.6
水	100	180	10.2

(二) 高压输液泵

高压泵是高效液相色谱仪的关键部件，用于完成流动相的输液。对高压泵的基本要求是流量稳定、输液无脉冲，输出压力高，流速可调及耐腐蚀。目前高效液相色谱仪大多采用高性能的恒流式机械柱塞泵。恒流泵有注射泵和往复泵两种。

常规 HPLC 一般采用往复泵，其中泵体由不锈钢制成，活塞则采用蓝宝石杆，并由高压密封圈保持密封，可承受 40 MPa 或更高的压力。活塞泵类似打气筒，但为了活塞泵抽吸流动相时，仍有稳定的流动相输出，一个泵头就需要两个活塞。每个活塞配备两个止逆阀，一个是在活塞排液时阻止流动相回流到储液瓶，另一个是在活塞吸液时阻止已排出的流动相回流。若两个活塞为并联结构，则两个活塞的相位差需为 180°，这样可以抑制流量脉冲。若两个活塞为串联结构，则两个活塞的冲程不同，一般一个活塞一次往复所输送的液体是另一个活塞一次往复所输送液体的两倍，这样通过两活塞间的一个储液装置，就可达到与并联活塞相同的脉冲抑制效果。

注射泵现在多用于流量要求在 $1\sim50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 范围的微型 HPLC 或毛细管柱 HPLC 中。

(三) 梯度洗脱装置

梯度洗脱是将两种或两种以上的不同极性的溶剂，按一定程序连续改变流动相组成流过色谱柱，以达到提高分离效率，缩短分离时间的目的。液相色谱中的梯度洗脱作用与气相色谱中的程序升温类似，用于解决复杂样品中的多组分分离分析。梯度洗脱装置分为常压下混合的外梯度装置(采用一台高压泵和一个溶剂比例阀，如四元梯度洗脱)和高压下混合的内梯度装置(采用二台高压泵，如二元梯度洗脱)。

HPLC 要求流动相中不含有永久气体，因为一旦有气泡进入系统，就会引起压力不稳，检测器噪音增大，分析重现性下降。所以在使用前一定要对流动相进行彻底的脱气处理。离线脱气常用超声波浴，在线脱气则可以擦医用吹氦气鼓泡或真空脱气。

二、进样系统

进样系统要求在不停流和不泄露的情况下，将 $1\sim500 \mu\text{L}$ 的试样准确注入

HPLC 系统，大多采用六通阀进行。手动阀进样时，进样量一般由试样环的大小来控制，也可以由注射器控制（但进样量不能超过试样环的容积）。而自动进样器则往往由计量泵来精确控制进样量。手动阀进样时，需在载样（Load）位置用专用液相色谱注射针将试液从阀进样口注入取样环，然后手动将六通阀转到进样（Inject）位置，使进样环中的试样被流动相带入色谱柱进行分离。自动进样器时，机械手先将所需试样瓶送到取样针下方，取样针伸入试样溶液中，此时计量泵按照设定的进样量将试样抽入试样环中。如果需要还可以从另一个试样瓶中抽取反应试剂，在试样环中与试样混合反应后再分析。取样后移走试样瓶，取样针落下插入底座，同时阀转动，由流动相将试样带入色谱柱进行分离。采用这种进样方式操作简便，重现性非常高。

三、色谱柱

色谱柱是色谱分离的主要部件，它是由耐高压内部抛光的不锈钢管制成，还有少数色谱柱采用 PEEK（聚醚醚酮）制成。常规分析柱的柱长一般为 5~30 cm，柱内径 2.1~4.6 mm。目前 HPLC 色谱柱的主要填料是粒度为 3~5 μm 的高性能多孔硅胶及其化学键合相。由于柱填料颗粒细，分离效率高，因此色谱柱的装填质量直接影响到柱效。为保证色谱柱性能，通常采用商品色谱柱。

HPLC 的固定相主要包括液固吸附色谱固定相、键合相色谱固定相、离子色谱固定相、排阻色谱固定相等。

（一）液固吸附色谱固定相

液固吸附色谱固定相有极性和非极性两类。极性固定相主要是硅胶（酸性）、氧化铝和氧化镁、硅酸镁分子筛等。非极性固定相有多孔微粒活性炭、多孔石墨化炭黑，以及高度交联的苯乙烯-二乙烯苯共聚物的单分散多孔小球和碳多孔小球，粒度一般在 5~40 μm 之间，5~10 μm 粒度的填料最常用。

（二）键合相色谱固定相

键合相色谱基本上属于分配色谱，固定液是以化学键的形式与全多孔球型硅胶等基体结合在一起。在分配色谱中，当固定相的极性大于流动相的极性时，称为正相色谱；当流动相的极性大于固定相的极性时，称为反相色谱。键合工艺不同会造成键合相性能的不同，如表面硅羟基的键合度、表面含碳量、封端情况等。

因此，要获得重现性好的分析结果，最好选择统一频拍甚至同一批号的固定相。表 5 列出常用键合相及其应用范围。离子对色谱则是一种分离离子型化合物的特殊分离模式。采用非极性固定相分离弱极酸或弱碱化合物时，因其在固定相上的保留作用很弱，不易分离，故在流动相中加一种与被分析物极性相反的离子（离子对试剂），使其与被分析物形成缔合物，从而增加保留，提高分离度。

表 5 常用键合相及其应用范围

类型	键合官能团	性质	分离模式	应用范围
烷基 (C ₈ 、C ₁₈)	—(CH ₂) ₇ —CH ₃ —(CH ₂) ₁₇ —CH ₃	非极性	反相、 离子对	中等极性化合物，可溶于水的强极性化合物
苯基 (Phenyl)	—(CH ₂) ₃ —C ₆ H ₅	非极性	反相、 离子对	非极性至中等极性化合物
氨基 (—NH ₂)	—(CH ₂) ₃ —NH ₂	极性	正相、反相、 阴离子交换	正相可分离极性化合物，反相可分离碳水化合物，阴离子交换可分离酚、有机酸和核苷酸
氰基 (—CN)	—(CH ₂) ₃ —CN	极性	正相、反相	正相类似于硅胶吸附剂，适用于分离极性化合物，但比比较的保留弱；反相可提供与非极性固定相不同的选择性
二醇基 (Diol)	—(CH ₂) ₃ —O— CH ₂ —CH(OH)— CH ₂ (OH)	弱极性	正相、反相	比硅胶的极性弱，适用于

(三) 离子色谱固定相

现代离子交换色谱固定相主要有四种类型，如表 6 所示。

表 6 离子色谱固定相及其性能

类型	代表基团	特性
强阳离子交换剂 (SCX)	磺酸基 (—SO ₃ ⁻)	在很宽的 pH 范围内带负电荷
强阴离子交换剂 (SAX)	季胺基 (—N(CH ₃) ⁺)	在很宽的 pH 范围内带正电荷
弱阳离子交换剂 (WCX)	羧酸基 (—CH ₂ COO ⁻)	在较窄的 pH 范围内带负电荷
弱阴离子交换剂 (WAX)	二乙基氨基 (—CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ H ⁺)	在较窄的 pH 范围内带正电荷

(四) 排阻色谱固定相

排阻色谱固定相按照不同的孔径分离不同相对分子质量范围的大分子，一般用凝胶，可分为有机胶和无机胶两类。有机胶有交联葡萄糖、琼脂糖和聚丙烯酰胺等软质凝胶，有交联的苯乙烯-二乙烯苯共聚物，以交联度不同可分为半刚性

凝胶（中等交联度）和刚性凝胶（高度交联）；无机胶则主要是多孔球型硅胶。

四、离子源

随着液体流动相流出色谱柱的试样组分同样需要离子化后才能进行质谱分析。大气压条件下的质谱离子化技术主要包括电喷雾离子化（electrospray ionization, ESI）、大气压化学离子化（atmospheric chemical ionization, APCI）、大气压光离子化（atmospheric pressure photoionization, APPI）和解吸大气压电离（desorption atmospheric pressure ionization, DAPI）等，这里主要介绍应用最为广泛的ESI技术。

ESI过程是将离子从溶液中转移至气相的过程。所以，使待测成分在试样溶液中称为离子状态，可提高生成气相离子的效率，以提高检测灵敏度。如分析有机碱B可以用极性溶剂并加甲酸或乙酸呈酸性，形成 BH^+ ，用正离子方式测定；分析有机酸HA可以在溶液中加氨水使简化，形成 $(\text{A}-\text{H})^-$ ，用负离子方式测定。

ESI技术是在相对低的温度下，逐步去溶剂化，基本过程包括三个步骤：

①在喷雾毛细管尖端产生带电雾滴：用约2~4 kV的电压加于金属毛细管，通常是外径为0.2 mm，内径为0.1 mm的金属管，反电极可以是一具小孔的金属板，或为固定在板上的取样毛细管。当电场作用于金属毛细管，如毛细管为正电极，则正离子移向毛细管尖端处，负离子反向移动。由于液体表面正离子之间的斥力，克服液体的表面张力，因此毛细管尖端的液面扩张，使正电荷和液体进一步前移，形成一锥体，称泰勒（Taylor）锥。如电场足够高，细的喷口从锥体尖端形成并破裂为细的雾滴。若单使用静电场产生的静电喷雾，通常只能在1~5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 或更低的流速下操作，而借助气动或超声等雾化技术，可在较高的流速，如1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下工作，便于与常规HPLC连接。

如用纯水做溶剂，因其表面张力高，故形成泰勒锥和稳定喷雾所需电压高，可能导致放电（尤其是负离子方式），所以，常用水-甲醇（50:50）溶剂。同时，水与甲醇混合，黏度也下降，有利于雾化。

②生成很小的带电雾滴：由锥体喷雾产生的带电雾滴经空气向反电极方向飘移，通入大流量的加热的气体，可以使溶剂快速蒸发，带电雾滴收缩，雾滴表面电荷密度增加。雾滴半径变小而雾滴电荷不变将导致表面上电荷斥力的增加，直至达到Rayleigh稳定限，公式如下所示

$$q_{R_y} = 8\pi(\varepsilon_0 \gamma R^3)^{\frac{1}{2}}$$

当雾滴半径 R 和电荷 q 满足上述 Rayleigh 方程时，静电斥力等于表面张力 γ ，雾滴不再稳定，发生裂解，称之为库仑分裂（coulombic fission）或库仑爆炸（coulombic explosion）。这种分裂不同于细胞分裂，不是一分为二，而是形成细小的喷口，喷出许多小的雾滴。这一过程（溶剂蒸发与雾滴分裂）反复发生，直至生成气相离子，如图 15 所示。

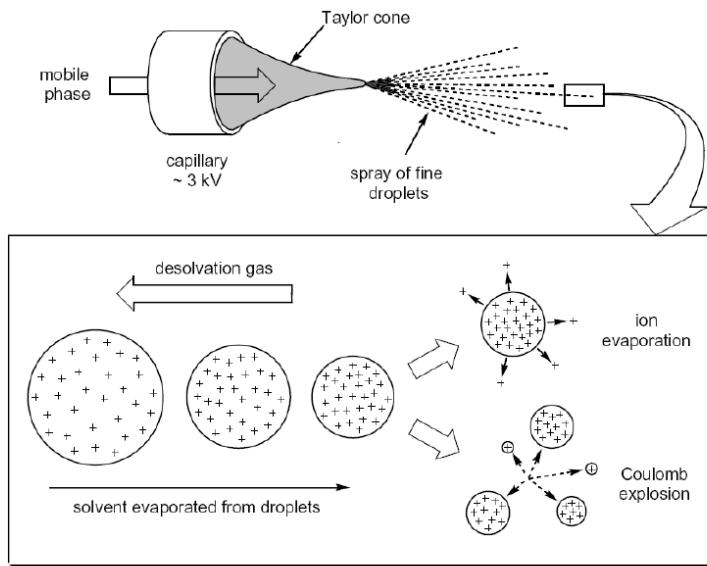


图 15 电喷雾工作原理示意图

采用挥发性溶剂（甲醇、乙腈及其与水的混合物），溶液表面能较低，则溶剂迅速蒸发，易于达到库仑分裂条件。为了提高溶剂蒸发速率，可提高“干燥气”的温度和流速，也可用加热金属毛细管使带电雾滴蒸发，但应注意高温可能造成热不稳定的待测组分分解及不挥发成分堵塞毛细管。

③气相离子的生成：表面活性高（具低溶剂化能）的离子将优先转移至雾滴表面，最终转变为气相离子，故有较高的实验灵敏度。因此，实验过程可以考虑采用表面活性低的缓冲剂，低浓度的挥发性的酸、碱及缓冲盐，用高纯度的溶剂和试剂，以及提前除去试样中的干扰物和盐等。

电喷雾（ESI）离子源适用于一些具有极性的化合物，待测物电离产生的离子不易发生碎裂且能够带上多电荷。因此，即使对于高分子量的样品，也可将质荷比降低到各种不同类型的质量分析器都能检测的程度，非常适用于多肽、蛋白质和寡聚核苷酸的分析检测。

五、质量分析器

与液相色谱相连的质谱仪有四极杆质量仪、飞行时间质谱仪、离子阱质谱仪等。每种质谱仪均有其自身的优点和缺点，因此选用何种仪器，取决于主要应用领域。

3.3.2 安捷伦 1260 Infinity II-MSD LC-MS 的操作方法

一、开机步骤

- ① 若使用氮气发生器，需打开氮气发生器的电源，待压力输出稳定后，调节输出压力为约 0.7 MPa (~100 psi)，并确认前级泵的镇气阀处于关闭状态，如果是 MS40+ 前级泵，没有镇气阀。
- ② 打开计算机，网络交换机（LAN Switch）电源。
- ③ 打开液相各个模块电源。
- ④ 打开质谱仪前面左下角的电源开关，这时可以听到质谱里面溶剂切换阀切换的声音。同时机械泵开始工作，仪器开始自检。等待大约一分钟，听到第二声溶剂阀切换的声音，表示仪器自检完成，可以联机。
- ⑤ 质谱仪一接通电源，前级真空规就开始工作，监视前级真空值。但只有当 Turbo 涡轮泵的转速都大于 95% 之后，四极杆的高真空规才会开始工作，正常读取真空值。质谱仪长时间关机后再开机，建议过夜抽真空平衡仪器，不建议真空度达到要求后就立即调谐和采集样品，因为此时的仪器并没有完全达到一个良好的平衡状态。
- ⑥ 在计算机桌面上双击采集软件图标，进入工作站。

二、方法文件的建立及样品采集:

① 新建一个方法文件，命名，如图 16 所示。

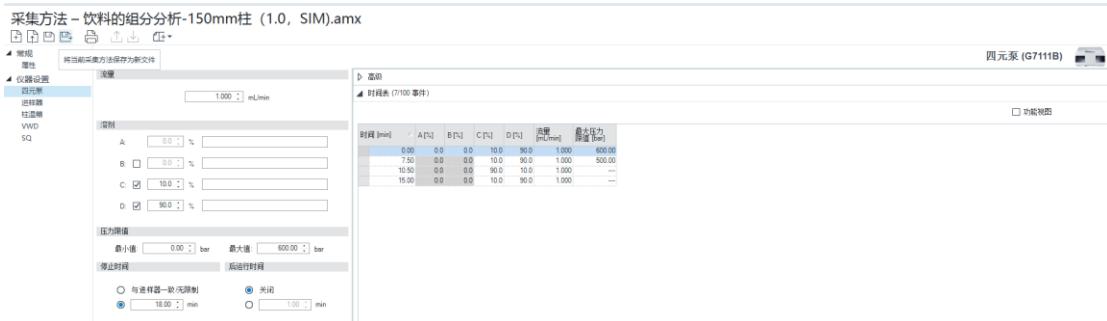


图 16 新建方法文件界面

② 设置四元泵梯度洗脱程序（图 17）。



图 17 四元泵梯度洗脱程序设置界面

③ 设置自动进样器的条件（如 18）。



图 18 自动进样器的条件设置界面

④ 设置柱温（如 19）

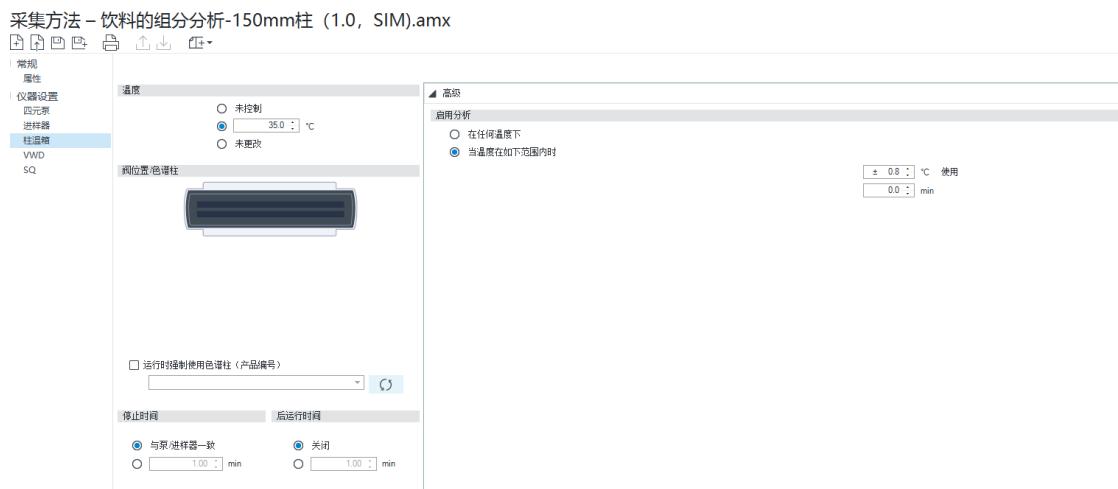


图 19 柱温条件设置界面

⑤ 设置紫外检测器的波长及采集信息（图 20）。

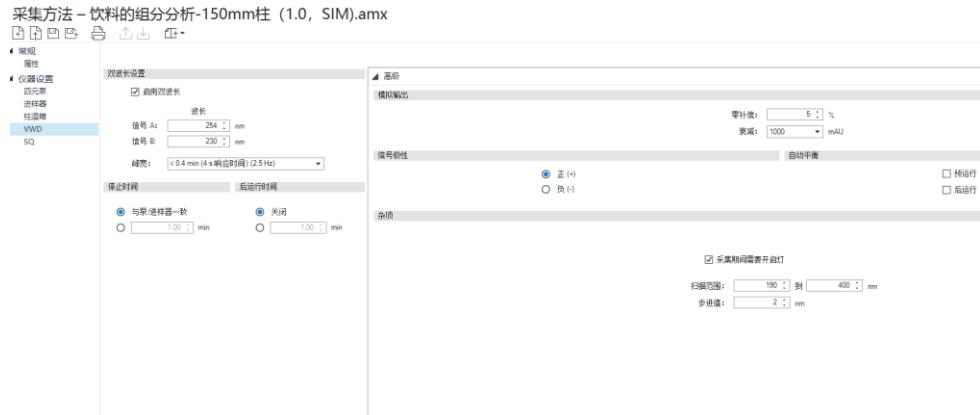


图 20 紫外检测器条件设置界面

⑥ 设置质谱采集的参数（图 21）。



图 21 质谱采集参数设置界面

⑦ 设置质谱离子源的参数（图 22），完成信息设置后保存方法文件。



图 22 质谱离子源参数设置界面

⑧ 若单个样品进样，则编辑样品名称，采集方法，样品瓶号等信息（图 23），及结果路径，点击运行。

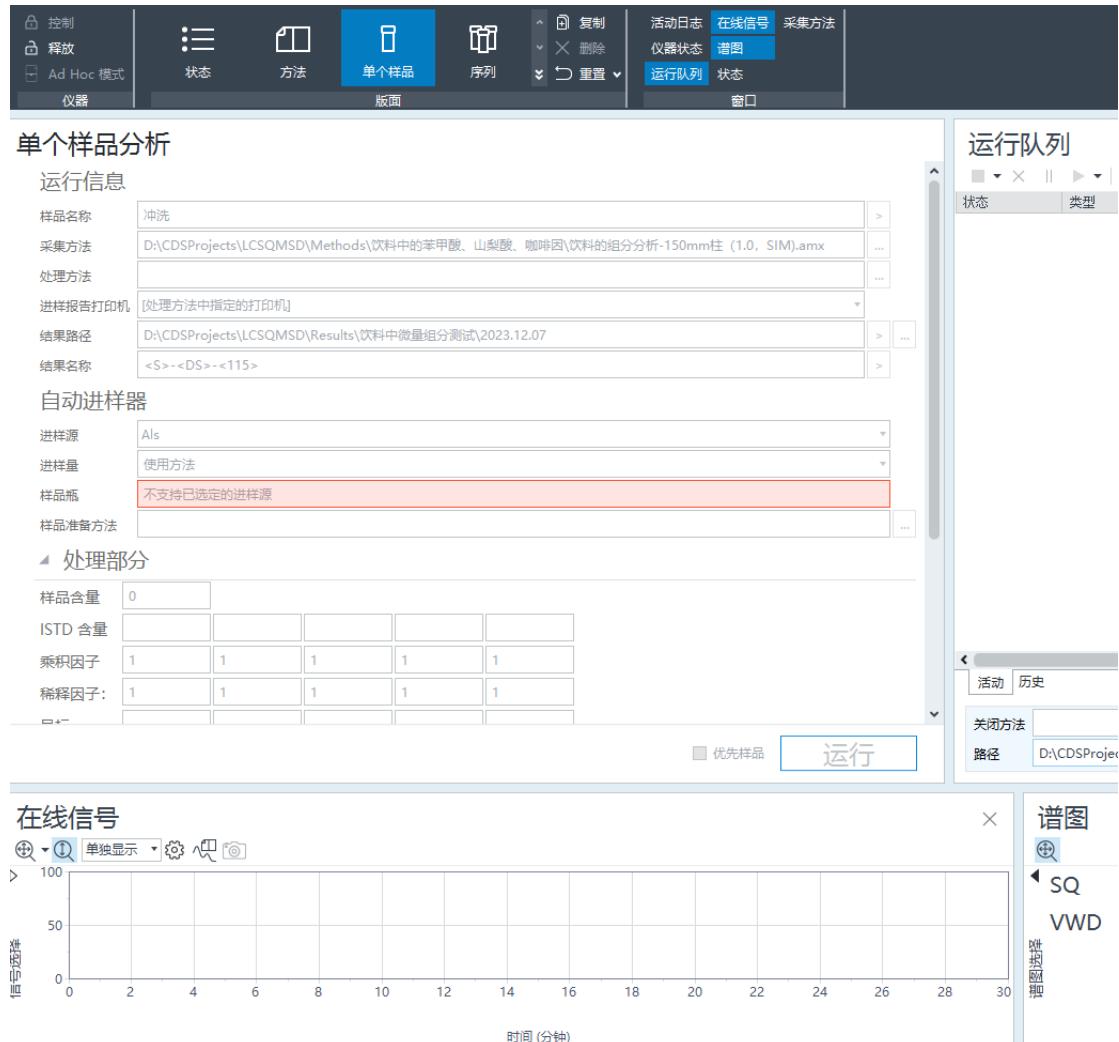


图 23 单个样品进样界面

若序列进样，则编辑采集方法，样品瓶号，样品名称等信息（图 24），及保存的路径，编辑好后放好样品，点击运行。

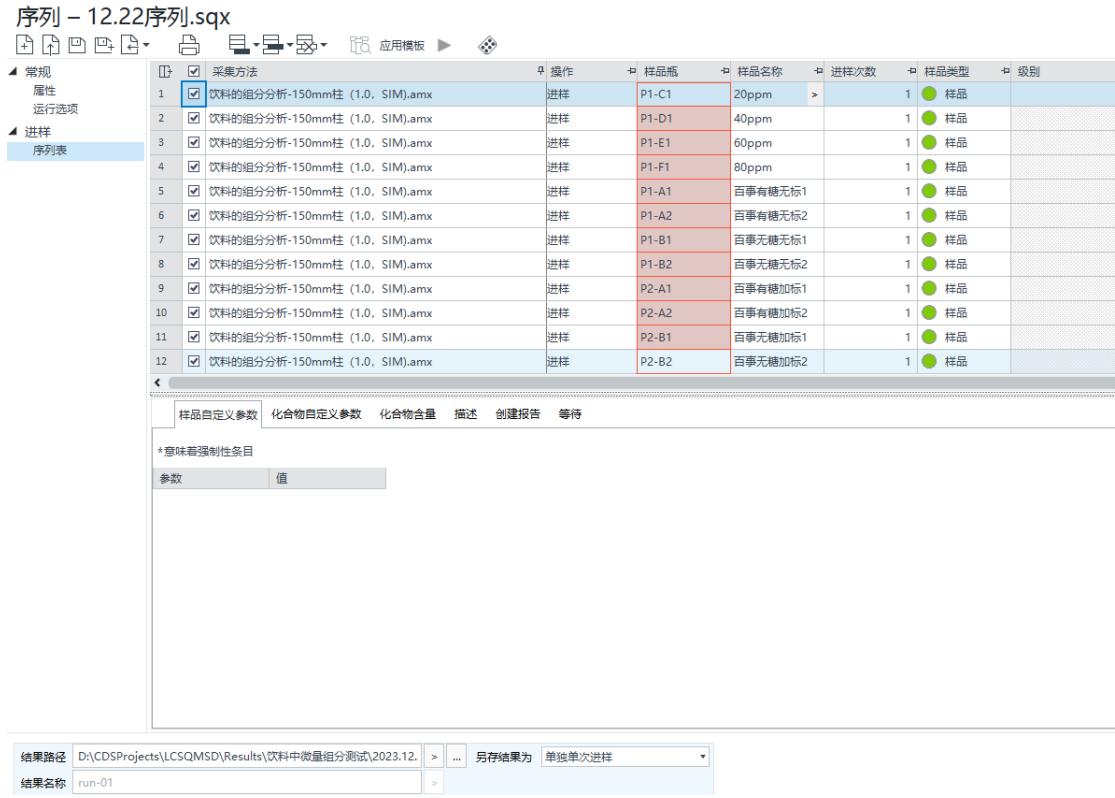


图 24 序列进样界面

三、数据处理

样品名称	顺序编号	进样编号	说明	样品类型	级别
苯甲酸钠标40-2	1	1		样品	
山楂酸标40-2	1	1		样品	
苯甲酸钠40	1	1		样品	
山楂酸标40	1	1		样品	
山楂酸标40-2	1	1		样品	
80	1	1		样品	
20	1	1		样品	
std-03	1	1		样品	
40	1	1		样品	
40	1	1		样品	
3种混合20ppm	2	1		样品	
3种混合10ppm	1	1		样品	

图 25 数据选择界面

③ 勾选已完成的数据，点击调用数据（图 26）。



图 26 调用数据界面

④ 选择最后一个 LC/MS 样品纯度，点击关联且处理（图 27）。

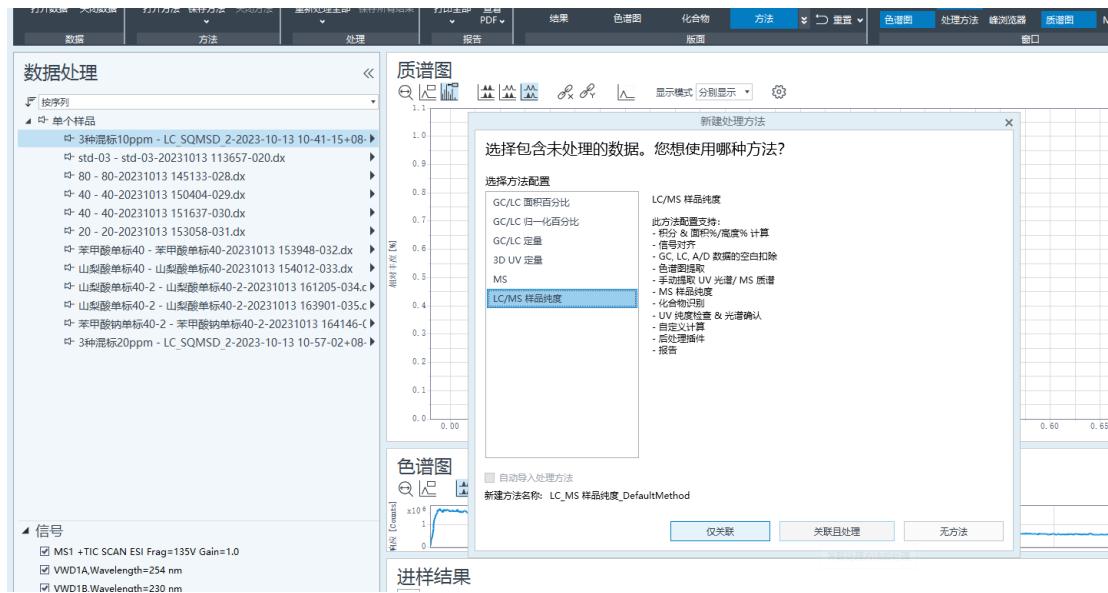


图 27 点击数据处理界面

- ⑤ 选择单个样品数据，信号选择单个 MS1 处理，或者单个 VWD1, VWD2 处理数据（图 28）。

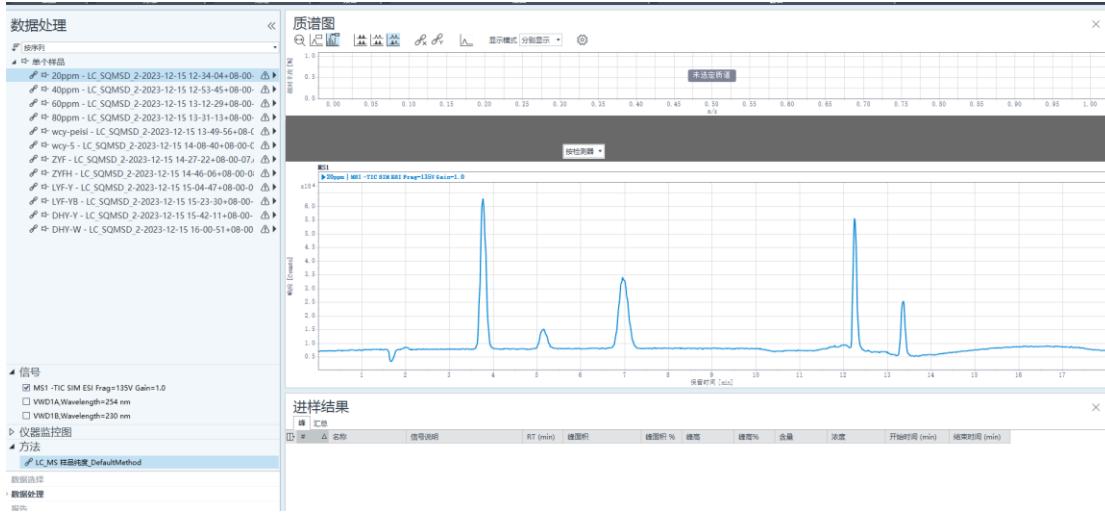


图 28 选择质谱或光谱数据处理界面

- ⑥ 点击激活手动积分，逐个峰进行手动积分，积分完成后再点击停止手动积分（图 29）。

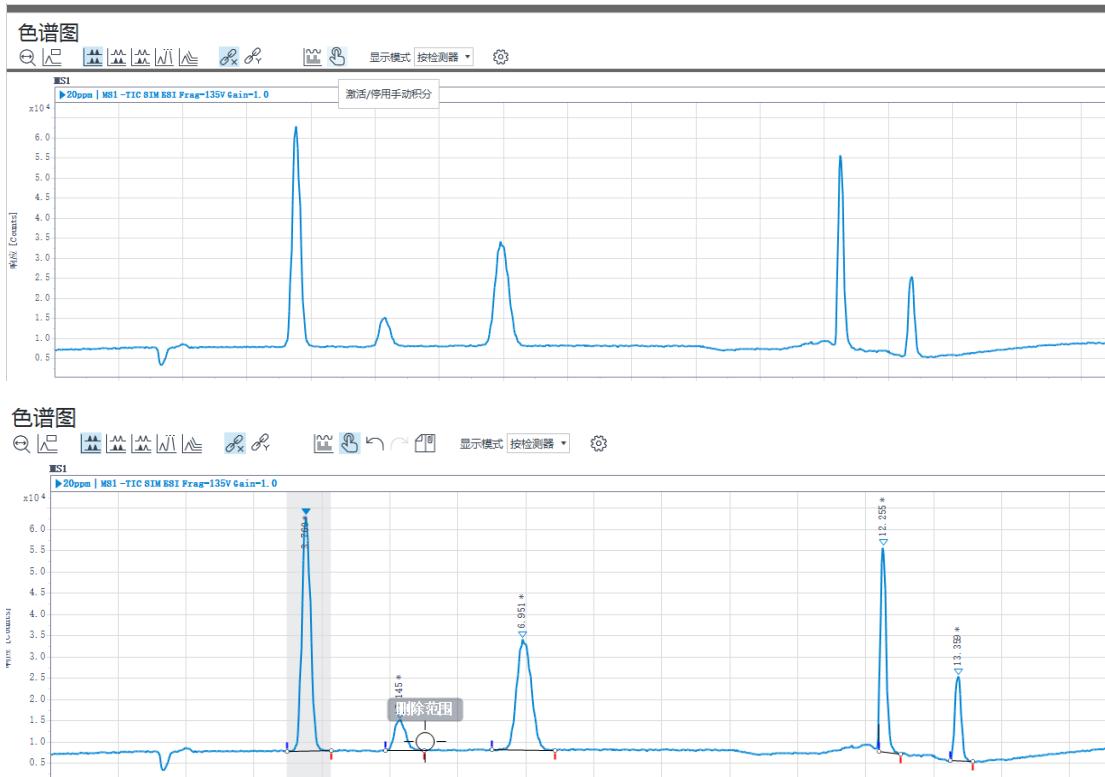


图 29 手动积分色谱峰面积

⑦ 选择目标峰，点击鼠标右键，选择提取质谱光谱图（图 29）。质谱图即可调用出来，判断出哪个物质。

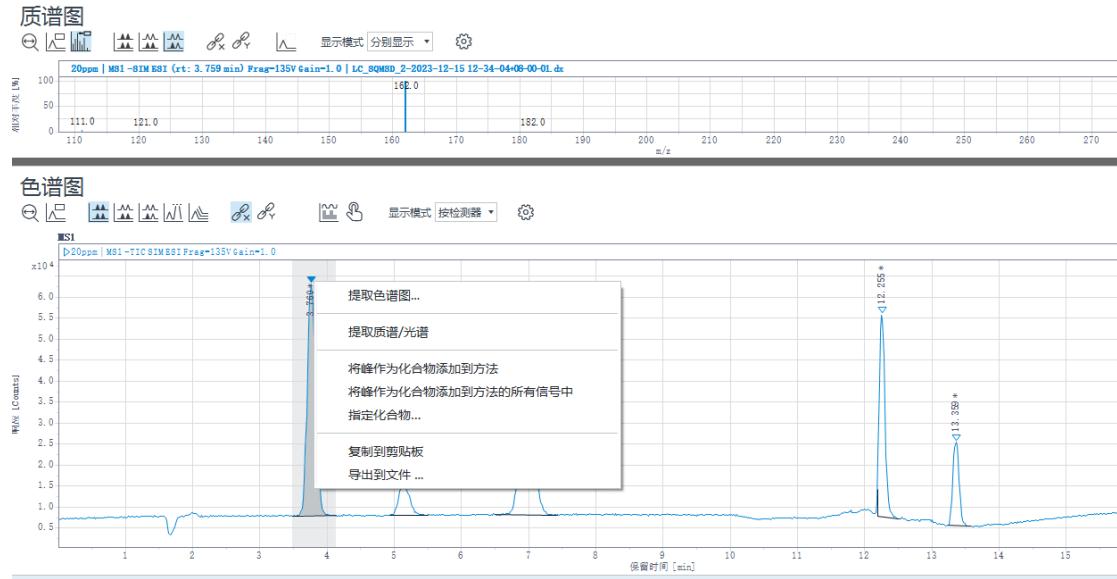


图 29 提取质谱信息界面

⑧ 调出进样结果表格（图 30），主要读取峰面积，进样结果可以另存为 EXCEL 文档。



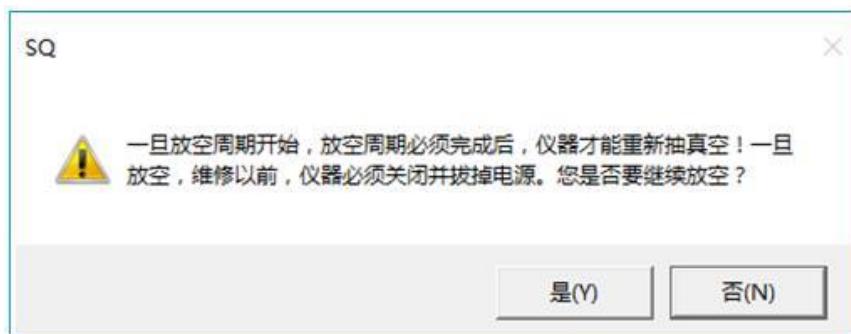
图 30 进样结果信息界面

四、关机步骤

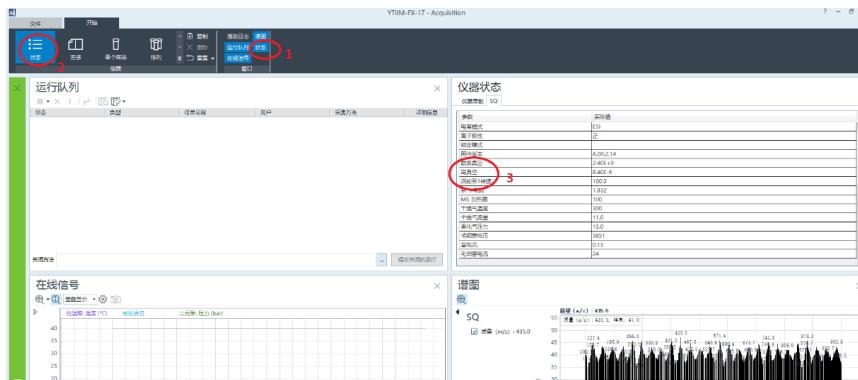
① 在 OpenLAB CDS 采集软件内点击 SQ 的图标，依下图所示选择“放空”。



② 出现下述提示，如果确认要放空，选择 Yes。



③在仪器状态界面观察涡轮泵转速的下降情况。



④等待约 30 min，分子涡轮泵转速和功率基本为 0 后，关闭采集软件，然后关闭质谱仪及液相色谱仪的各模块，以及计算机的电源。

五、注意事项：

① 如果是 OpenLAB CDS 2.X 系列的软件，一定要在 OpenLAB 控制面板上双击“关闭连接”，否则软件与仪器没有真正断开。

② 如果长时间关机，需拔掉质谱仪主电源线。如果使用氮气发生器，需关闭氮气发生器。如果使用液氮罐，同时需关闭自增压阀门。

第4节 分析方法的建立和评价

一、分析方法的建立

不同色谱分析方法的灵敏度、准确度和选择性各不相同，因此分析前需要根据试样的性质、测定的对象、分析结果对准确度的要求等来选择合适的分析方法。例如试样可能是固体、液体或气体；试样中待测组分的含量可能是常量、微量、痕量或超痕量；不同类型色谱柱对不同种类物质的分离效果不同；不同类型检测器对不同种类物质的检测灵敏度不同等。

（一）确定样品制备方法

气体试样可以直接采用气相色谱进行分析。一些液体试样可能可以直接采用气相色谱进行分析，一些液体试样则需先提取待测组分后再进行色谱分析。绝大部分的固体试样需要先提取待测组分后再进行色谱分析，同时需要考虑试样的粒度、均匀程度是否符合要求，以提高分析结果的重现性和检测的灵敏度。

（二）确定仪器配置

选择适合待测组分分析的进样装置、色谱柱、检测器。例如，分析气体需要六通阀或吹扫捕集器，分析弱极性化合物选择弱极性色谱柱，分析碳氢化合物选择氢火焰离子化检测器或质谱检测器。

（三）定性分析及优化分离条件

根据文献，编辑控制仪器的分析方法，包括设置进样口温度、色谱柱温度、检测器温度、载气流速等。配制单一组分的标准溶液，在相同的色谱条件下初步确定其保留时间。再配制多组分的混合标准溶液，通过优化色谱柱温度和载气流量实现混合物的完全分离。

（四）定量分析

根据试样特性及分析要求选择合适的定量分析方法。例如，中草药、食品、土壤等复杂体系中挥发性、半挥发性物质的分离分析一般选择内标法。

二、分析方法的评价

分析方法的评价一般需要给出分析方法的基本性能指标，如精密度、灵敏度、

检出限、线性范围等。新方法可靠与否一般采用两种方法进行判断：一是采用新方法和国家标准方法分析同一个试样，并对检测结果进行统计学上的检验，包括F检验和t检验；一是计算加标回收率。

第5节 实验内容

5.1 气相色谱-质谱联用法测定有机磷混合物

一、目的要求

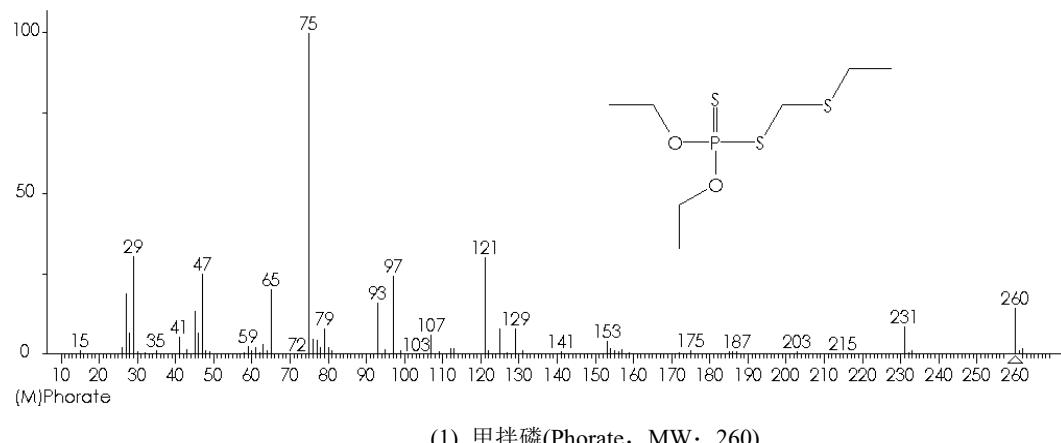
1. 初步掌握 GC-MS 联用仪的使用方法及相关理论。
2. 了解 GC-MS 联用对未知化合物进行定性分析的全过程。
3. 学会用含有内标的标准曲线法求混合物中各组分的含量。

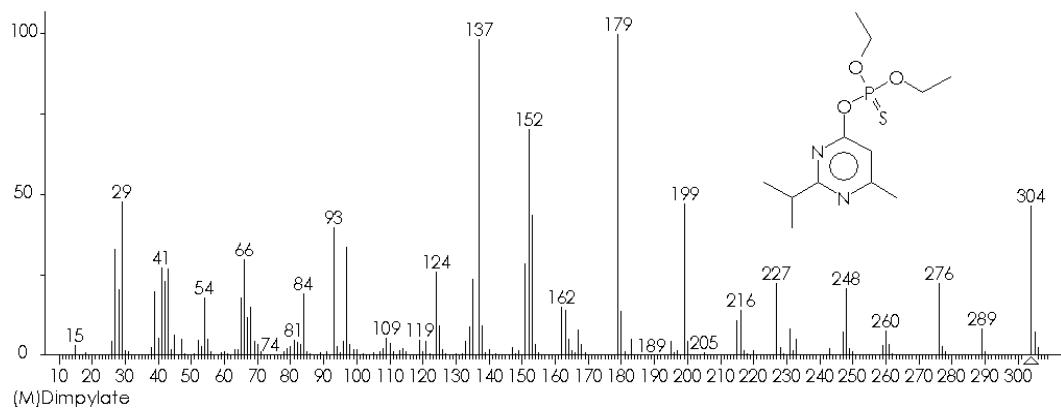
二、方法原理

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。

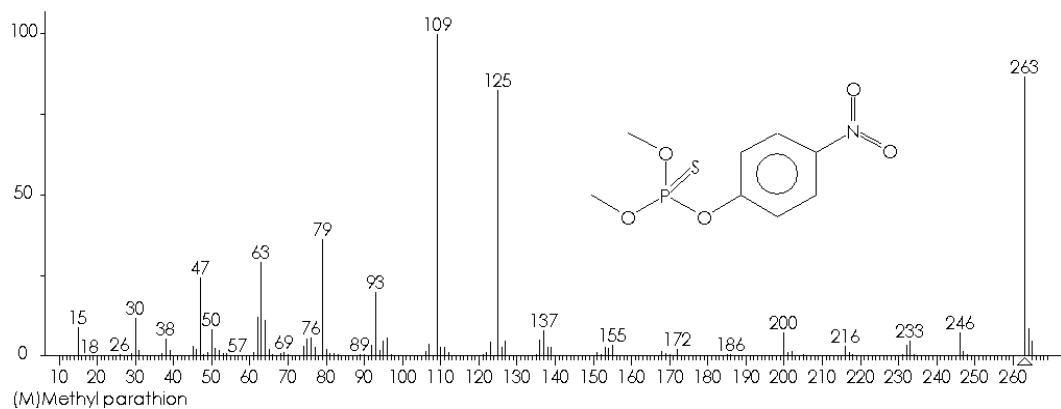
1. 有机磷的定性分析

有机磷的名称、结构式、分子量和特征质谱图，如图 16 所示：

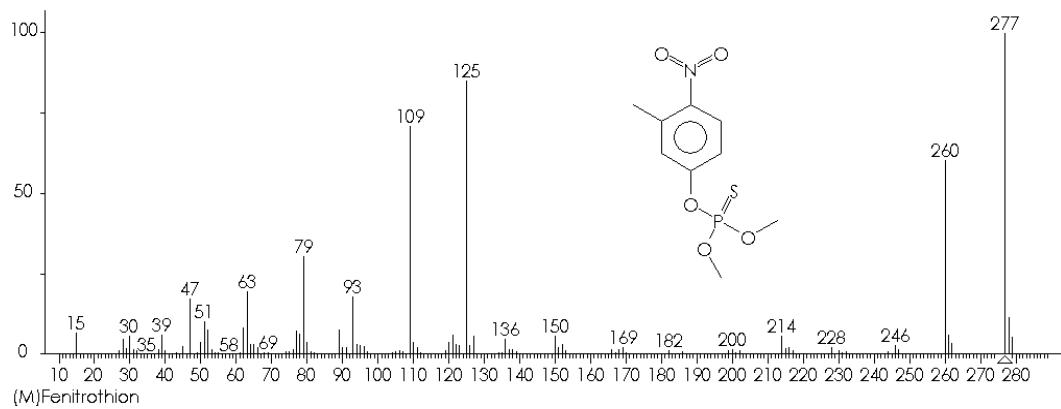




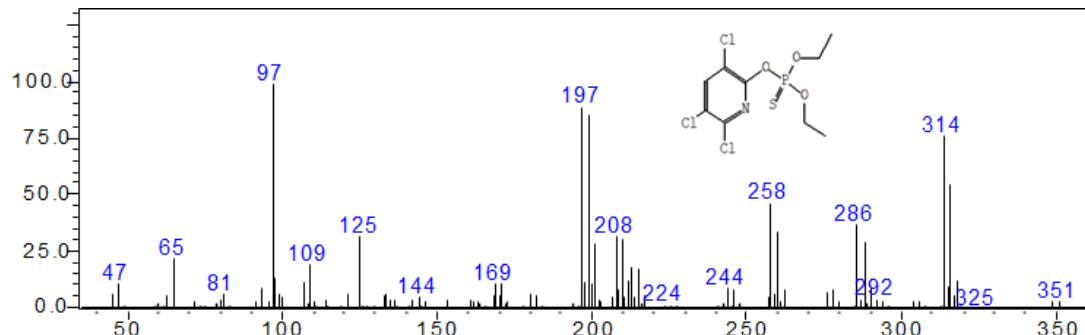
(2) 二嗪磷(diazinon MW: 304)



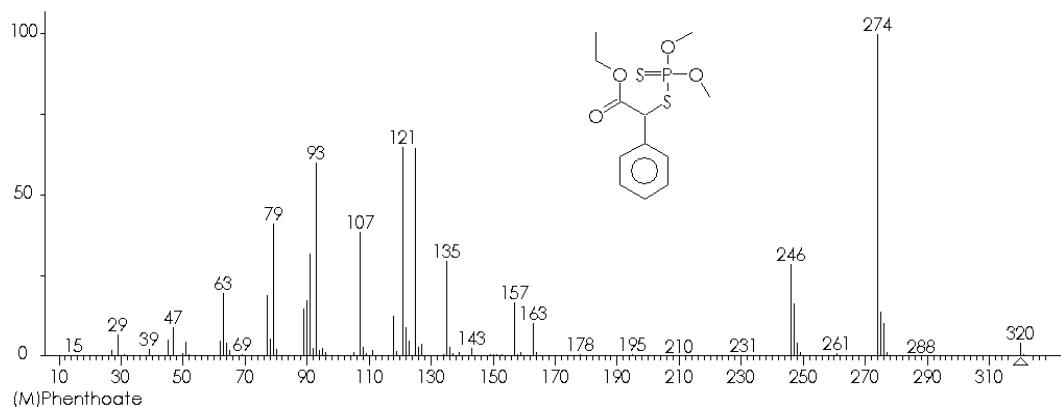
(3) 甲基对硫磷(Methyl-parathion, MW: 263)



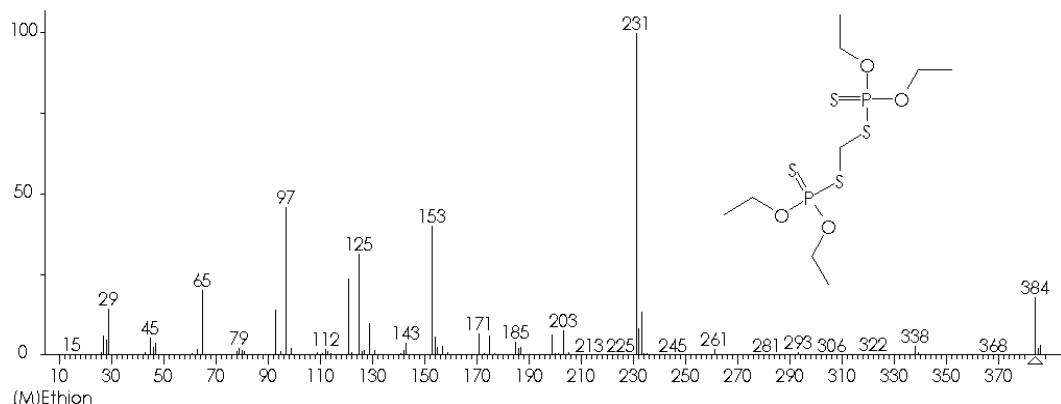
(4) 杀螟硫磷(Fenitrothion, MW: 277)



(5) 毒死蜱(chlorphrifos, MW: 350)



(6) 稻丰散(Phentoate, MW: 320)



(7) 乙硫磷(Ethion, MW: 384)

图 16 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 μm ；
- ②载气：高纯氦气；
- ③无分流进样；
- ④进样口（气化室）温度：260°C；
- ⑤升温程序：初始 120°C，保留 0 min；以 $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 200°C，保留 0 min；再以 $1 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 208°C，保留 0 min；再以 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升至 250°C，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 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？

5.2 液相色谱-质谱联用法测定饮料中的添加剂

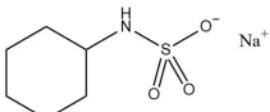
一、目的要求

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 7 所示。

表 7 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	397.64	

三、仪器与试剂

1. 仪器

安捷伦 1260 Infinity II-MSD，C18 色谱柱 (2.1mm*150mm, 3μm)，超声波清洗器，天平。

(1) 流动相溶液配制

C 液：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。

D 液：0.1%甲酸-5 mmol·mL⁻¹ 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。

(2) 色谱条件

C₁₈色谱柱（长 150 mm × 内径 2.1 mm，粒径 3 μm）；流动相 C 和 D 等梯度洗脱 (40% C, 60% D)。流速 0.18 mL·min⁻¹；进样体积 3 μL；检测器：紫外检测器，波长 230 nm 和 254 nm。

(3) 质谱条件

电喷雾电离，负离子模式 (ESI-)；雾化气压力 40 psi，干燥气体积流量为 9.8 L·min⁻¹；干燥气温度为 250 °C；毛细管电压为 3500 V；选择性离子扫描模式 (SIM) 负离子模式：162.2、178.2、293.3、395.6。

2. 试剂

安赛蜜，甜蜜素，阿斯巴甜，三氯蔗糖，甲酸铵，甲酸、甲醇等。

四、实验步骤

1. 饮料样品前处理

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

(2) 配制加标样：另取一份，除加入样品外，再加入 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混标液体 200 μL 于 10 mL 离心管中，用纯水定容至 5 mL。

(3) 两份样品在 50℃ 的超声清洗机里超声 5 min 后，分别用针筒抽取 1~2 mL 溶液，过膜到进样小瓶，备用。

2. 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。

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) 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

- 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？
- 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？
- 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。