

使用全二维气相色谱 (GC × GC) 系统和高分辨率质谱仪分析精油



作者

Nick Harden, Sofia Nieto,
Scott Hoy, Kai Chen,
Matthew Curtis
安捷伦科技有限公司

摘要

全二维气相色谱 (GC × GC) 因添加了第二维，可提供高色谱分离度，从而显著改善精油等复杂样品的分析。将 GC × GC 与高分辨率精确质量数测量相结合，能够增加可识别成分的数量，并提高结果的可靠性。

本研究的重点是建立一套工作流程，结合使用配备反向流路调制器的 GC × GC 与高分辨率四极杆飞行时间 (GC/Q-TOF) 质谱仪分析精油。

前言

对精油进行分析通常是为了确定其化学组成对风味、香气和品质的影响。此外，这些分析还有助于评估真实性和鉴定掺杂物。

精油是通过蒸馏或冷压从植物中提取的挥发性和半挥发性成分的复杂混合物^[1]。它们通常包括质谱高度相似和保留指数 (RIs) 接近的若干种异构体。因此，通过单柱分离精油不足以鉴定单个成分。精油成分的复杂性促使人们不断寻求选择性更高的先进色谱技术。因此，最好采用 GC × GC 方法来实现这种样品基质的适当色谱分离。

在 GC × GC 方法中，通常会将第一维色谱柱的流出物收集并重新进样至选择性不同的第二维色谱柱，以实现正交分离。这一过程由安装在两根色谱柱之间的调制装置实现。用于 GC × GC 分离的调制器通常为热调制器或流路调制器。理想情况下，应对来自第一维的每个色谱峰进行三次或更多次采样，这就要求实现快速的第二维分离^[2]。而 TOF 分析仪既能提供快速的数据采集，又能确保始终获得高质量谱图，是最适合与 GC × GC 分离技术相结合的 MS 系统。相比之下，当扫描质量分析器以最高速率（通常接近 20 Hz）采集数据时，质谱偏移可能会导致谱库匹配得分不佳。

流路调制是一种经济有效的技术，可实现无制冷剂 GC × GC 分离。RFM 通常与火焰离子化检测器 (FID) 联用，常用于烃类化合物和聚合物分析以及香精和香料应用等^[3]。将 RFM 与 MS 检测器结合使用，有助于更简便、可靠地鉴定化合物。然而，由于 MS 的最佳载气流速限制（通常为 1–2 mL/min），这项技术也带来了巨大的挑战。

本研究的主要目标是开发一种使用 GC × GC 方法的工作流程，结合使用 RFM 与高分辨率精确质量 GC/Q-TOF 系统进行精油分析。最初，使用柴油开发并优化这一 GC × GC 设置，柴油是一种成分复杂但经过充分研究的样品。此外，还考察了复杂 GC × GC 精油数据的统计分析和方法比较。

实验部分

数据采集

使用 Agilent 8890 气相色谱仪，通过配备 RFM 的 GC × GC 配置分离样品，并使用高分辨率精确质量 Agilent 7250 GC/Q-TOF MS 和 FID 进行分析。本研究采用一种“常见”的色谱柱组合，包括一根非极性第一维色谱柱和一根极性第二维色谱柱。具体而言，包括一根 20 m × 0.1 mm, 0.1 μm Agilent DB-1ms 色谱柱（100% 二甲基聚硅氧烷）和一根 5 m × 0.25 mm, 0.15 μm Agilent DB-17ms 色谱柱（相当于 (50%-苯基)-甲基聚硅氧烷）。

为了减少输送至质谱仪的流量，并在配置中增加一个 FID 作为第二个检测器，必须连接一个分流器，使第二维色谱柱的末端分流。为了突出每种配置的优势和局限性，我们探讨了两种类型的分流器，即吹扫分流器和无吹扫分流器。对于吹扫分流器，色谱柱的气流会与尾吹气流混合，然后在两个检测器之间分流。而无吹扫分流器在连接两个检测器的两个限流器之间将色谱柱流出物分流时，不使用尾吹气流。本研究还增加了第二个 FID（监测仪或放空口）通道，用于方法优化和故障排除。

表 1 显示了使用吹扫分流器配置优化的仪器参数，由于这种模式在采集软件中的设置更为简单，因此成为了首选。

表 1. 数据采集参数

参数	值
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF 系统
GC	Agilent 8890 气相色谱系统
进样口/衬管	MMI, Agilent 5190-2294: 990 μL (分流, 直型, 带玻璃毛, 超高惰性)
进样模式	分流; 250:1
进样量	0.5 μL
进样口温度	300 °C
色谱柱 1 尺寸和流速	Agilent DB-1ms, 20 m \times 0.1 mm, 0.1 μm (127-0122); 0.2 mL/min
色谱柱 2 尺寸和流速	Agilent DB-17ms, 5 m \times 0.25 mm, 0.15 μm (122-4711); 10 mL/min
限流器至调制器（放空口）FID	安捷伦去活熔融石英; 0.4 m \times 0.05 mm (160-2655-1)
吹扫分流器限流器至 Q-TOF 和流路	安捷伦去活熔融石英; 0.6 m \times 0.12 mm (CP801206); 1.3 mL/min
吹扫分流器限流器至检测器 FID	安捷伦去活熔融石英; 1.05 m \times 0.25 mm (CP802505)
调制延迟	0.51 min
调制周期	5.1 s
进样时间	0.125 s
载气	氦气
柱温箱升温程序	45 °C (保持 1 min) ; 以 3 °C/min 升至 285 °C, 保持 3 min
传输线温度	305 °C
离子源温度	300 °C
四极杆温度	150 °C
碰撞池气体流速	N ₂ , 1 mL/min + He, 4 mL/min
电子能量	70 eV
发射电流	5 μA
谱图采集速率	50 Hz
质量数范围	<i>m/z</i> 45–650
FID 温度	300 °C
FID H ₂ 流速	30 mL/min
FID 空气流速	400 mL/min
FID 尾吹气流速 (N ₂)	检测器 FID: 15 mL/min 监测仪（放空口）FID: 25 mL/min

结果与讨论

GC × GC 配置的选择和优化

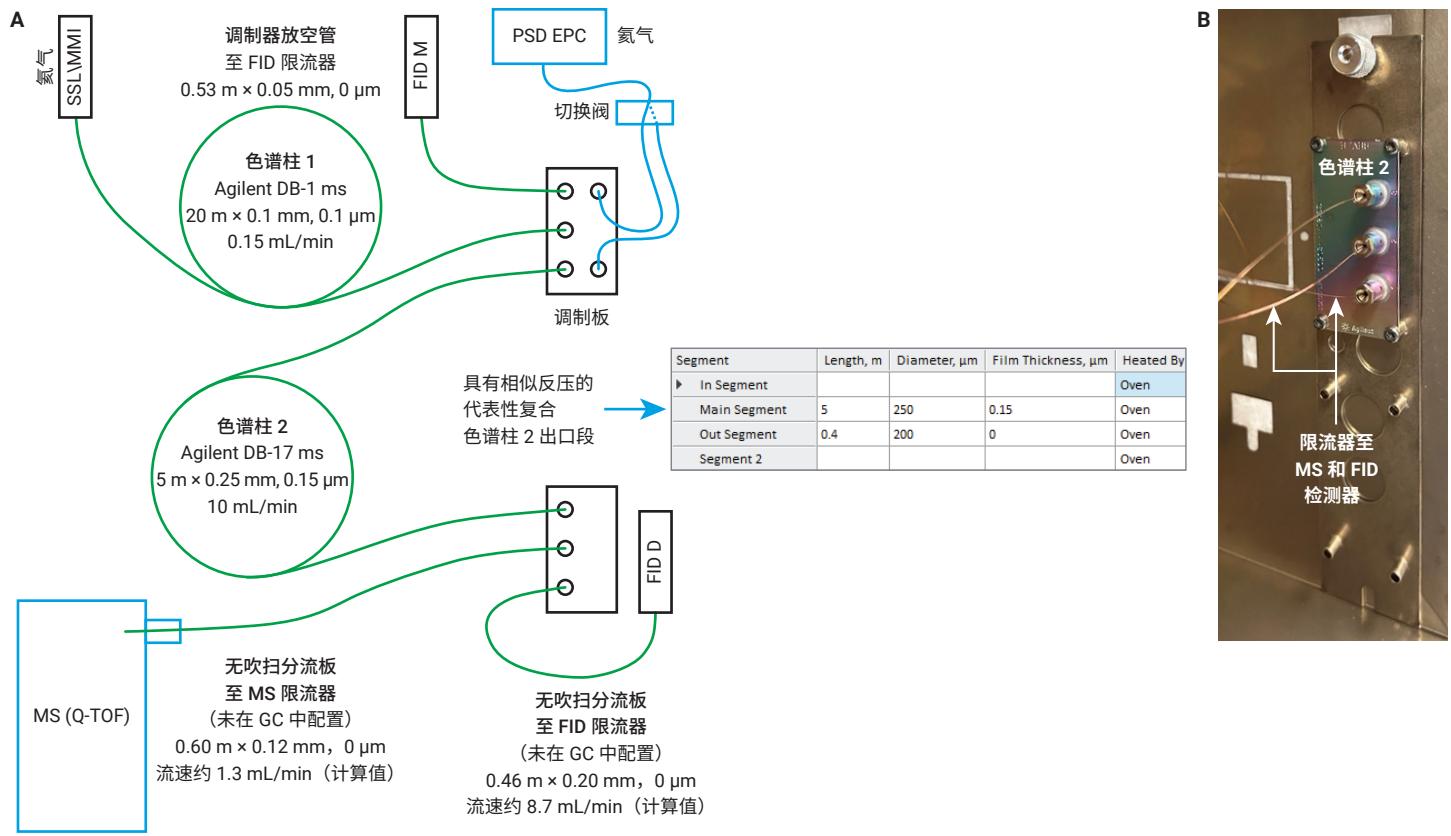
在进行 GC × GC 分析时, 为了达到足够高的调制比, 第二维色谱柱上的分离速度应足够快。通常使用相对较短的第二维色谱柱来达到这一目的, 但在 GC × GC RFM 配置中, 该色谱柱产生的高流速会与 MS 不兼容。因此, 为了在 MS 和 FID 通道之间将来自第二维色谱柱的气流分流, 可以使用吹扫分流器或无吹扫分流器。

鉴于此, 最初使用柴油样品开发并优化 GC × GC RFM 方法。本研究探索了几种采用不同柱长和内径的配置, 以实现对组分的充分色谱分离, 同时确保组分以理想的载气流速进入 MS。图 1 至图 4 讨论了两种最实用的配置。请注意, 除 MS 之外, 这两种方法都使用两个 FID 通道 (作为放空口/监测仪和检测器)。虽然在运行配备 RFM 的 GC × GC 时不需要监测仪 FID 通道, 但它对于初始方法设置、优化和故障排除至关重要。具体而言, 在设置中配置监测仪 FID 通道, 可以检测由于调制器样品定量环过量填充而导致的任何穿透, 从而进一步调整相应的色谱柱/限流器参数、调制和进样时间。在配置带 RFM 的 GC × GC 时, 另一个重要的考虑因素是 MS 限流器的一部分由柱温箱加热, 而另一部分则由传输线加热。每段都应根据其加热源进行配置。MS 的限流器尺寸应根据传输线温度和流向 MS 的气流进行选择。在 MS 和第二个检测器之间分流时, 应保持流向 MS 的气流恒定。如果设置正确, MS 和第二个检测器之间的分流比恒定, 不受柱温箱温度曲线的影响。

使用无吹扫分流器的配置如图 1 所示。为了正确设置, 应在采集软件中配置一个具有代表性的复合色谱柱 2 出口段, 其反压与 MS 和 FID 检测器限流器产生的反压相似。因此, MS 和检测器 FID 限流器没有单独配置。

数据处理

使用高分辨率 7250 GC/Q-TOF 系统, 以 50 Hz 的速率采集数据。对于化合物鉴定, 使用 Agilent MassHunter 定量分析软件 12.1 版中的未知物分析工具和 GC Image 软件 2024 R1 版以及 NIST23 EI 谱库。使用线性保留指数 (LRIs) 提高化合物鉴定的可靠性。使用 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件 15.1 版进行统计分析。



采用这种配置获得的柴油 GC × GC 色谱图如图 2 所示。使用这种方法通常可以观察到柴油脂肪族物质的出色分离。然而，由于 $2.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的柱温箱升温速率较慢，即使调制周期为 6.3 秒，三环芳烃也会缠绕在色谱柱上，直到下一个调制周期才从第二维色谱柱洗脱。

使用吹扫分流器的配置如图 3 所示。此设置中使用的所有三个限流器，包括 MS、放空口和监测仪 FID 限流器，都必须在采集方法中进行配置。

使用吹扫分流器配置进行的柴油分离如图 4 所示。这种三路分流器配置还能实现柴油烃类化合物的出色分离，包括单环芳烃、双环芳烃和三环芳烃以及石蜡和环烷烃。使用 $4.5^\circ\text{C}/\text{min}$ 的较快柱温箱升温速率时，未观察到明显的三环芳烃缠绕现象。监测仪 FID 通道在吹扫和无吹扫分流器方式下均未出峰，表明调制器配置正确。本文展示了三路分流器配置的洁净 FID 通道示例（图 5）。

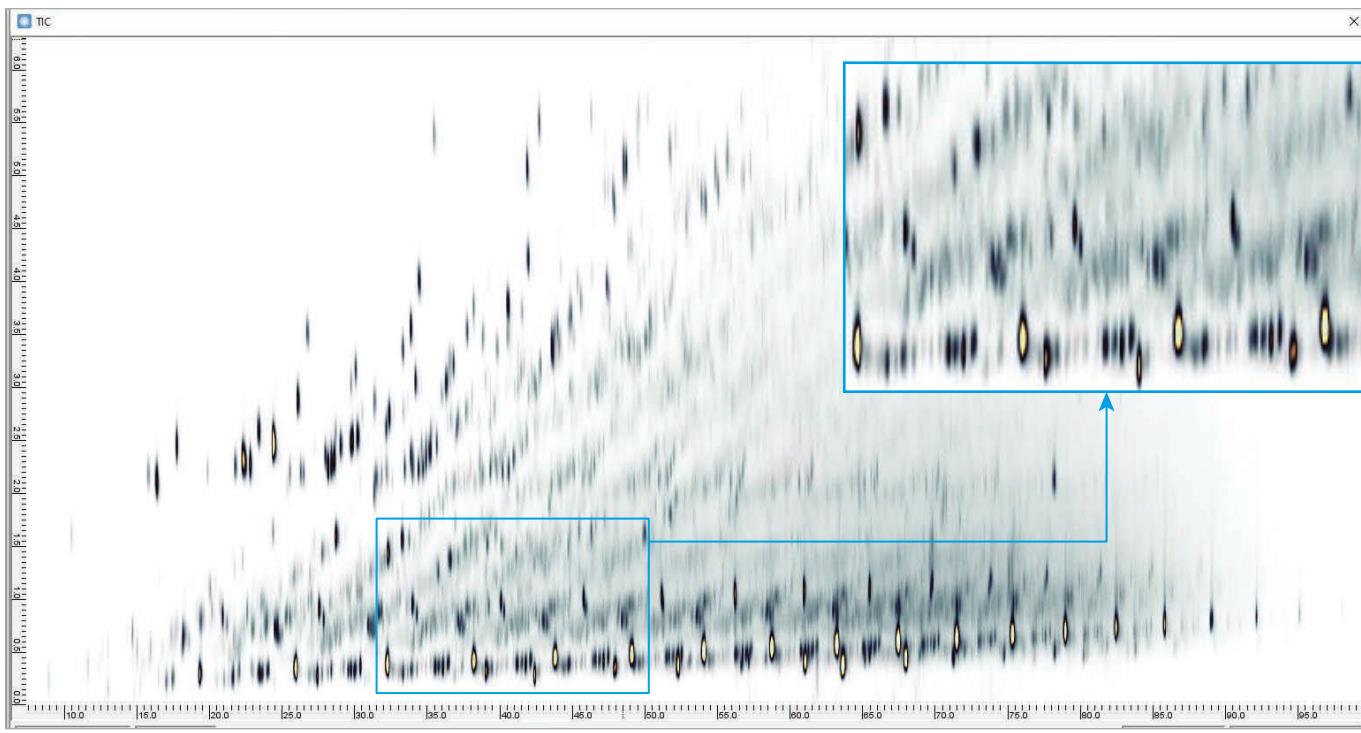


图2. 使用无吹扫分流器设置分离柴油。调制周期为 6.3 秒，柱温箱温度为 40 °C，保持 6 分钟，然后升温速率为 2.5 °C/min

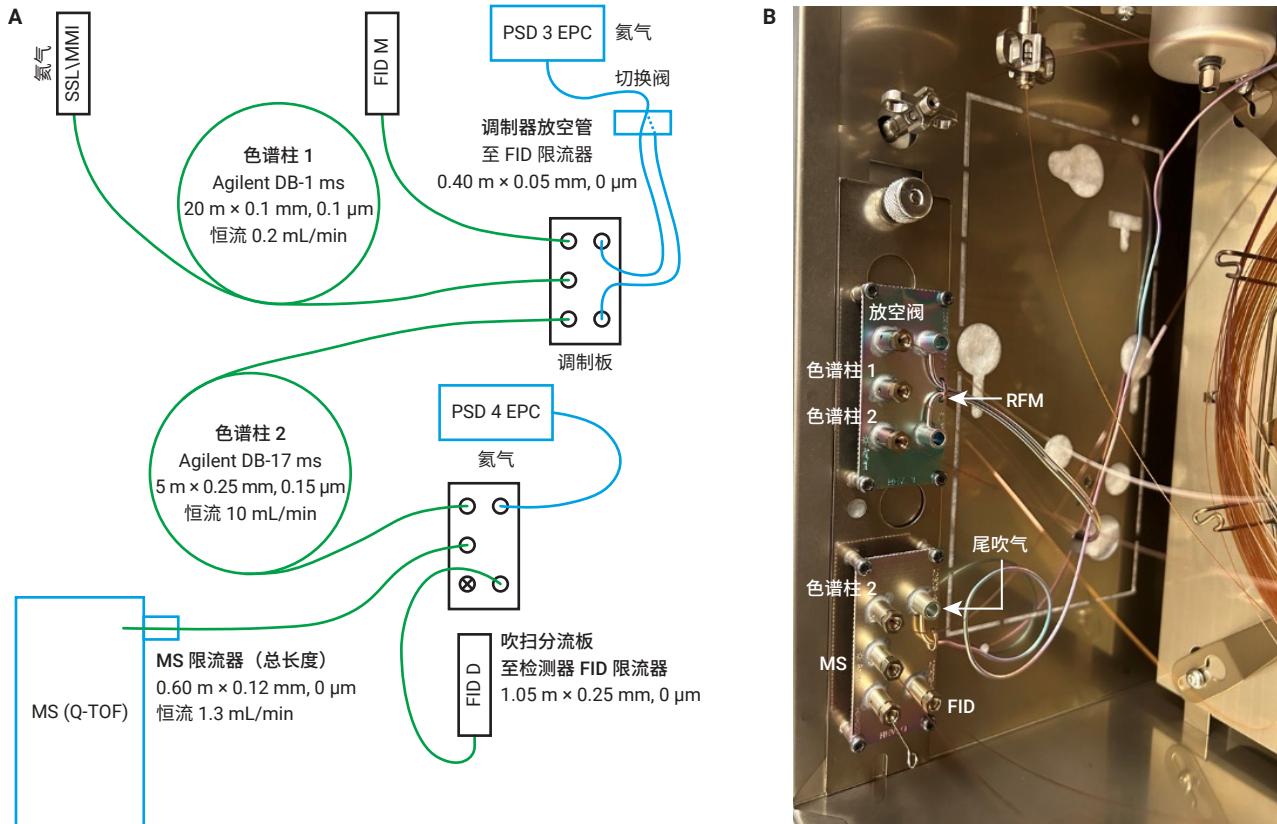


图3. 带吹扫分流器的 GC × GC RFM 设置。(A) 使用吹扫（三路）分流器配置时的 GC × GC 示意图。(B) 配备吹扫分流器和反向流动调节器板的气相色谱柱温箱照片

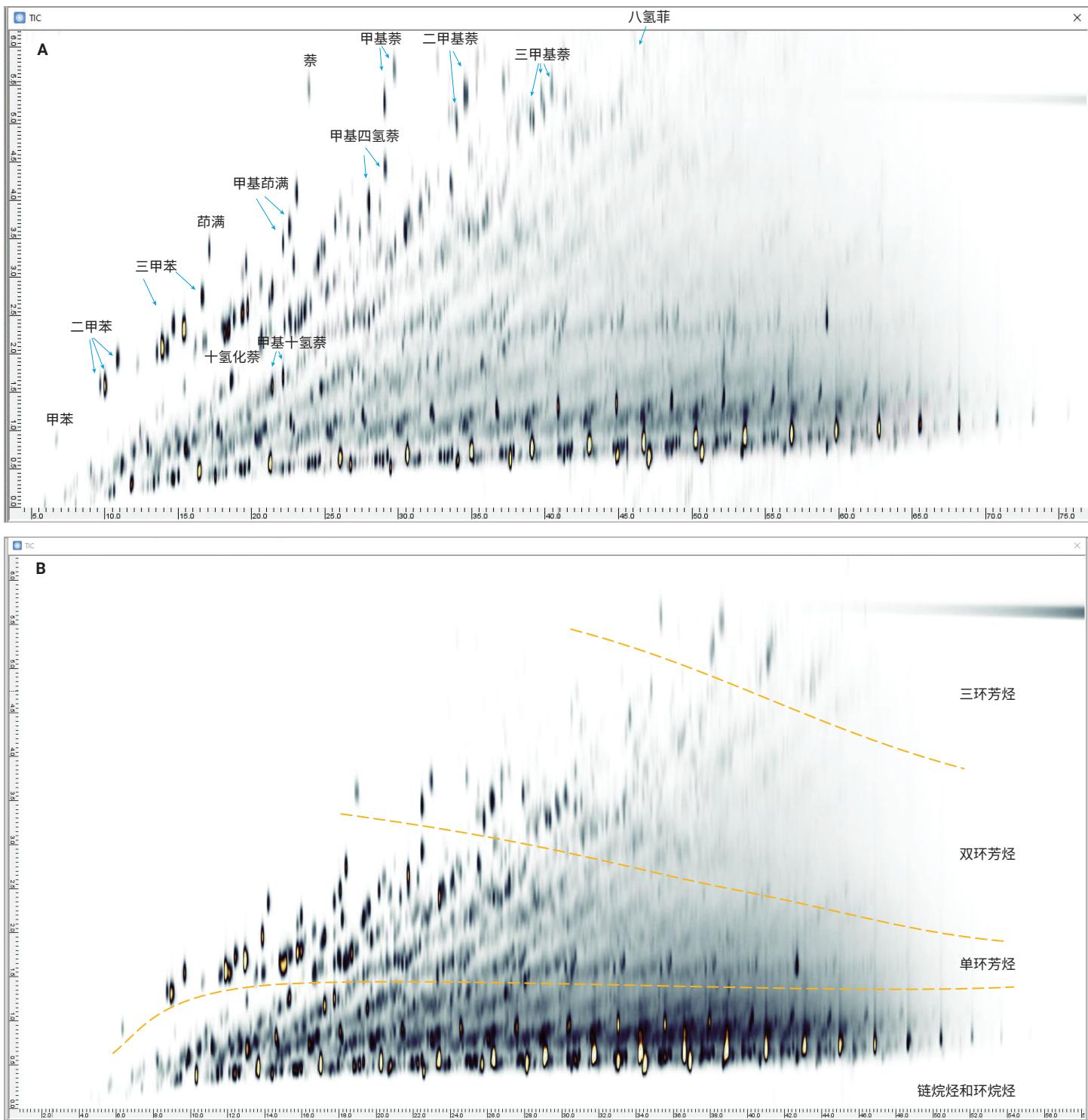


图 4. 使用吹扫分流器设置分离柴油。调制周期为 6.3 秒，柱温箱升温速率为 (A) $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 (B) $4.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$

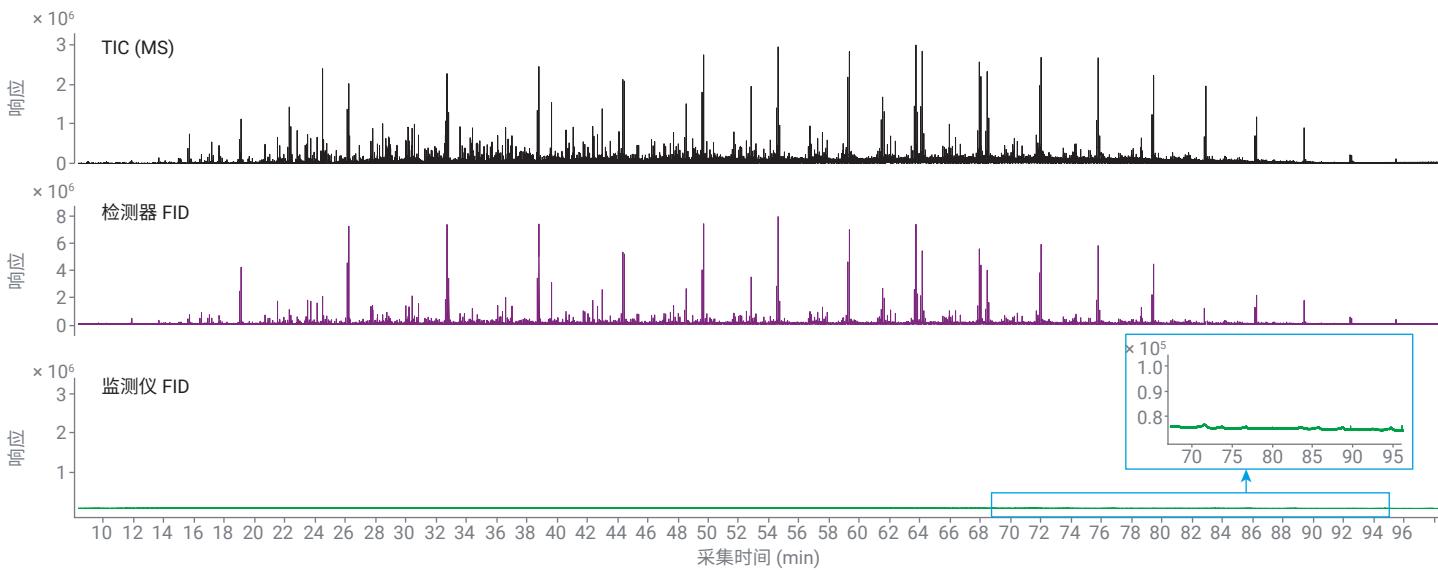


图 5. 来自 GC/Q-TOF MS 通道的柴油总离子流色谱图 (TIC) 以及来自末端检测器和监测仪 FID 通道的 FID 信号示例

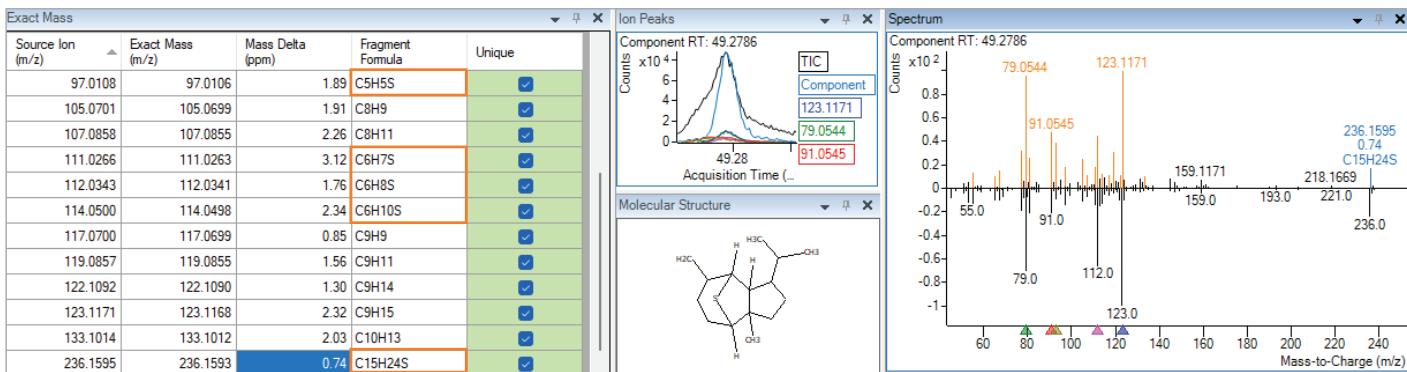
用于测定和比较精油成分的工作流程

使用带无吹扫分流器和吹扫分流器的 $\text{GC} \times \text{GC}$ RFM 配置，通过 GC/Q-TOF 系统分析生姜精油和杜松子精油（购自 Sigma-Aldrich）。两种方法的 $\text{GC} \times \text{GC}$ 分离效果相当。为了测定精油的化学成分，本研究使用未知物分析软件和 NIST23 谱库对化合物进行了 LRI 匹配鉴定。

为了进一步提高化合物鉴定的可信度，研究中使用了未知物分析软件中的 ExactMass 工具。该工具根据可能的谱库匹配情况，在较小的质量误差窗口内，从带有分子式的解卷积质谱图中确定精确质量数碎片归属。这一方法有助于确认匹配结果，或在出现假阳性结果的情况下拒绝化合物 ID（图 6）。

A α -Mintsulfide

Library match score: 90.4, RI Δ 13, m/z match ✓



B n-Propylcyclohexane
Library match score: 78.2, RI Δ 5, m/z mismatch

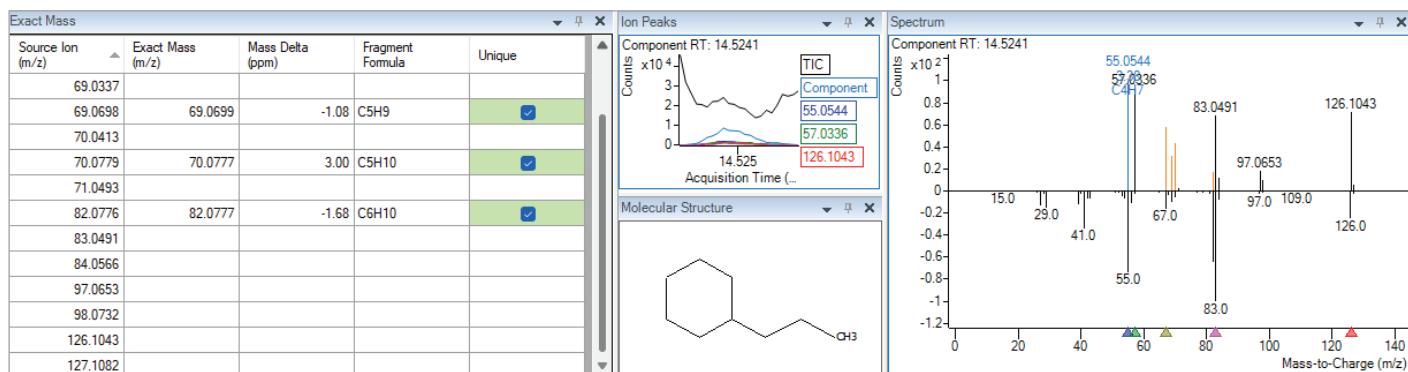


图 6. 在未知物分析工具中使用精确质量信息确认化合物 ID。未知物分析软件中的 ExactMass 工具 (A) 确认或 (B) 拒绝谱库匹配结果。该判定基于能否根据谱库匹配结果的元素组成，为谱图中特异性最高的精确质量碎片离子分配分子式。图 A 中的橙色矩形突出显示了含有杂原子硫的碎片离子的分子式标注

请注意，几个碎片离子的分子式标注（在图 6A 所示的谱库匹配中以橙色矩形突出显示）包含杂原子，本例中为硫。已确定归属的碎片分子式中存在杂原子，是另一个重要迹象，表明所鉴定的化合物元素组成可能是准确的。

通过在二维图上映射化合物的化学类别，进一步促进了精油中化合物的鉴定。这种 $GC \times GC$ 数据的可视化由 GC Image 软件实现（图 7）。如图 7A 所示，化合物类别在二维图上呈现清晰的聚类分布，且第一维和第二维中的特定坐标（保留时间）有助于为化合物结构提供更多线索。

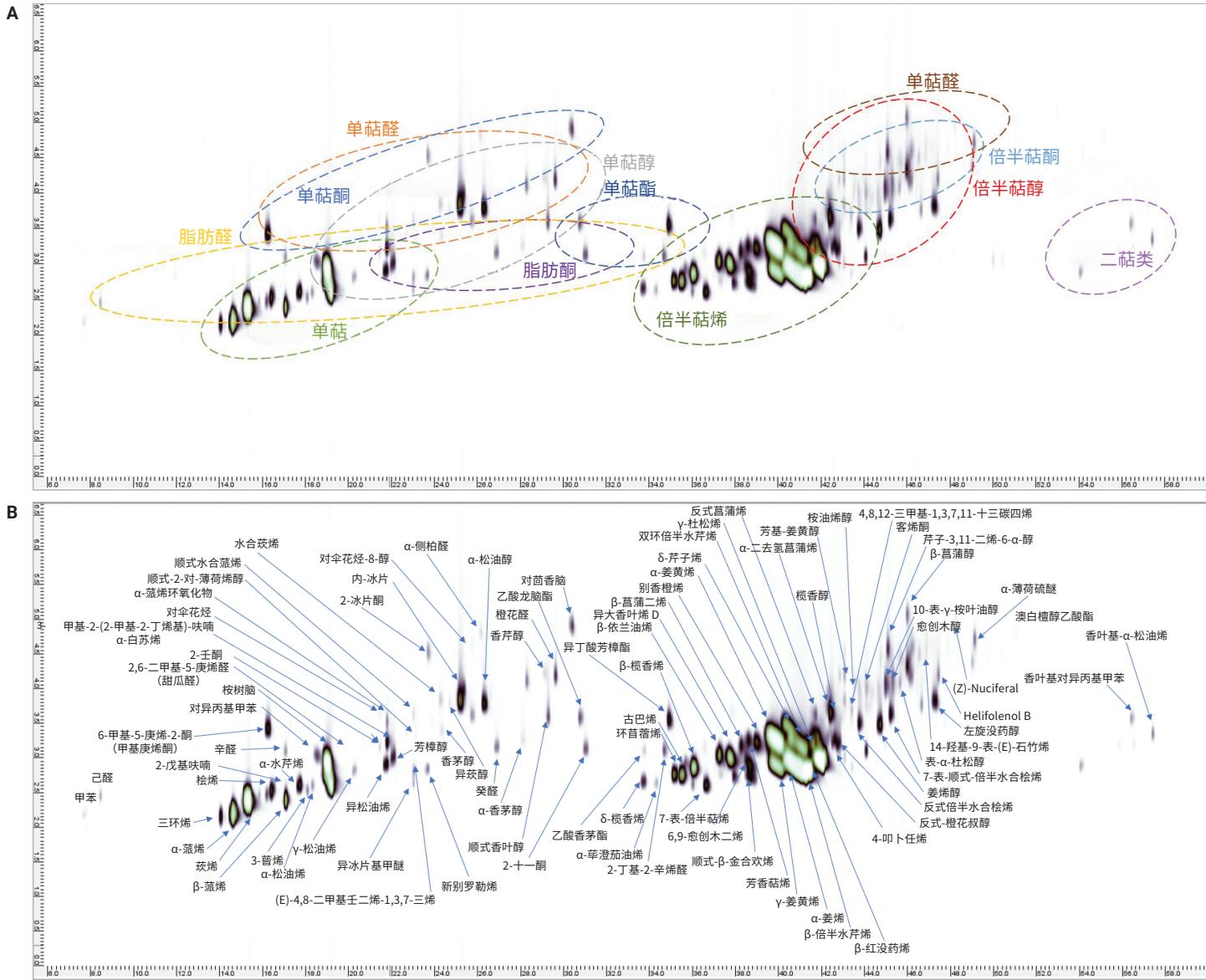


图 7. (A) 映射到生姜油样品二维色谱图上的化合物类别和 (B) 单个成分。调制周期为 6.7 秒，柱温箱升温速率为 $2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$

在二维色谱图上，位于同一垂直线上的化合物在第一维发生共洗脱。因此，如果不在第二维进行额外的色谱分离或使用不同极性的色谱柱，这些化合物很难得到准确鉴定。图 8 举例说

明了这种情况，图中显示了三种萜类化合物（来自同一调制周期）的第二维分离及其解卷积质谱图，从而实现了可靠的谱库匹配。

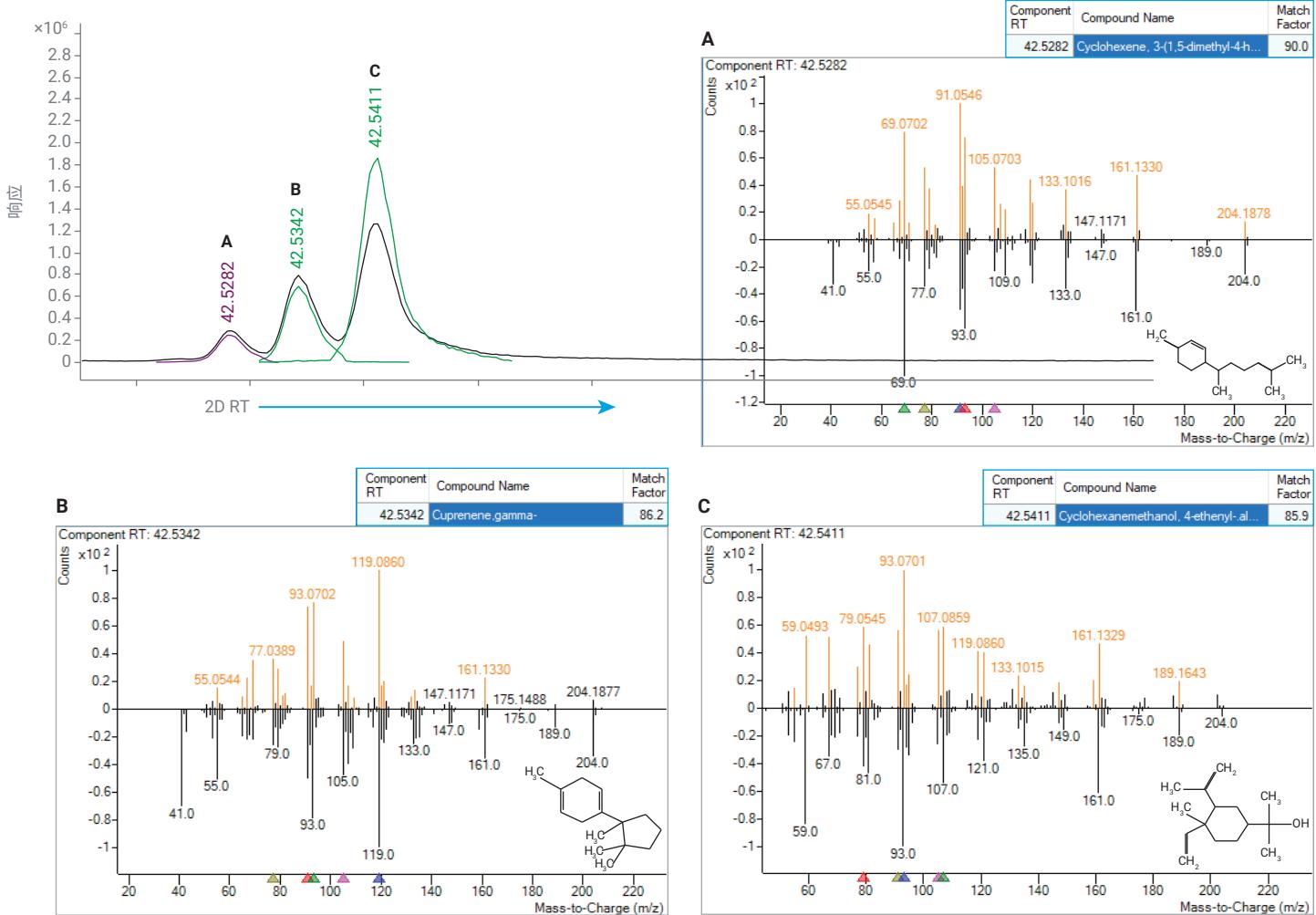


图 8. 从第二维同一调制中分离出的生姜油萜类化合物 (A、B 和 C)

精油样品中鉴定出的化合物类别包括脂肪醛/酮、单萜/单萜醛、酮/酯、倍半萜/倍半萜醇/倍半萜酮以及二萜。

当前方法还可以通过一次运行准确鉴定主要的精油成分 (如 α -姜烯) 和次要的痕量成分 (如 α -薄荷硫醚)。

GC × GC 技术的分离能力也有助于改善统计分析，尽管第二维的存在增加了数据处理的复杂程度。为便于统计分析，将化合物标注从未知物分析软件中导出为化合物交换格式 (CEF) 文

件，并导入 MPP 软件中。在 MPP 的比对过程中，由同一组分峰的多次调制产生的重复组分 IDs 会自动合并。

为了比较生姜油和杜松子油的成分，我们使用主成分分析 (PCA) 图来评估样品分组 (图 9)。生姜油和杜松子油样品表现出明显的聚集现象。

图 10 中的火山图显示，生姜油和杜松子油中约 150 种已鉴定化合物的含量存在显著差异。

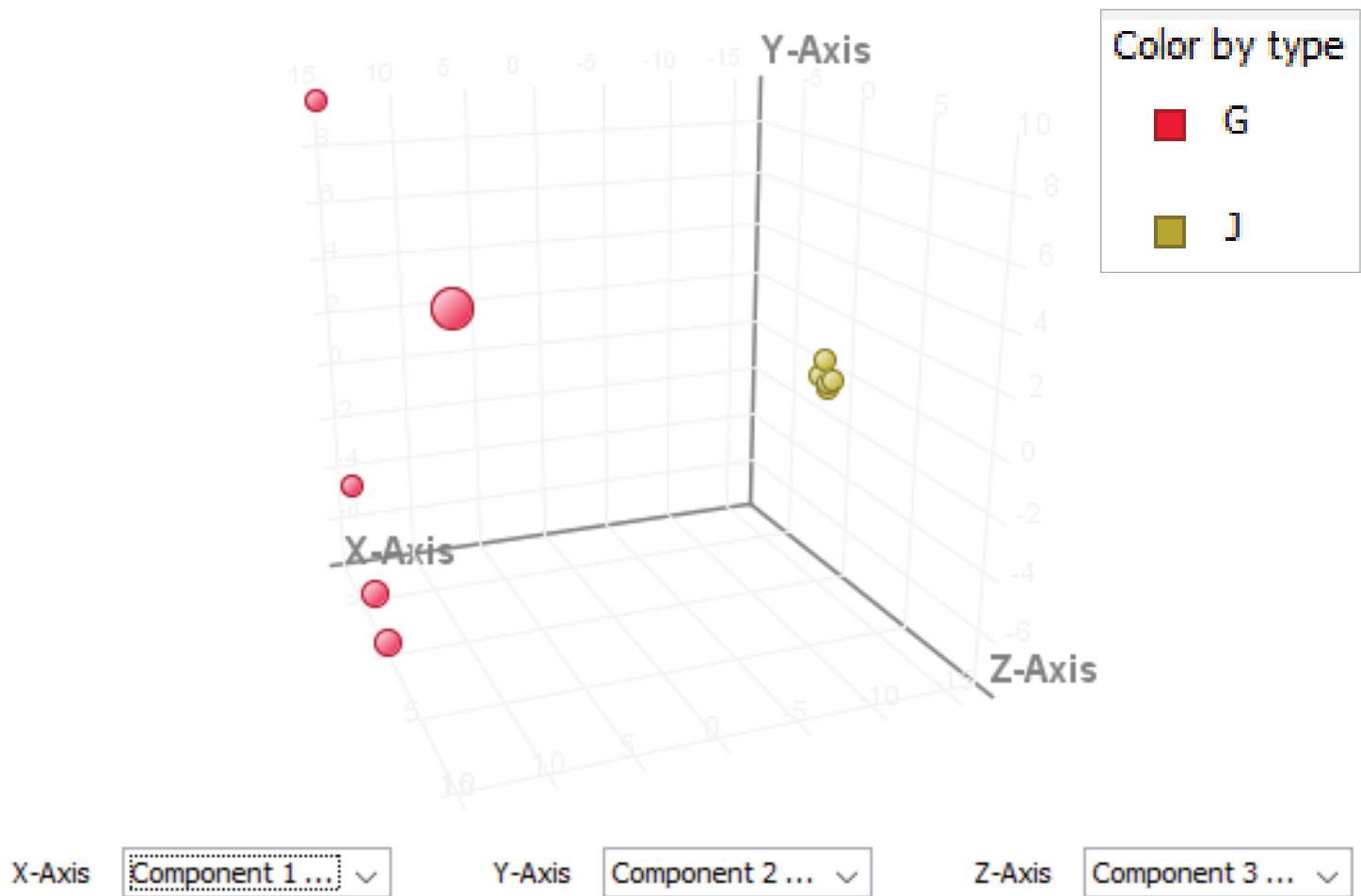


图 9. PCA 图清晰显示生姜油 (G) 和杜松子油 (J) 样品的聚集情况

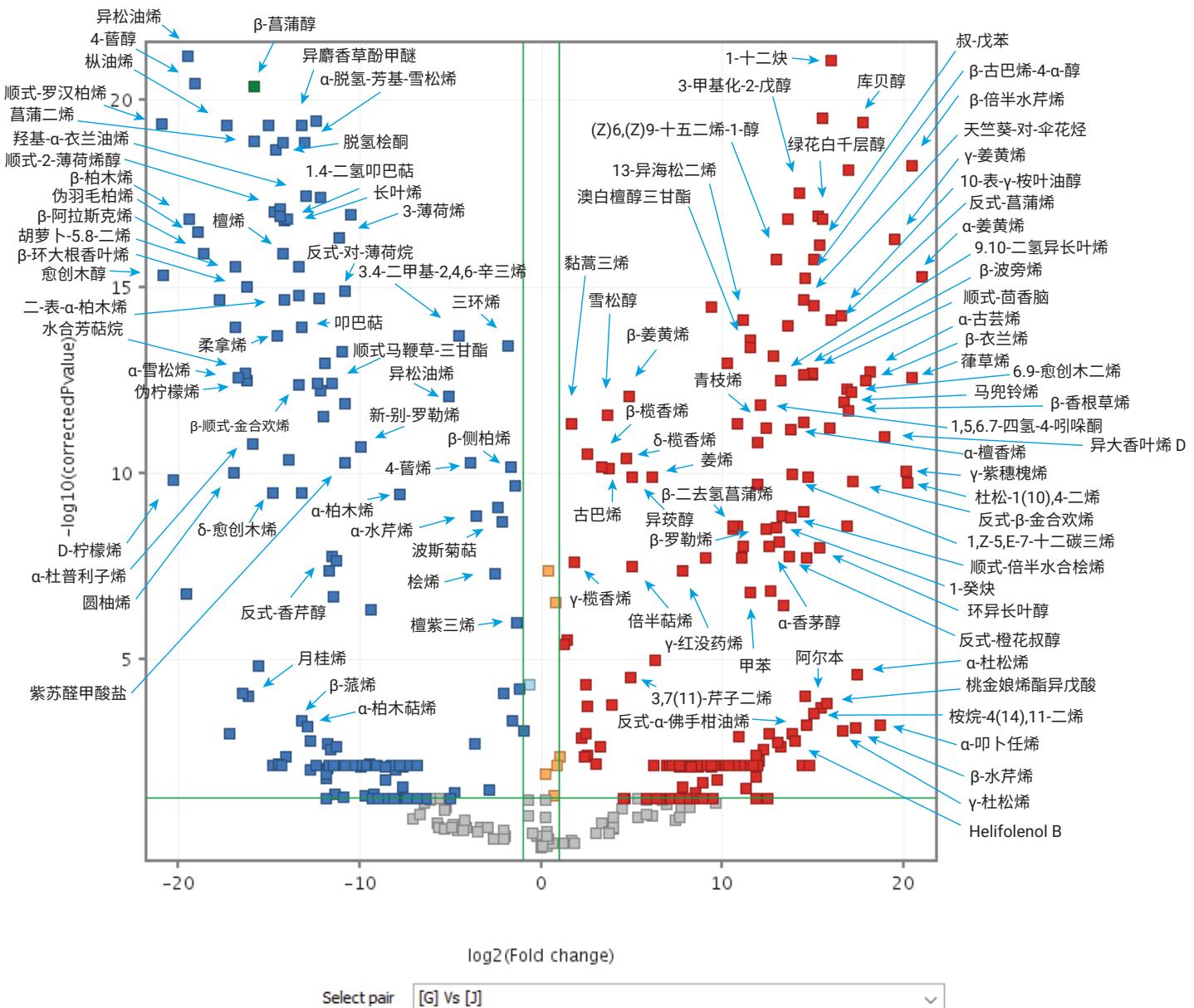


图 10. 生姜油和杜松子油的成分比较火山图，使用倍数变化临界值 2 和 p 值临界值 0.05

结论

本应用简报开发了一种使用几种配备反向流路调制器 (RFM) 的全二维 GC × GC 配置和高分辨率 Agilent 7250 GC/Q-TOF 系统进行精油分析的方法。使用柴油样品进行方法优化。使用未知物分析工具可靠鉴定了由 GC × GC 分离的精油成分。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件成功测定了精油之间化学成分的差异。

参考文献

1. International Organization for Standardization. ISO 9235:2013, Aromatic Natural Raw Materials - Vocabulary; ISO: Geneva, Switzerland, 2013. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en>
2. Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70(8). DOI: 10.1021/ac971184b
3. Agilent Reversed Flow Modulator. Capillary Flow Technology; Agilent Technologies technical overview, publication number **5994-0157EN**, 2018

致谢

我们衷心感谢 GC Image, LLC 提供的 GC Image GC×GC Edition 软件，为本研究提供了重要支持。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE-003420

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2025
2025 年 1 月 30 日, 中国出版
5994-8029ZHCN

