

全二维气相色谱 (GC×GC)-高分辨质谱联用 (GC-Orbitrap/MS) 分析植物精油的挥发性成分

蔡宇 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

一、前言

全二维气相色谱 (Comprehensive Two-dimensional GC, GC×GC) 是基于传统一维气相色谱分离技术发展出的新型色谱分离技术。该技术通过一个调制器, 将两根不同极性的色谱柱以串联的形式连接, 使得第一根色谱柱的馏出物在调制器内进行浓缩聚集, 然后以周期性的脉冲方式释放到第二根色谱柱上继续分离, 最终进入检测器。GC×GC可以有效地将第一维色谱柱上无法分离的组分 (共流出物) 通过第二维进行分离, 达到正交分离的效果。全二维气相色谱在1999年被商品化后, 因相较于传统的一维气相色谱, 峰容量大、分辨率高, 灵敏度高, 化合物排布在二维色谱图上有规律可循, 便于定性, 因此通常与气相色谱仪、气相色谱-低分辨质谱仪结合, 用于分离鉴定复杂未知样品的挥发性组成, 如: 油品分析 (石化领域)、POPs 分析 (环境领域)、植物精油分析、烟草烟气分析等。

气相色谱-高分辨静电场轨道阱质谱 (GC-Orbitrap/MS) 以其出色的分辨率、灵敏度, 在未知样品挥发性成分分析中展现出极大的优势。Thermo Scientific™ TraceFinder 5.0结合Deconvolution 1.5 解卷积插件, 通过质谱优先的计算方式, 能够明确归属每个化合物的质谱峰, 对共流出化合物进行有效分离定性。基于半导体制冷的热调制器体积小、装卸容易, 且无需液氮或其他制冷剂, 结合GC-Orbitrap/MS使用, 能够在一维GC分离的基础上, 针对极端复杂样品进一步实现全二维GC的分离, 为未知物的分离鉴定提供新的思路和方法。

2、实验条件

2.1 样品: 某植物精油样品

2.2 仪器和方法设置

2.2.1 仪器

使用Thermo Scientific™ Q Exactive GC Orbitrap质谱仪, 配备Thermo Scientific™ TriPlus RSH自动进样器及Thermo Scientific™ Trace 1310 气相色谱仪进样样品分析。采用Thermo Scientific™ TraceGOLD TG-5SiIMS (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 毛细管色谱柱实现色谱分离。

使用雪景科技SSM1800全二维气相色谱固态热调制器, 一维、二维和调制柱分别采用TraceGOLD TG-5SiIMS (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm)、DB-17MS (1.8 m × 0.18 mm × 0.18 μm) 和HV系列 (C5-C30) 毛细管色谱柱。

2.2.2 一维GC-Orbitrap/MS条件

气相色谱条件:

进样口: SSL分流/不分流进样口, 250℃; 进样量: 1 μL; 分流比: 15:1;

载气: He, 1.0 mL/min;

程序升温: 40℃保持2min, 以3℃/min升到140℃, 然后以2℃/min升到200℃保持2 min, 再以5℃/min升到280℃, 保持3 min;

质谱条件:

分辨率选择: 30,000 FWHM (200 m/z)

扫描范围: 33-350 m/z, 全扫描 (Fullscan模式)

EI模式下离子源温度: 280 °C; 电子能量: 70eV

2.2.3 全二维GC×GC-Orbitrap/MS条件

气相色谱条件:

进样口: SSL分流/不分流进样口, 250°C; 进样量: 1μL; 分流比: 15:1;

载气: He, 1.5 mL/min;

程序升温: 40°C 保持2min, 以3°C/min升到280°C, 保持10 min;

调制器温度 (采用雪景科技SSM 1800固态热调制器, 如图1所示) :

冷区: -51°C

进口热区: 柱温箱偏置 + 30°C (最高320°C)

出口热区: 柱温箱偏置 + 120°C (最高320°C)

调制周期/释放时间: 6s/1s

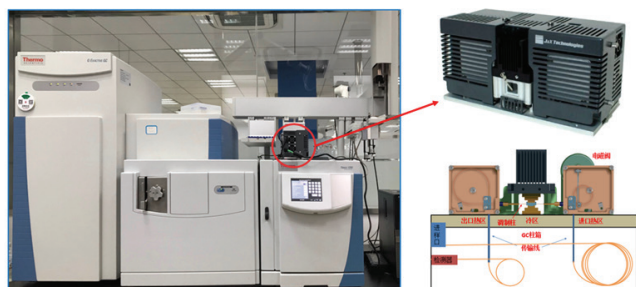


图1 GC-Orbitrap/MS与雪景科技SSM 1800固态热调制器联用

质谱条件:

分辨率选择: 7,500 FWHM (200 m/z)



EI模式下离子源温度: 280 °C; 电子能量: 70eV

Tune 软件中设置仪器为Fast Scan模式

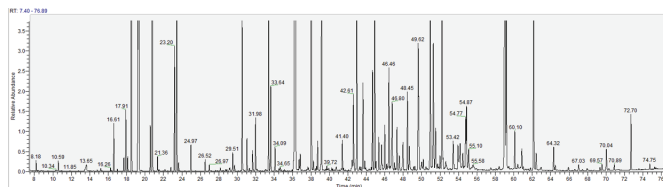
2.3 数据处理

使用Thermo Scientific™ TraceFinder (version 5.0) 采集并处理数据。通过Tracefinder Deconvolution Plugin对数据进行自动化解卷积处理, 然后再将解卷积之后的高分辨质谱图与GC-Orbitrap/MS高分辨自建库和商业数据库 (NIST、Wiley等) 进行比对, 采用高分辨过滤分值 (HRF Score)、谱库比对的正向匹配度 (SI值) 和保留指数 (Retention Index, RI), 共同确证未知化合物的定性结果。全二维数据采用雪景Canvas软件及GC-Image软件处理。

3、结果与讨论

3.1 GC-Orbitrap/MS分析精油中挥发性化合物组成

精油样品的一维GC-Orbitrap/MS分析总离子流图如图2所示。通过高分辨解卷积在样品中共分析得到挥发性化合物峰473个, 结合高分辨过滤分值 (HRF Score)、NIST 2017谱库检索及保留指数 (RI), 共定性出化合物244个 (HRF Score > 90, SI > 650, RSI > 650, ΔRI < 30) 。



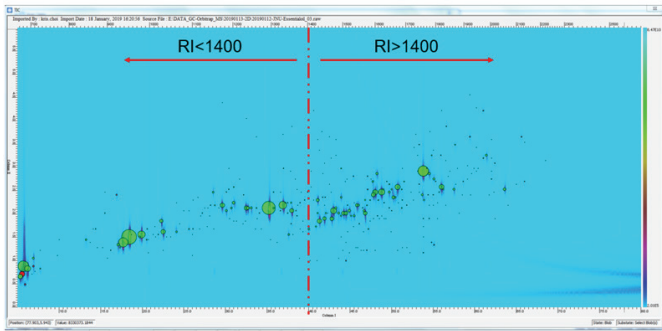


图4 精油样品全二维GCxGC-Orbitrap/MS分析结果（2D视图）

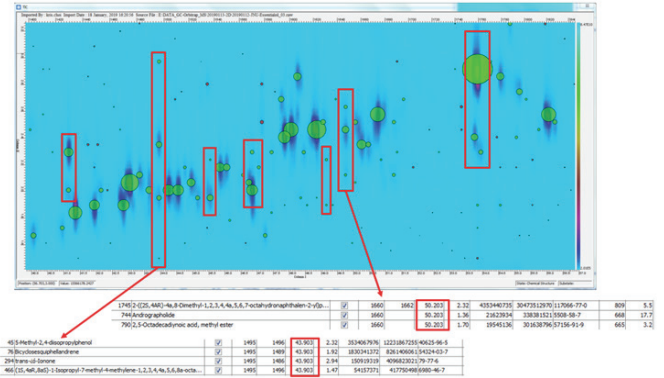


图6 一维保留指数 1420 < RI < 1830段的化合物（全二维数据2D视图）

3.4 高质量精度的GCxGC-Orbitrap/MS的数据

高分辨质谱在未知化合物分析中最大的优势之一，在于可以通过化合物实测的精确质量数去对化合物的结构进行推断，因此，高分辨数据的质量精度是评价高分辨质谱性能的重要参数。Orbitrap类型的质谱仪本身设计原理决定了其高分辨率、高质量精度、高灵敏度、宽线性动态范围的数据特点。在TIC图（图7-a，一维数据）中选取样品中峰面积最大的化合物——乙酸冰片酯（RT 36.43 min, TIC Area 2.07E11）和相对面积较小的化合物——丁香酚（RT 39.53 min, TIC Area 1.93E7，只能通过精确质量数m/z 164.0832的提取离子流图EIC找到该化合物），查看这两个化合物的精确质量数测量结果、测量偏差及同位素离子丰度比率。如图7-b所示，对于一维GC-Orbitrap/MS数据而言，无论是响应较高的乙酸冰片酯，还是低响应的丁香酚，实测特征离子m/z 95.08553 ($C_7H_{11}^+$ ，乙酸冰片酯)，m/z 164.0832 ($C_{10}H_{12}O_2^+$ ，丁香酚)及其M+1，M+2离子的质量偏差均小于2 ppm， $C_5^{13}C_2H_{11}^+$ 离子处有一响应更高的干扰离子，但当前分辨率下可以有效区分两个质谱峰。对于GCxGC-Orbitrap/MS的数据来说，虽然在数据采集过程中为满足二维分析的要求，提高了质谱的扫描速度，但仍旧获得了高质量精度的数据，除了丰度极低的 $C_8^{13}C_2H_{12}O_2^+$ 离子质量偏差为7.6 ppm外，其余离子的质量偏差均小于3 ppm。此外，无论是一维还是全二维的数据，均展示了与天然同位素丰度比率极为相似的同位素丰度值，可用于辅证化合物的定性结果。

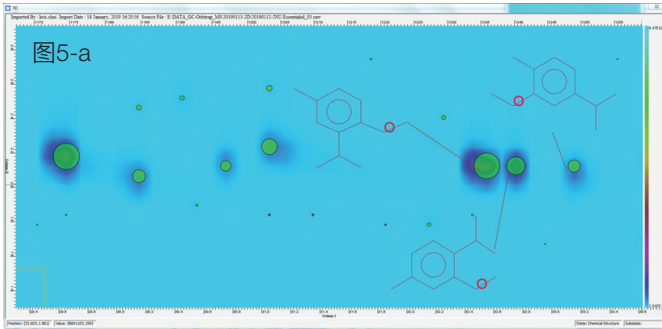
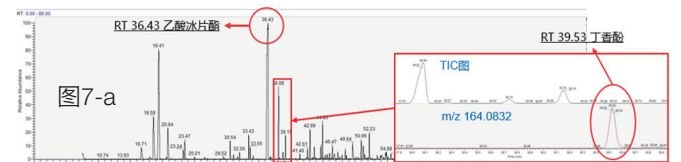


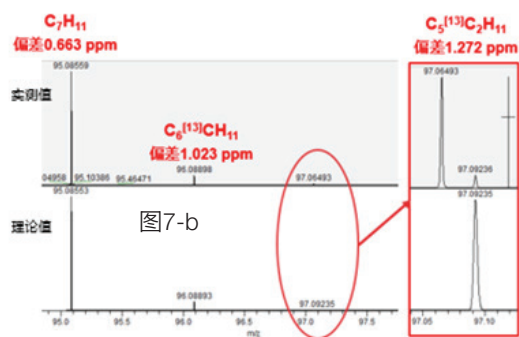
图5-b

Component Name	RT	Reference m/z	BP Area	BP Height	TIC	Calculated RI	Selected
Fenchyl acetate	33.093	81.069931	7733231	2075091	7628458	1226	
p-Cycloctal	33.183	137.096207	2659774	696958	3812825	1228	
Citronellol	33.242	67.054260	4662364	897997	3185885	1229	
Peak @ 33.3302	33.333	69.069923	1724066	376436	708451	1231	
Anisole, 2-isopropyl-4-methyl-	33.405	149.096176	1448212811	416682338	1210443050	1232	
Isobornyl formate	33.564	95.085571	14389968	3726636	13189884	1236	
Anisole, 2-isopropyl-5-methyl-	33.641	149.096176	776001596	219092748	580433445	1237	
Cyclohexene, 3,4-diethenyl-1,2-diol	34.040	93.069946	18708370	4112458	8837458	1246	
p-Cymene, 2-methoxy-	34.099	149.096176	198321803	55658522	165705486	1247	
Peak @ 34.294	34.294	67.054260	737799	188892	537928	1251	
Linalyl acetate	34.535	93.069946	12074260	3289407	14306463	1256	
Peak @ 34.5438	34.544	85.064827	1089091	292215	710066	1257	
Methylcamphenoate	34.616	108.093391	2540378	688704	6657928	1258	

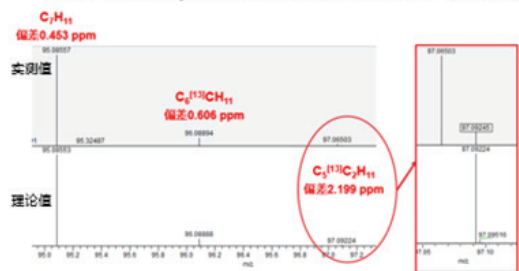
图5 香芹酚甲醚和两个同分异构体（31574-44-4 / 1076-56-8 / 6379-73-3）的分离（图5-a为二维分离结果，图5-b为一维数据TraceFinder Deconvolution定性结果）

对于一维RI > 1400部分的化合物，存在大量一维保留时间相同的化合物，以1420 < RI < 1830为例，如图6所示。一维保留时间完全一致的化合物（如：RT 43.903min 四个化合物，RT 50.203min 三个化合物），即使有强大的解卷积算法，也无法进行化合物分离和准确定性。传统的一维GC-MS分析对于该类复杂样品至少需要进行双柱、或三柱定性，采用不同极性的色谱柱对样品进行分离，分别对数据进行定性分析，再汇总结果。全二维气相色谱通过串联两根不同极性的色谱柱，在第二个维度上实现了一维共流出化合物的分离，一针进样实现双柱分离的效果，很大程度上简便了从复杂样品中鉴定未知化合物的流程。

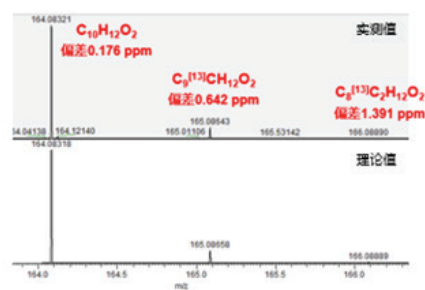




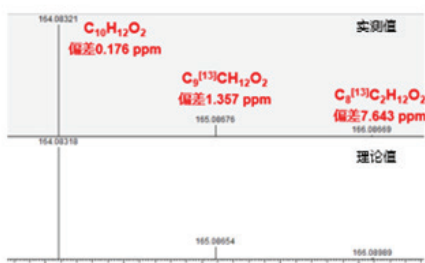
一维GC-Orbitrap/MS 同位素比率 and 偏差 (乙酸冰片酯)



GCxGC-Orbitrap/MS 同位素比率 and 偏差 (乙酸冰片酯)



一维GC-Orbitrap/MS 同位素比率 and 偏差 (丁香酚)



GCxGC-Orbitrap/MS 同位素比率 and 偏差 (丁香酚)

图7 Orbitrap/MS实测代表化合物的质量数、质量偏差及同位素离子丰度比率

此外，通过高质量精度的特征离子碎片可以快速定位某类化合物，如图8所示，通过m/z 164.0832 快速定位与丁香酚有类似结构的甲氧基苯类物质。

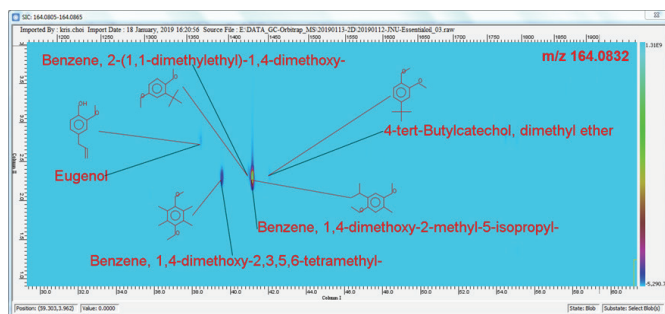


图8通过高分辨提取离子流图快速定位目标化合物 (m/z 164.0832)

4、总结

- (1) 基于固态热调制器的全二维系统，其设备体积小，无需液氮冷却、安装方便，与GC-Orbitrap/MS系统结合，可随时灵活切换，以获取高质量的一维或全二维GC-MS数据；
- (2) 对于不过分依赖二维分离的化合物组，通过高分辨解卷积处理的一维GC-Orbitrap/MS分析数据，能获取精确的、高灵敏度的质谱信息，定性效果更佳；
- (3) 对于一维色谱无法分离的化合物组，通过热调制器将系统切换为全二维模式，GCxGC-Orbitrap/MS增加一维的色谱分离，可得到更全面的样品成分剖析信息；
- (4) 静电场轨道阱GC-MS联用仪数据质量精度高、分析动态范围宽，其高分辨、高灵敏度的特点为未知化合物定性分析提供了可高度挖掘的原始数据，为发现新化合物、寻找低浓度关键标志物提供了可能。

Acknowledgement

感谢雪景科技提供实验用调制解调器、软件支持及技术支持。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC