有机质谱及北京质谱中心介绍

熊少祥

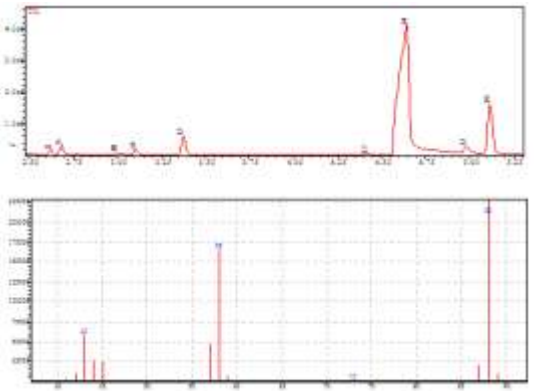
中国科学院化学研究所北京质谱中心

有机质譜仪的构成

GC
LC
直接进样探头

进样系统

四极杆 Quadrupole
四极离子阱 IT
扇形场 Sector
飞行时间管 TOF-MS
离子回旋共振池 ICR-MS



离子源 → 质量分析器 → 离子检测器 → 数据系统

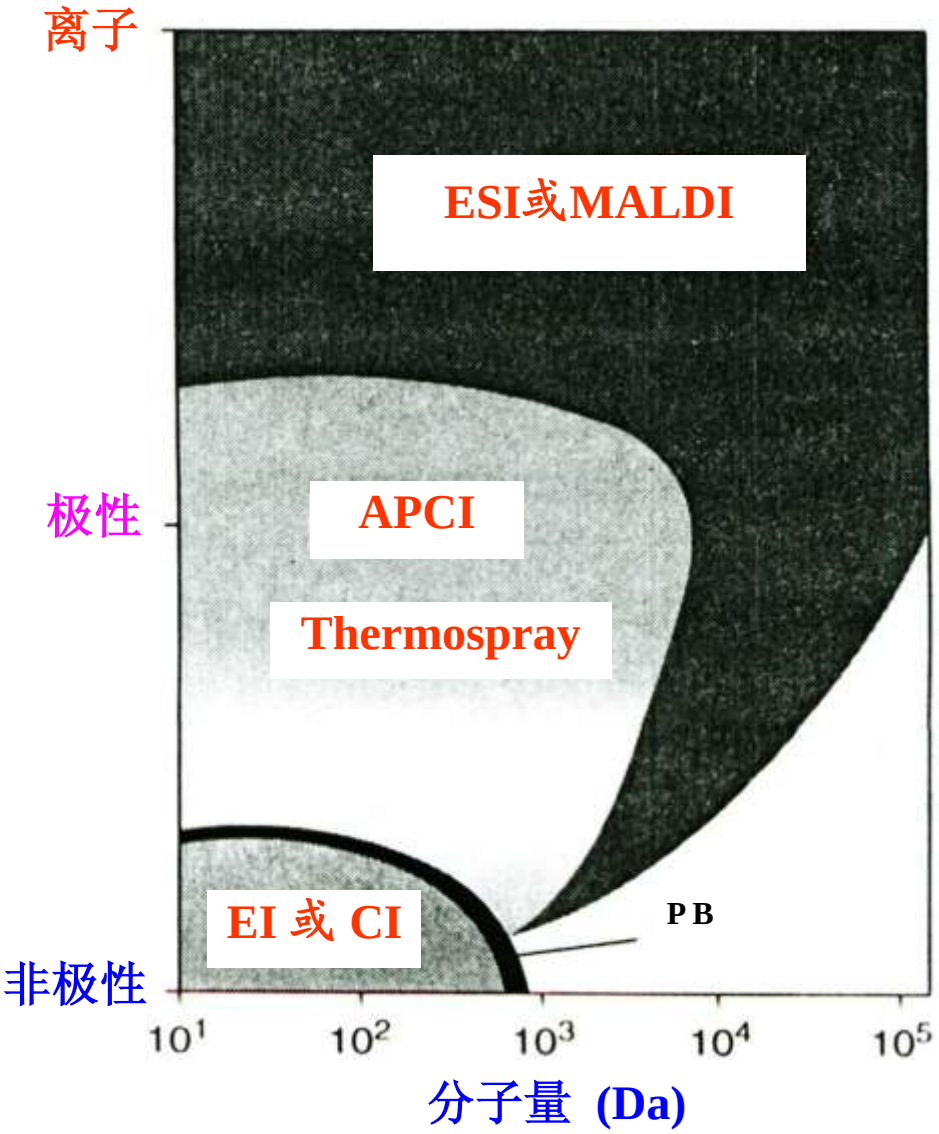
电子电离 EI
化学电离 CI
场解吸 FD(FI)
快原子轰击 FAB(LSIMS)
热喷雾 TS
粒子束 BP
电喷雾 ESI
大气压化学电离 APCI
基质辅助激光解吸电离 MALDI

倍增器 SEM
微通道板 MCP

真空系统

涡轮泵(或扩散泵) 10^{-3} Pa
↓
旋转泵 10^{-1} Pa

各种离子化方法的使用范围



选择的依据

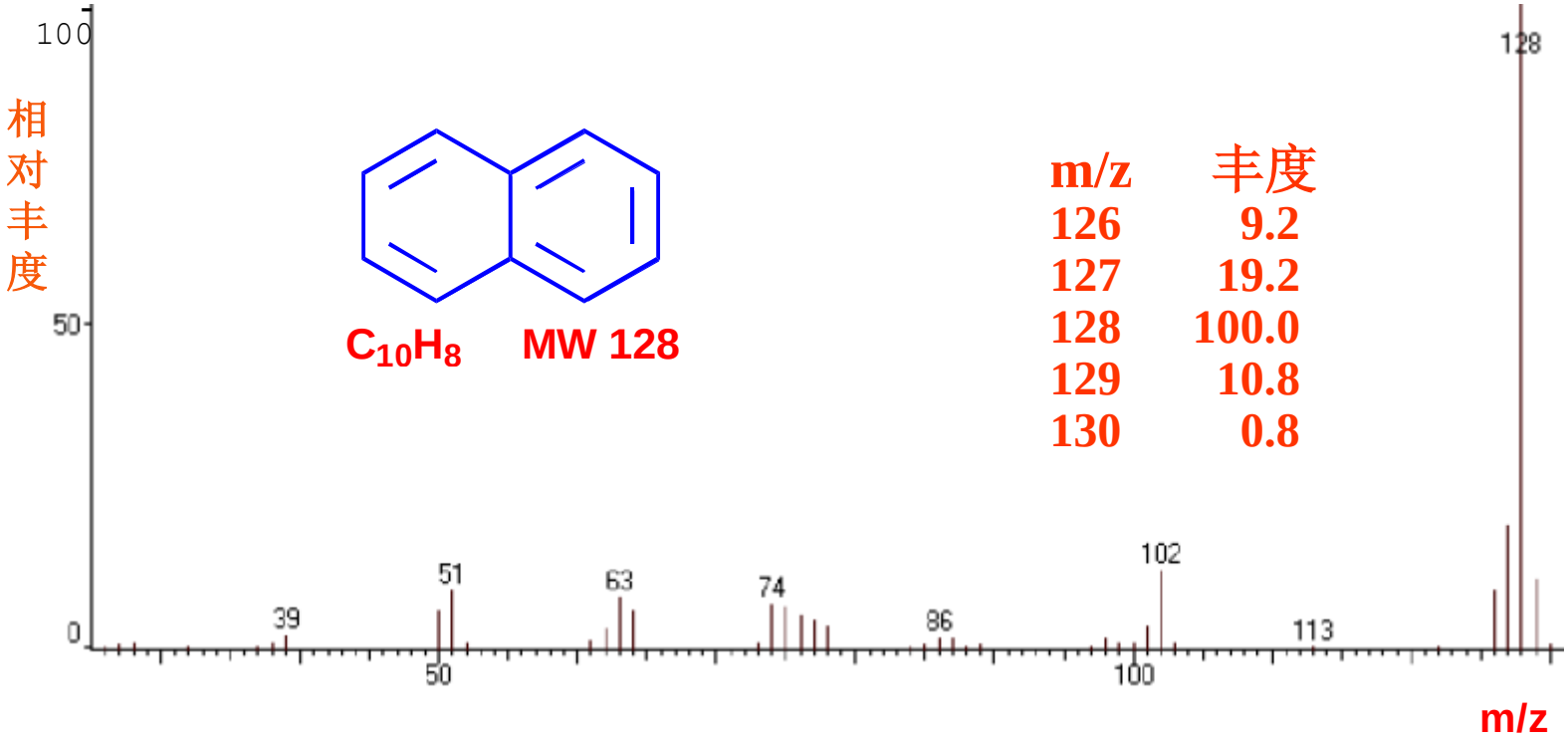
挥发性

热稳定性

极性

要求取得的结构信息

同位素峰



$C_{10}H_8$ MW 128

m/z	丰度
126	9.2
127	19.2
128	100.0
129	10.8
130	0.8

m/z 128 分子中 **10** 个碳全部都是 ^{12}C

m/z 129 分子中有 **1** 个碳是 ^{13}C

m/z 130 分子中有 **2** 个碳是 ^{13}C

有机质谱中常见同位素的天然丰度

A		A+1		A+2	
元素	丰度 %	元素	丰度 %	元素	丰度 %
^{1}H	100	^{2}H	0.012		
^{12}C	100	^{13}C	1.1		
^{14}N	100	^{15}N	0.37		
^{16}O	100	^{17}O	0.04	^{18}O	0.20
^{19}F	100				
^{28}Si	100	^{29}Si	5.1	^{30}Si	3.4
^{31}P	100				
^{32}S	100	^{33}S	0.80	^{34}S	4.5
^{35}Cl	100			^{37}Cl	32.0
^{79}Br	100			^{81}Br	97.3
^{127}I	100				

* O, Si, S, Cl, Br 可称为 A+2 元素

同位素峰的丰度

$^{12}CH_3 - O - {}^{12}CH_2 - {}^{12}CH_3$ (全为^{12}C)

m/z 60 (100%) A

$^{13}CH_3 - O - {}^{12}CH_2 - {}^{12}CH_3$ (含一个^{13}C)

m/z 61 (1.1%) A+1

$^{12}CH_3 - O - {}^{13}CH_2 - {}^{12}CH_3$ (含一个^{13}C)

m/z 61 (1.1%) A+1

$^{12}CH_3 - O - {}^{12}CH_2 - {}^{13}CH_3$ (含一个^{13}C)

m/z 61 (1.1%) A+1

^{17}O 对 (A+1) 峰的贡献仅为 0.04%，可以忽略

因此 m/z 61 的相对丰度应为：

(1.1 + 1.1 + 1.1)% = 3(1.1)% = 3.3%。

概率与同位素峰丰度

假如一个分子中有 3 个碳：C1，C2，C3

设：　^{12}C 丰度 = a，^{13}C 丰度 = b

则出现

$^{12}C1, ^{12}C2, ^{12}C3$ 的概率 = a^3	A 峰丰度 = a^3	
$^{13}C1, ^{12}C2, ^{12}C3$ 的概率 = a^2b	A+1 峰	→ 丰度 = $3a^2b$
$^{12}C1, ^{13}C2, ^{12}C3$ 的概率 = a^2b	A+1 峰	
$^{12}C1, ^{12}C2, ^{13}C3$ 的概率 = a^2b	A+1 峰	
$^{13}C1, ^{13}C2, ^{12}C3$ 的概率 = ab^2	A+2 峰	→ 丰度 = $3ab^2$
$^{13}C1, ^{12}C2, ^{13}C3$ 的概率 = ab^2	A+2 峰	
$^{12}C1, ^{13}C2, ^{13}C3$ 的概率 = ab^2	A+2 峰	
$^{13}C1, ^{13}C2, ^{13}C3$ 的概率 = b^3	A+3 峰丰度 = b^3	

二项式 $(a+b)^3 = a^3 + 3a^2b + 3ab^2 + b^3$ 的展开式中各项与上述 A，A+1，A+2，A+3 峰的出现概率相符合，十分便于记忆。

计算同位素峰丰度

按二项式的展开式计算某同位素峰的丰度：

$$(a+b)^n = a^n + na^{n-1}b + n(n-1)a^{n-2}b^2/2! + n(n-1)(n-2)a^{n-3}b^3/3! + \ldots\ldots + b^n$$

- ★ a 为轻同位素的丰度
- ★ b 为重同位素的丰度
- ★ n 为分子式中该元素的原子数目

只含轻同位素峰的丰度，　$A = a^n$

含一个重同位素峰的丰度，$A+1 = na^{n-1}b$

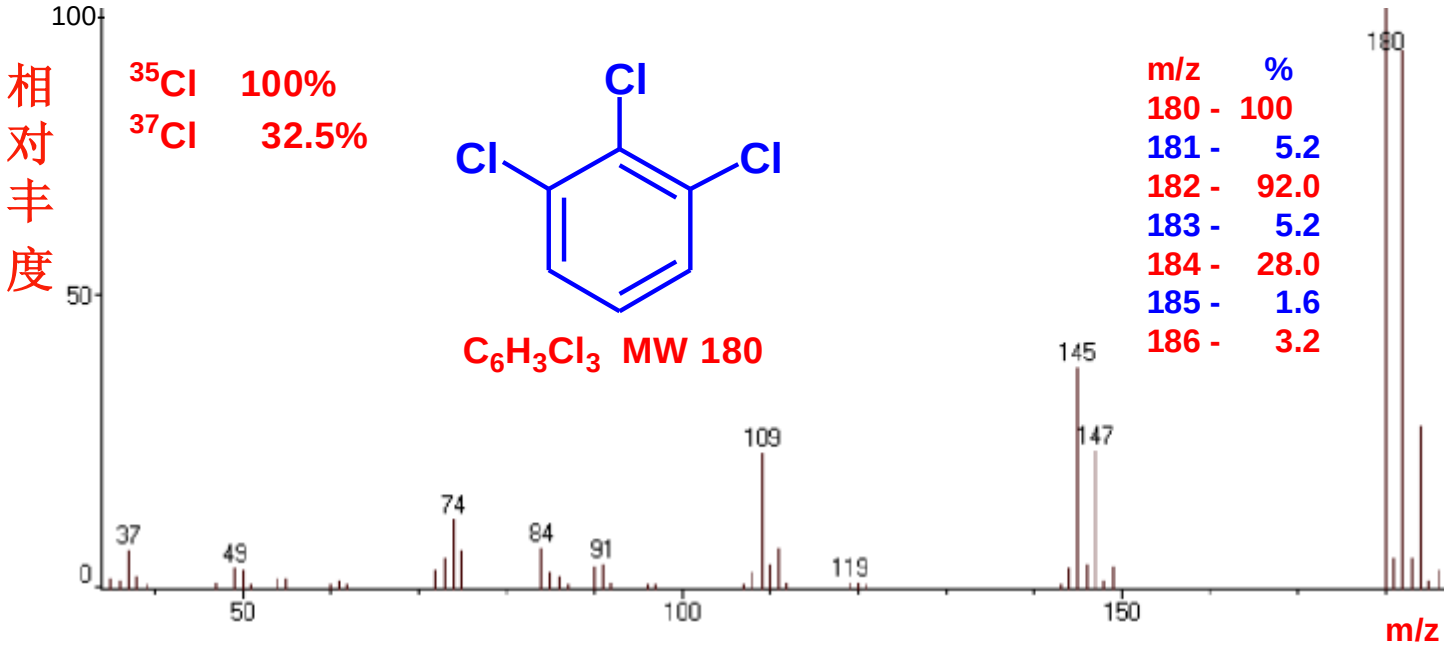
含两个重同位素峰的丰度，$A+2 = n(n-1)a^{n-2}b^2/2!$

含三个重同位素峰的丰度，$A+3 = n(n-1)(n-2)a^{n-3}b^3/3!$

……

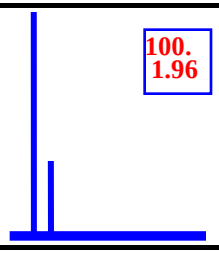
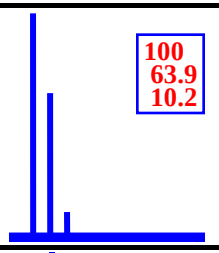
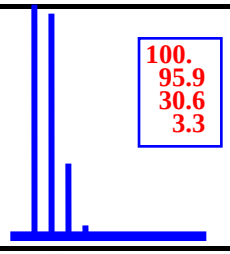
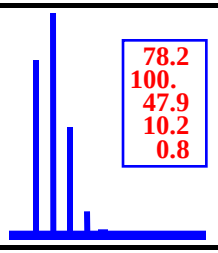
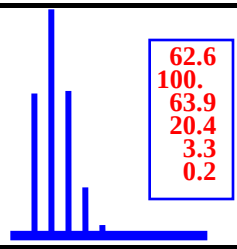
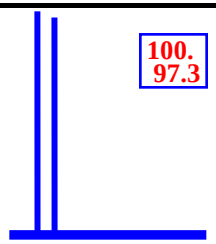
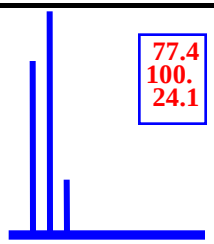
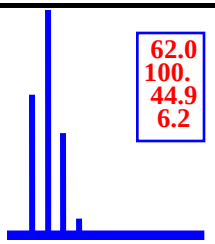
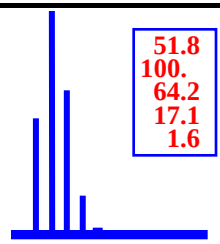
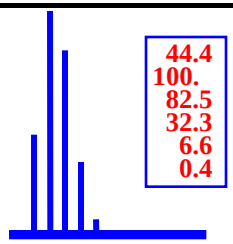
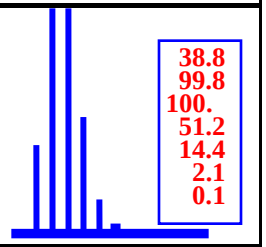
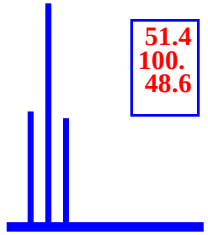
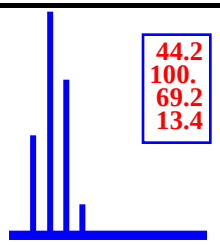
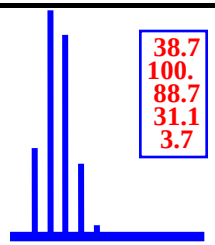
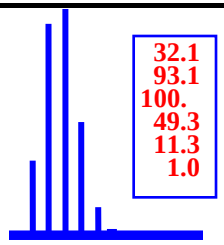
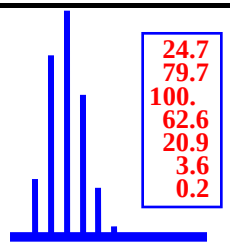
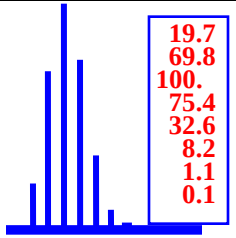
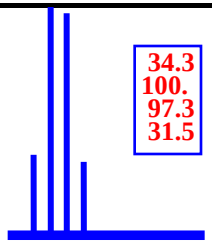
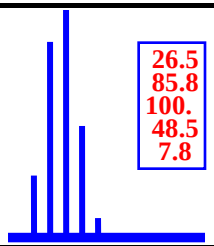
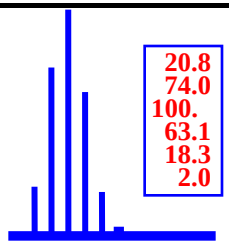
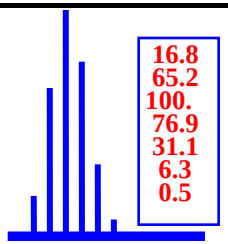
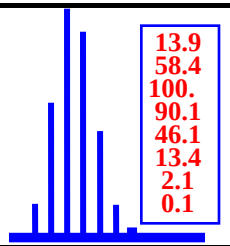
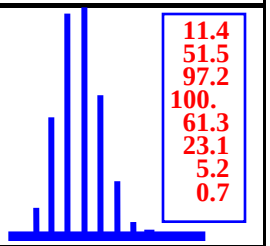
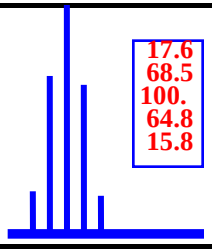
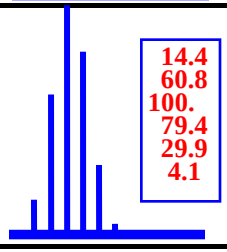
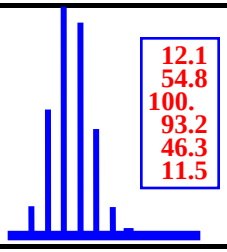
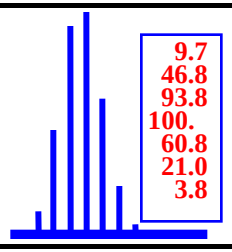
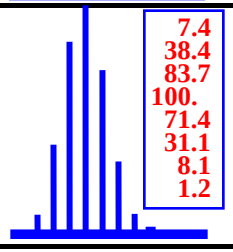
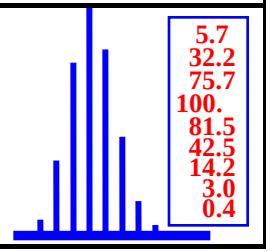
含 n 个重同位素峰的丰度，$A+n = b^n$

计算同位素峰丰度的例子(含有多个卤素)

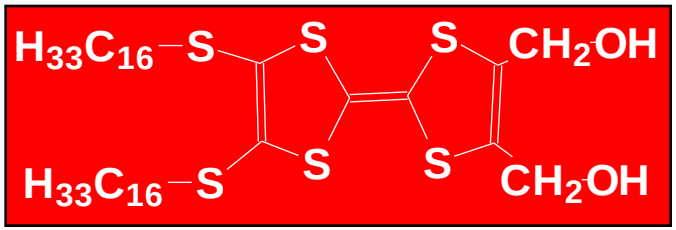


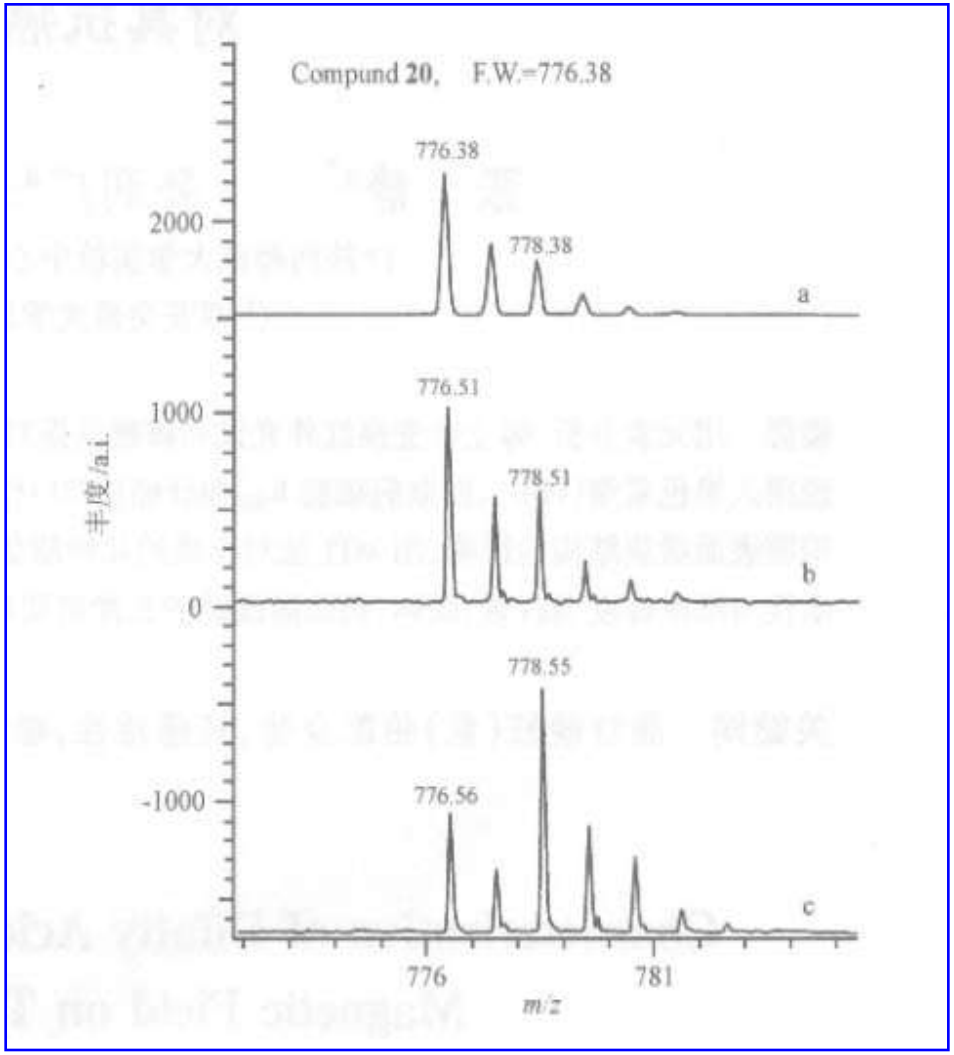
	^{13}C	^{37}Cl	总和
A+1 (181)	6(1.1) = 6.6		6.6 (181)
A+2 (182)	$6(5)(1.1)^2/2/100 = 0.18$	3(32.5) = 97.5	97.7 (182)
A+3 (183)	6.4 (m/z 182 的 ^{13}C 峰对 m/z 183 的贡献)		6.4 (183)
A+4 (184)		$3(32.5)^2/100 = 31.7$	31.7 (184)

氯和溴组合的天然同位素丰度的分布模式

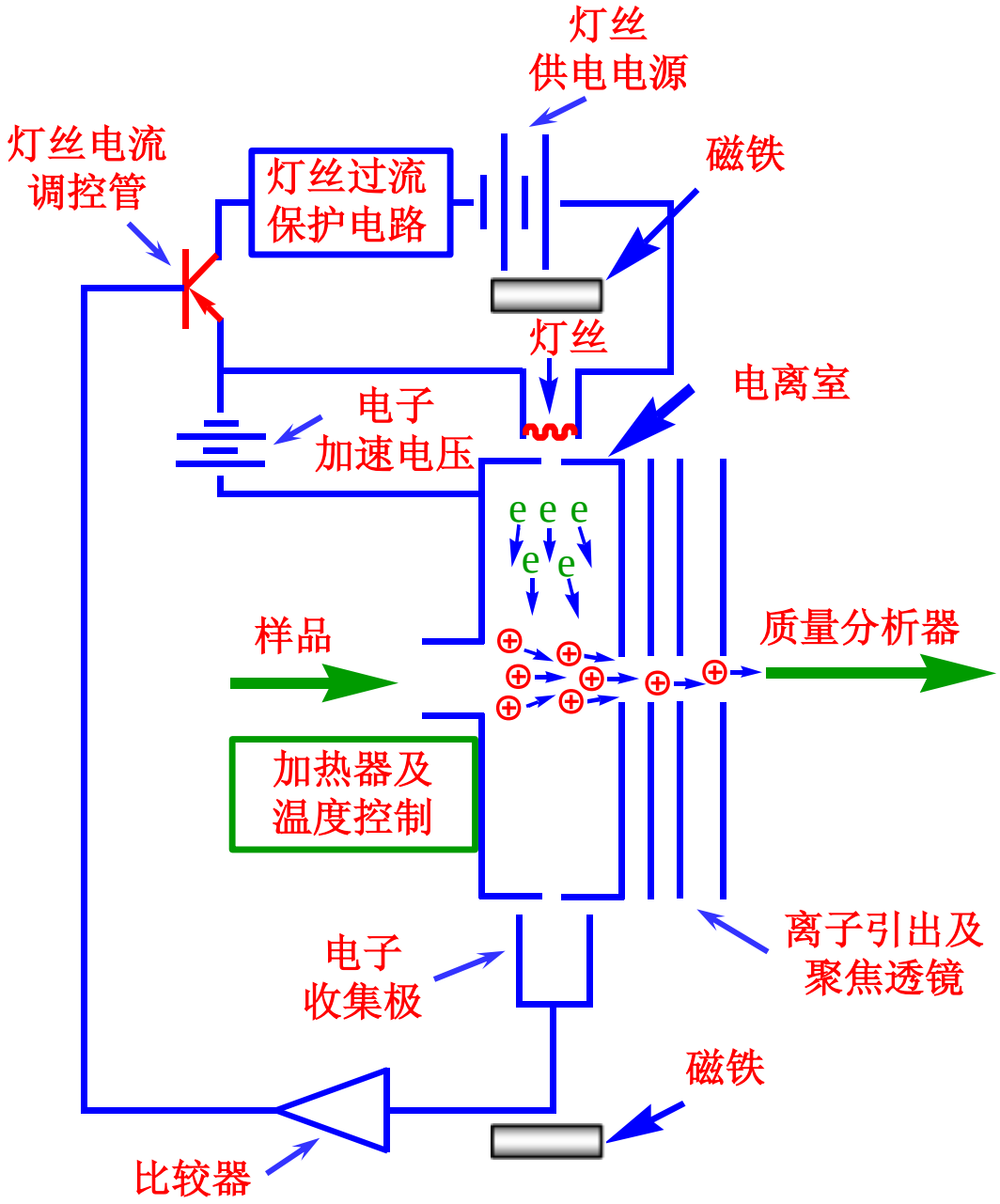
Cl / Br	0	1	2	3	4	5
0						
1						
2						
3						
4						

同位素峰丰度的应用实例（反映合成情况）





EI 离子源



电子加速电压： 50 ～ 100 V

电离室压力： 10^{-2} ～ 10^{-3} Pa

生成离子的内能：1 ～20 eV

优势：

已发展了半个多世纪

积累了大约 20 万张质谱图

是快速鉴定混合物组分的手段

局限性：

要求样品能气化

(样品蒸气压 > 10^{-2} Pa)

往往无分子峰

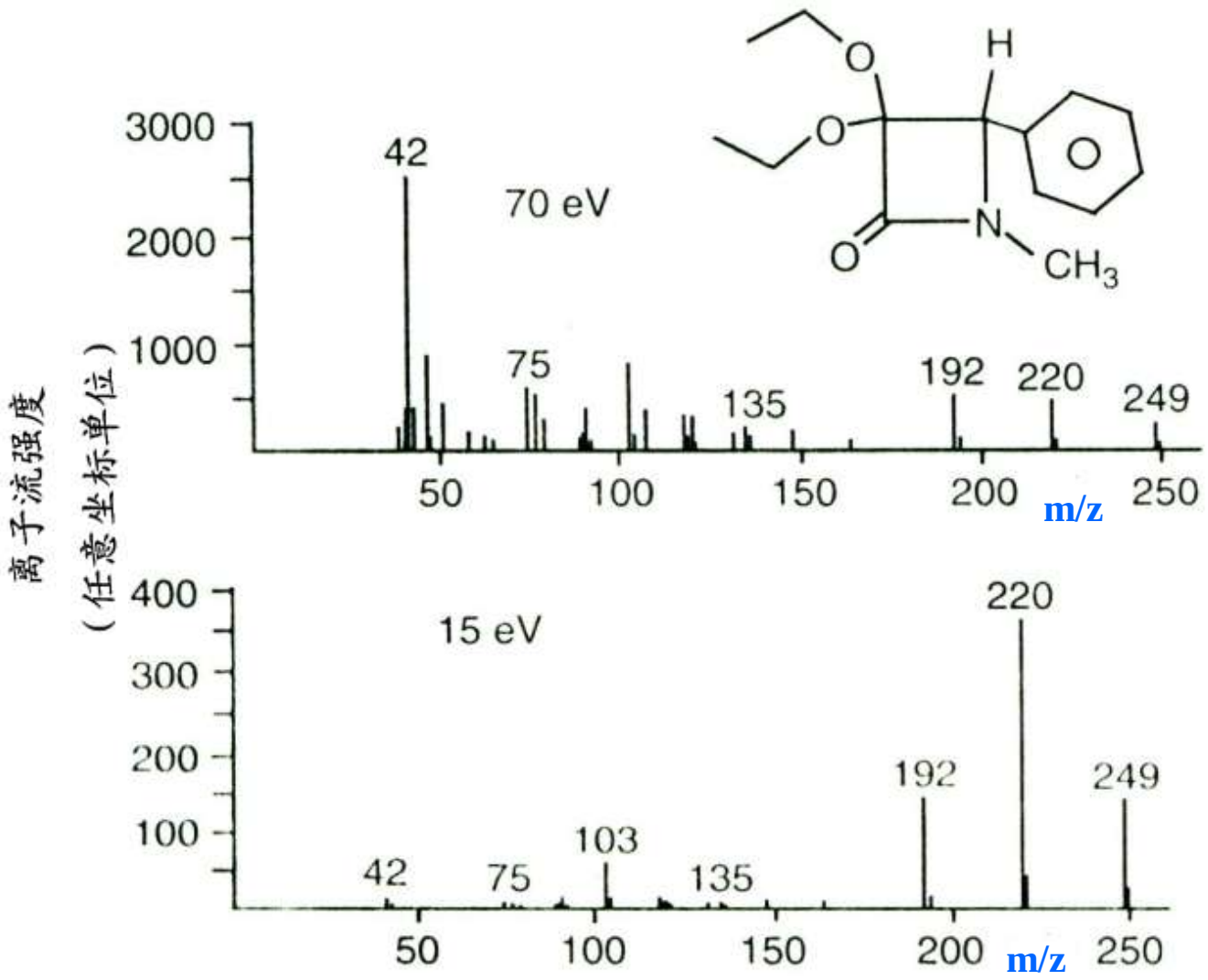
(降低电子动能无助于获得分子峰)

负离子 EI 灵敏度极低

GC/MS的应用特点

- 快速鉴定有机混合物的组分(高通量)
- 对GC分离的要求较低 (重叠峰的分解)
- 定量分析的高可靠性(特征离子质量色谱图)

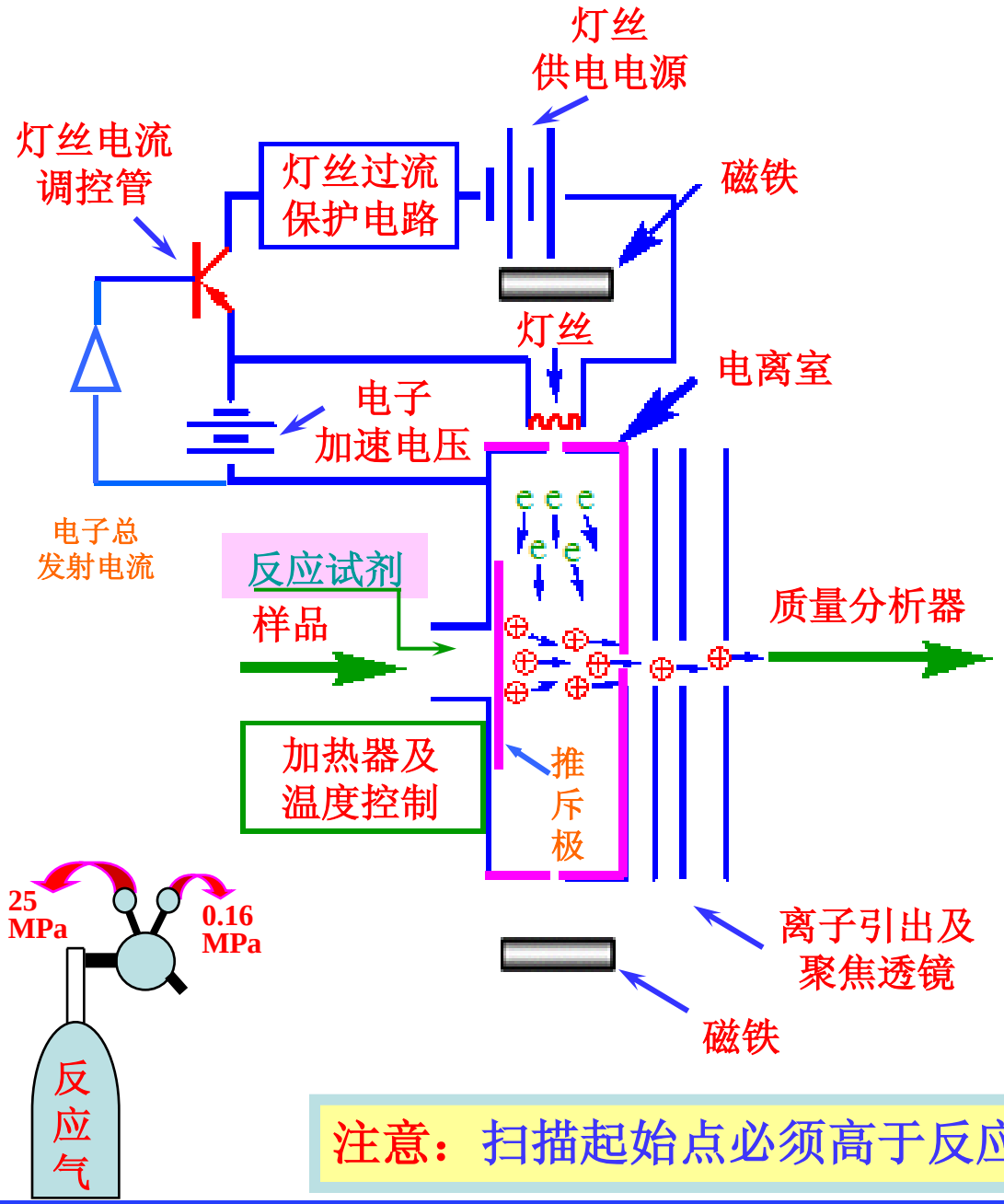
电子动能对EI质谱图的影响



3,3-二乙氧基-1-甲基-4-苯基-氮杂环丁烷-2-酮

分别在70V和15V电子加速电压下得到的两张质譜图

CI 离子源



工作原理：

离子(反应试剂)/分子反应

电离室压力：

～ 50 Pa (0.5 Torr)

平均自由程 ～ 0.1 mm

充分发生碰撞

电离室通道的孔径：

50 ～100 λm

甲烷	$I_{35} / I_{18} = 0.05$
异丁烷	$I_{57} / I_{43} = 1$
氨	$I_{35} / I_{18} = 0.05$

注意：扫描起始点必须高于反应离子质量数

甲烷作为反应试剂

$$CH_4 \xrightarrow{-e} CH_4^{+\cdot} \longrightarrow CH_3^+ + \bullet H$$

m/z 16　　m/z 15

$$CH_4 + CH_4^{+\cdot} \longrightarrow CH_5^+ \text{ (反应离子)} + \bullet CH_3 \text{ (质子转移)}$$

m/z 17

$$CH_4 + CH_3^+ \longrightarrow C_2H_5^+ \text{ (反应离子)} + H_2$$

m/z 29

$$M + CH_5^+ \longrightarrow [M+H]^+ + CH_4 \quad [M \cdots H^+\text{-}CH_4 \longrightarrow M\text{-}H^+ \cdots CH_4]$$

m/z = M+1

$$M + C_2H_5^+ \longrightarrow [M\text{-}C_2H_5^+] \text{ (加合离子)}$$

m/z = M+29

CH_4 质子亲合能 (Proton Affinity) PA　　543 kJ/mol

甘油 (Glycerol)　　PA　　874.8 kJ/mol

差值： (874.8-543) kJ/mol = 331.8 kJ/mol ≒ 3.4 eV (内能)

异丁烷作为反应试剂

$iso\text{-}C_4H_{10} \longrightarrow C_4H_{10}^{+\cdot} \longrightarrow C_3H_7^{+} + CH_3$

m/z 58　　m/z 43

$iso\text{-}C_4H_{10} + C_3H_7^{+} \longrightarrow C_4H_9^{+}$ (反应离子)+ C_3H_8 (氢负离子转移)

m/z 57

$M + C_4H_9^{+} \longrightarrow [M+H]^{+} + C_4H_8$　$[M \cdots H^{+}\text{-}C_4H_8 \longrightarrow M\text{-}H^{+} \cdots CH4]$

m/z = M+1

$M + C_4H_9^{+} \longrightarrow [M\text{-}C_4H_9^{+}]$（加合离子）

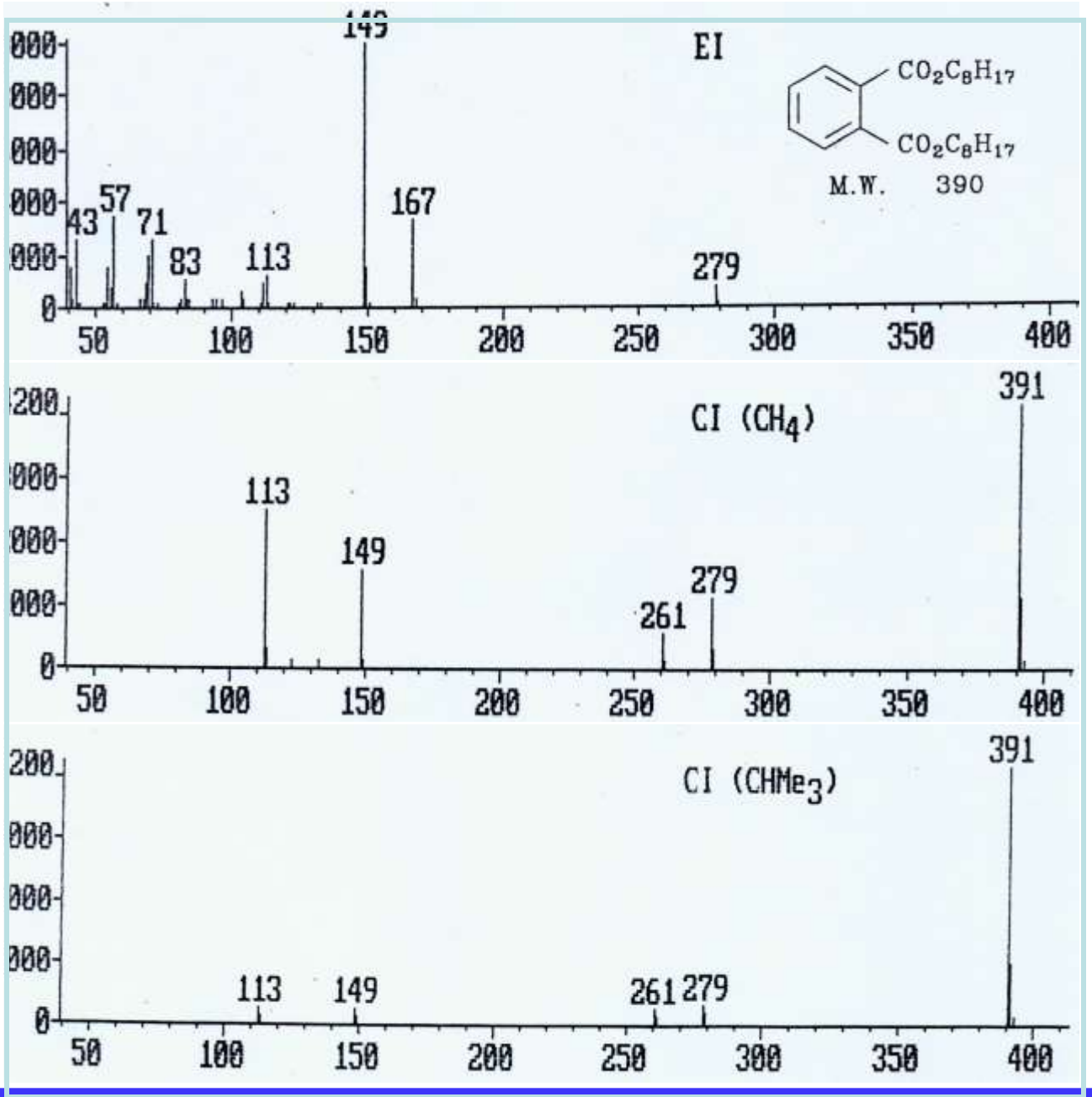
m/z = M+57

$iso\text{-}C_4H_8$ 质子亲合能 (Proton Affinity) PA　802.1 kJ/mol

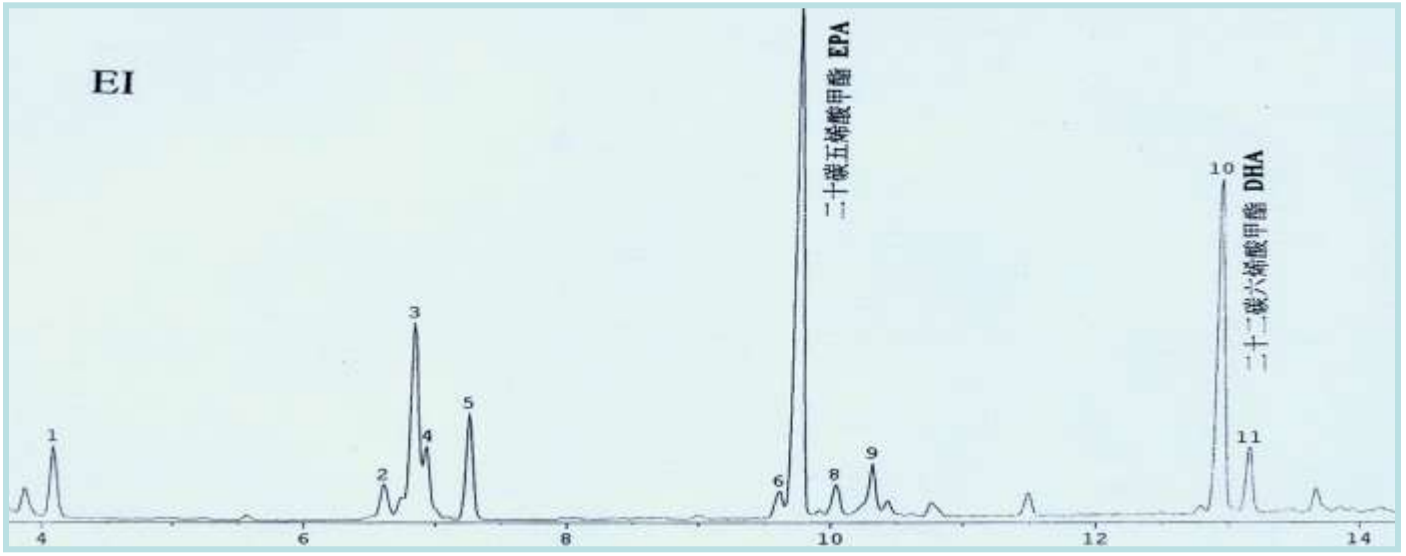
甘油 (Glycerol)　PA　874.8 kJ/mol

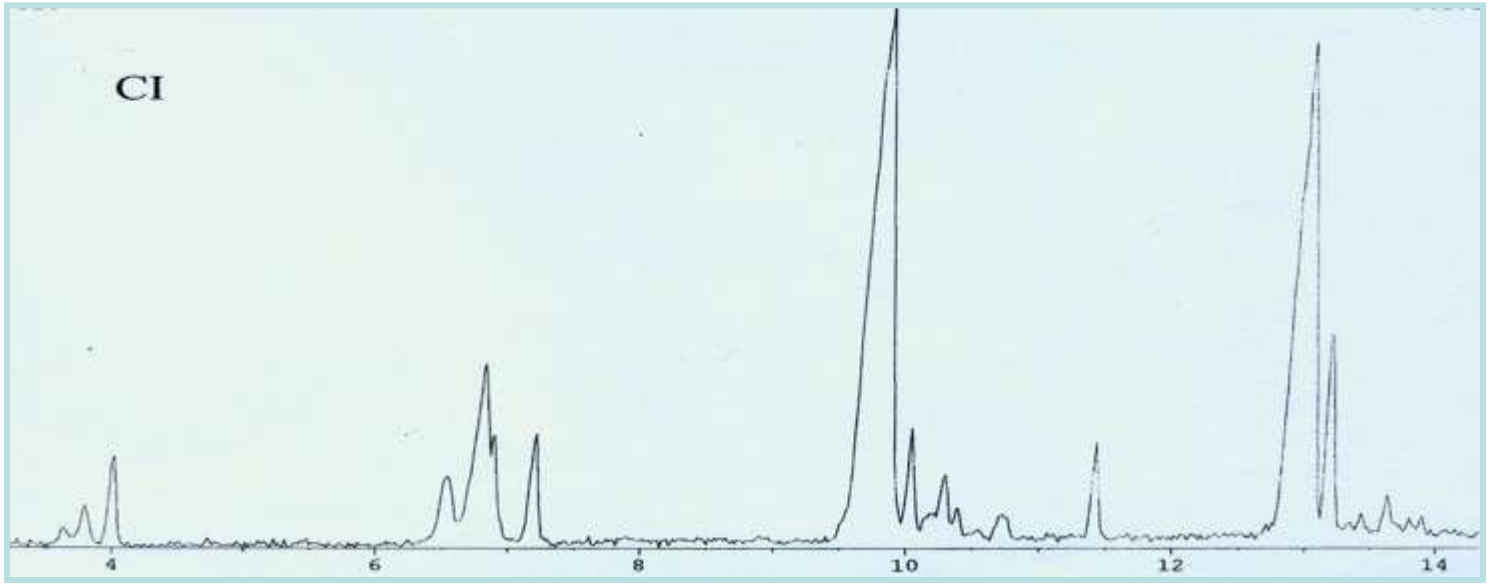
差值：(874.8-802.1) kJ/mol = 72.7 kJ/mol ≒ 0.75 eV(内能)

邻苯二甲酸二辛酯的 EI 和 CI 质谱图

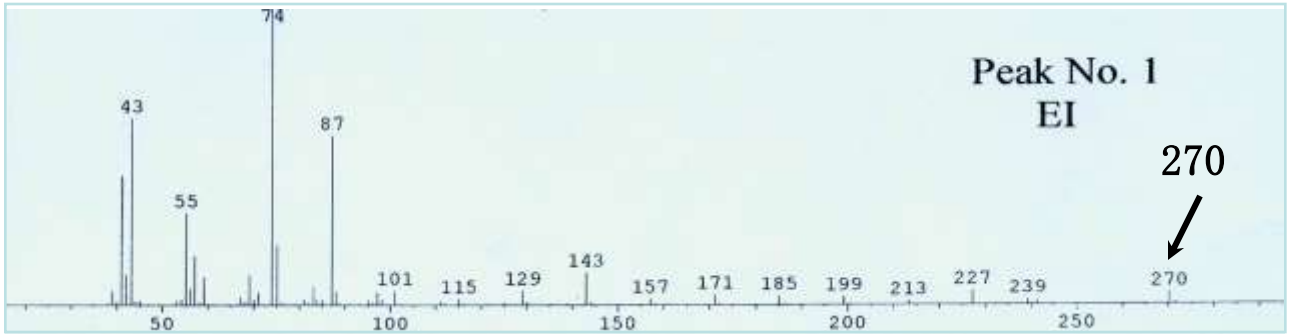


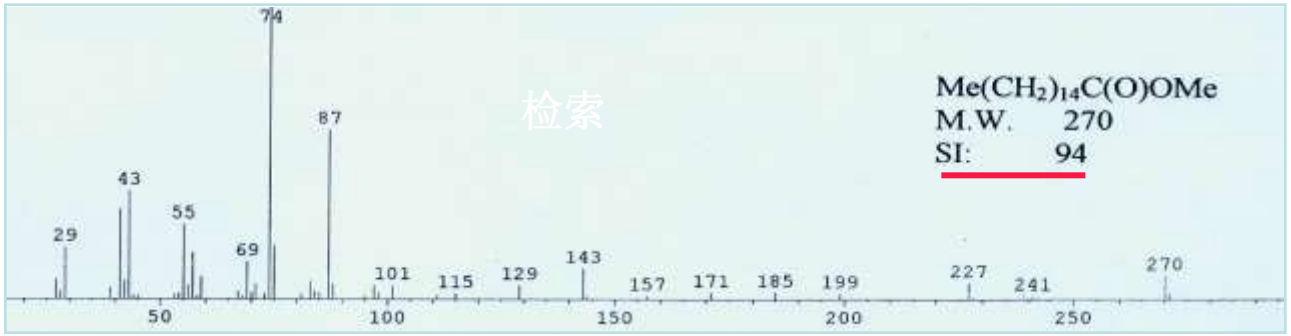
深海鱼油(甲酯化) GC/EI-MS 及 GC/CI-MS 分析

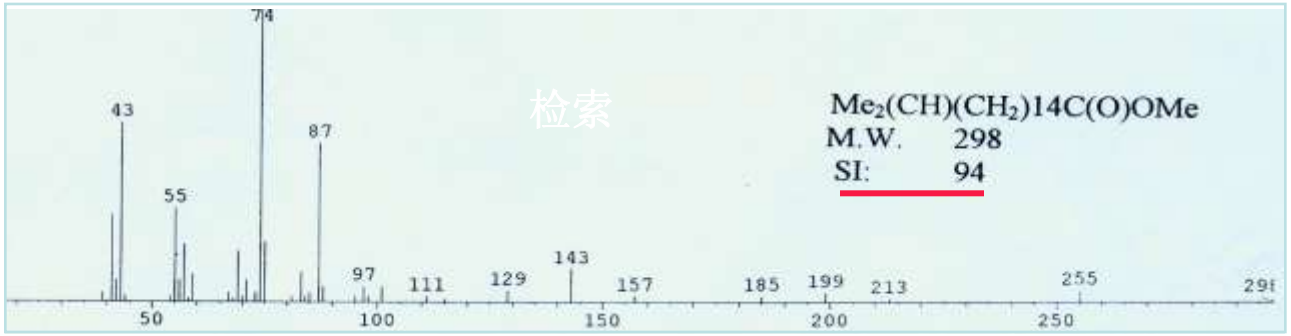


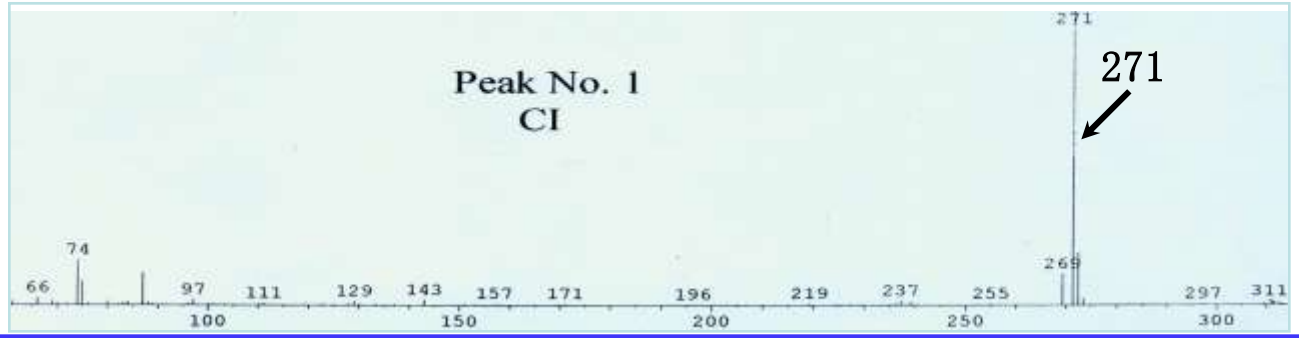


深海鱼油(甲酯化) GC/EI-MS 及 GC/CI-MS 分析

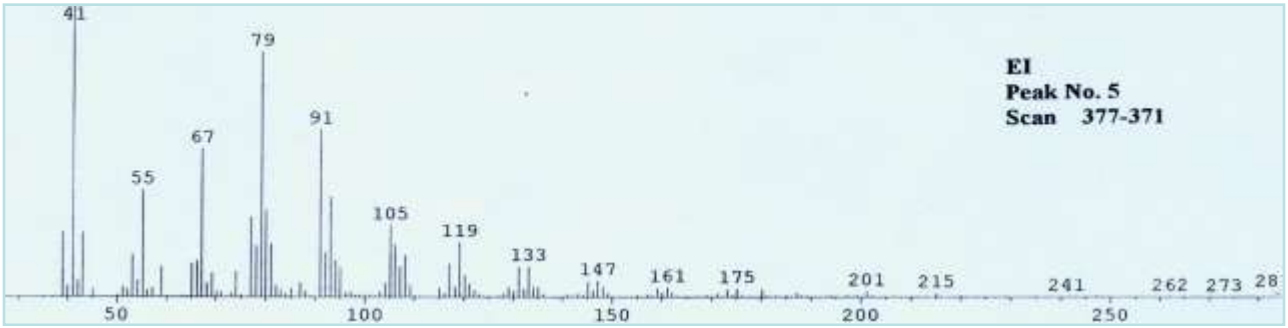


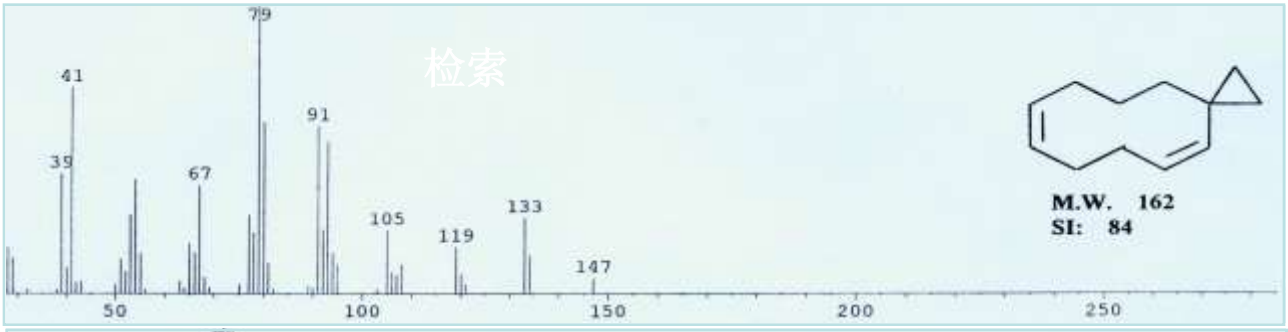


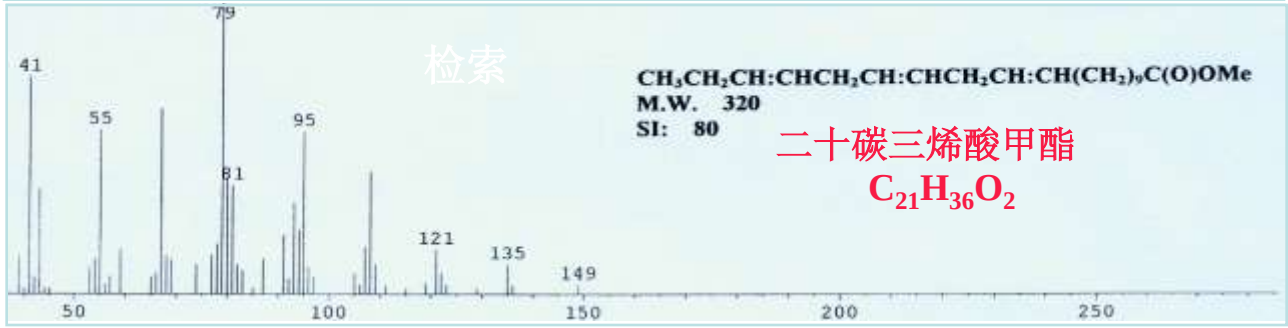


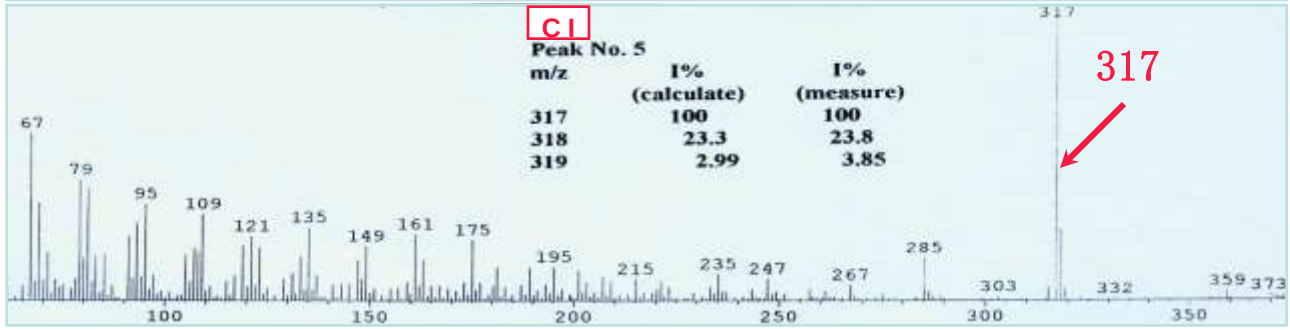


深海鱼油(甲酯化) GC/EI-MS 及 GC/CI-MS 分析









CI 反应类型

(1) 正离子 CI 反应类型

(a) 质子转移反应 $[M+1]^+$

(b) 氢负离子转移反应 $[M-1]^+$

(c) 形成加合离子

(d) 电荷交换反应 M^+

(e) 其它反应

一般：

含杂原子化合物出现 $[M+1]^+$

含多个稠环化合物出现 M^+

(2) 负离子 CI 反应类型

(a) proton abstraction $[M-1]^-$

$ABH + X^- \blacklozenge AB^- + HX$

(b) charge transfer M^-

$AB + X^- \blacklozenge AB^- + X$

(c) attachment

$AB + X^- \blacklozenge ABX^{--}$

(d) resonance capture

$AB + e \blacklozenge AB^-$

(e) ion pair production

$AB + e \blacklozenge A^+ + B^- + e$

(f) dissociative resonance capture

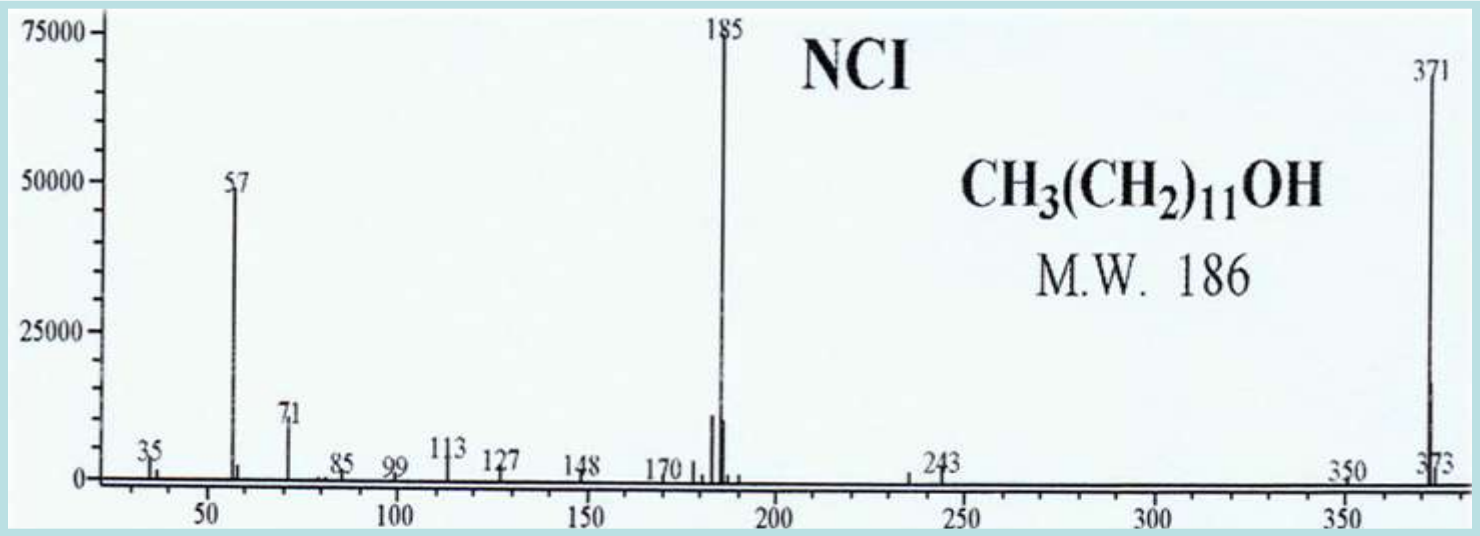
$AB + e \blacklozenge A^- + B\bullet$

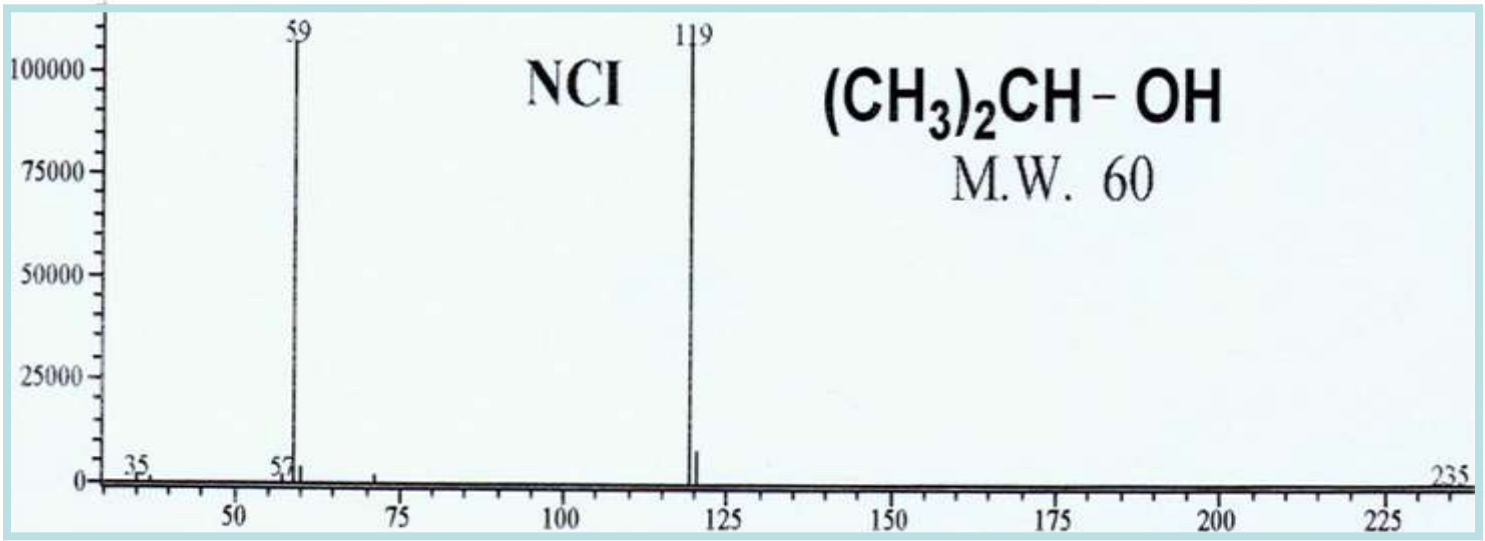
含氨基化合物 – 用正离子 CI 有利

有机酸、醇或含卤素化合物 – 用负离子 CI 有利

发展趋势：不仅为了获取分子量信息，可用于确定官能团及其位，空间异构体

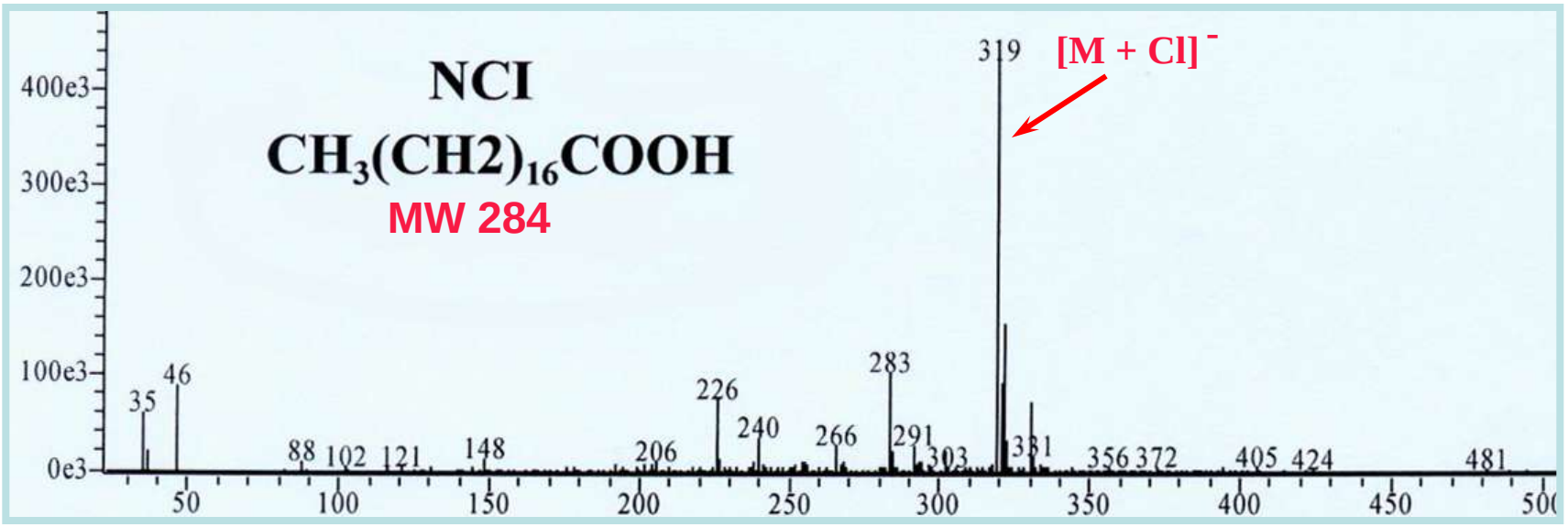
脂肪醇的负 CI 质谱图

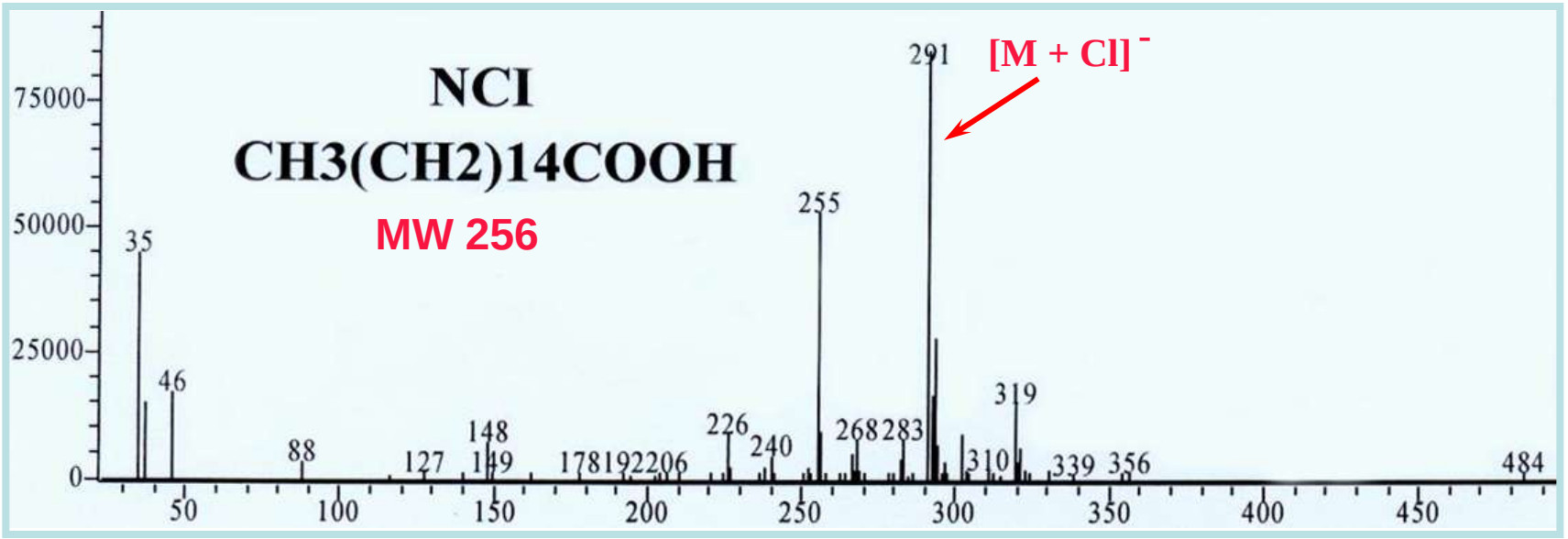

NCI
$CH_3(CH_2)_{11}OH$
M.W. 186
75000
50000
25000
0
185
371
57
71
35
85
99
113
127
148
170
243
350
373
50
100
150
200
250
300
350


NCI
$(CH_3)_2CH-OH$
M.W. 60
100000
75000
50000
25000
0
59
119
35
57
235
50
75
100
125
150
175
200
225

羧酸的负 CI 质谱图

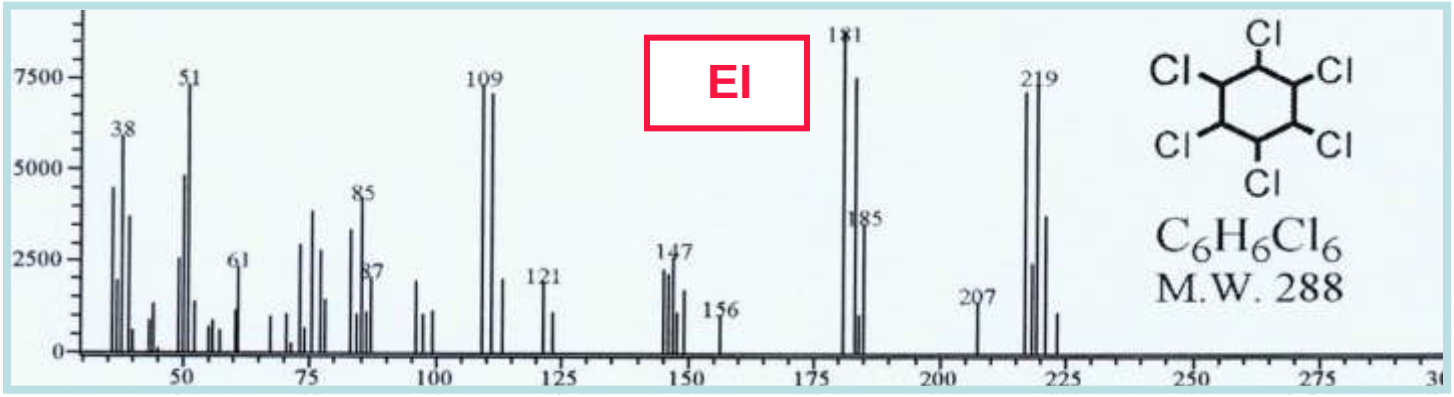
(氯仿溶剂引起 $[M + Cl]^-$)

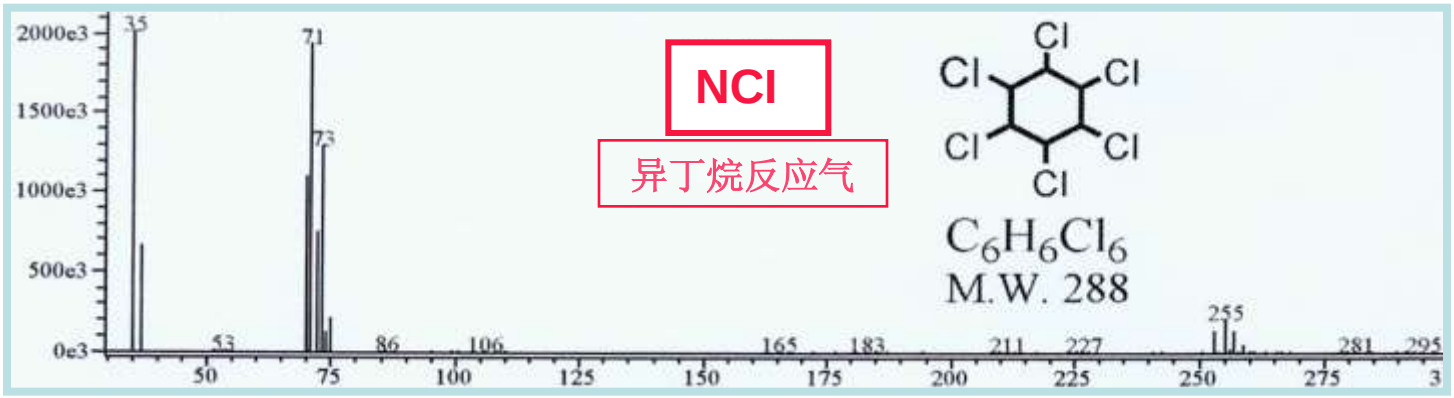


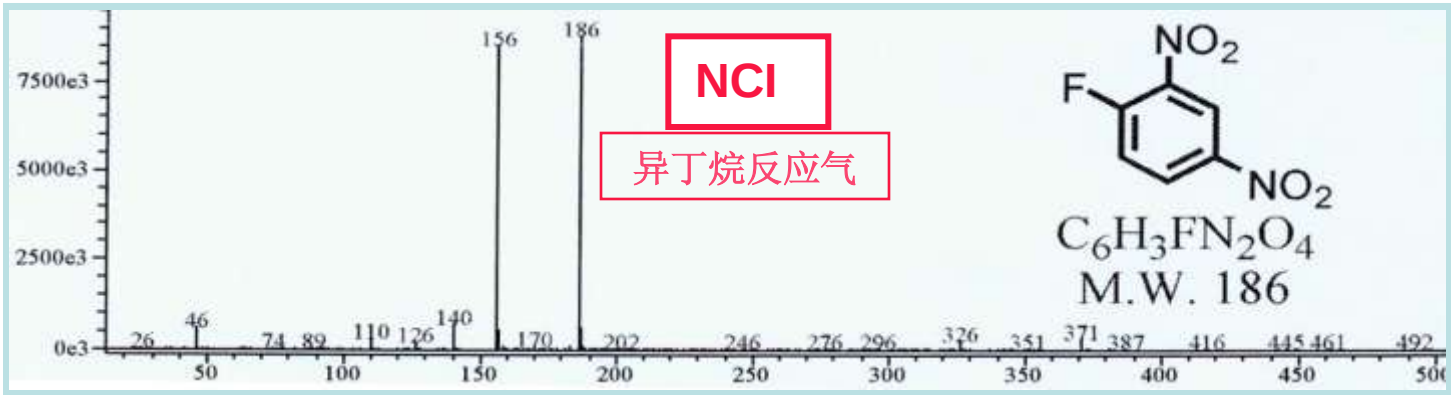


含电负性基团化合物的负 CI 质谱图

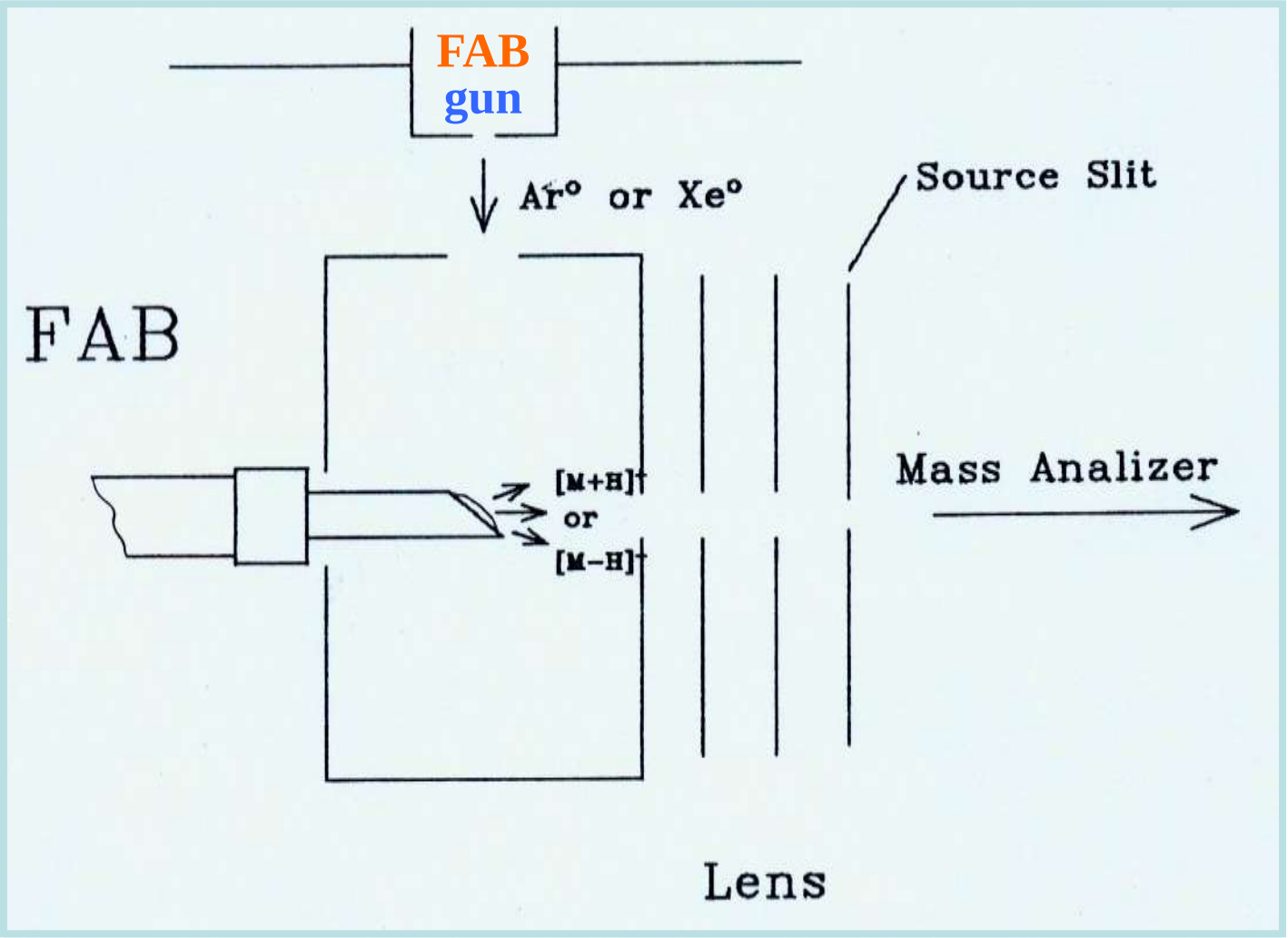
注意：不是所有含卤素化合物都能用 NCI 得到准分子离子峰



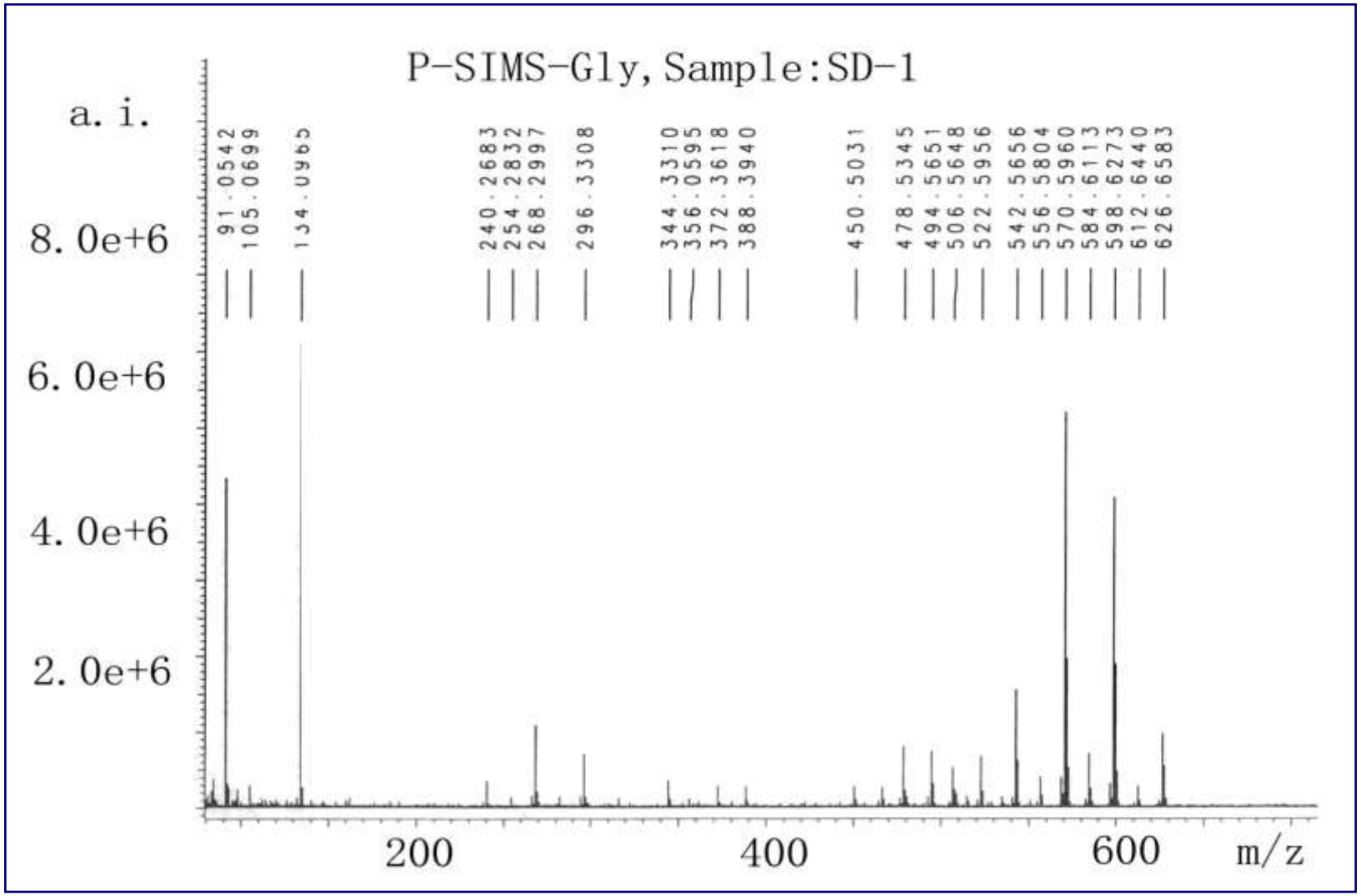




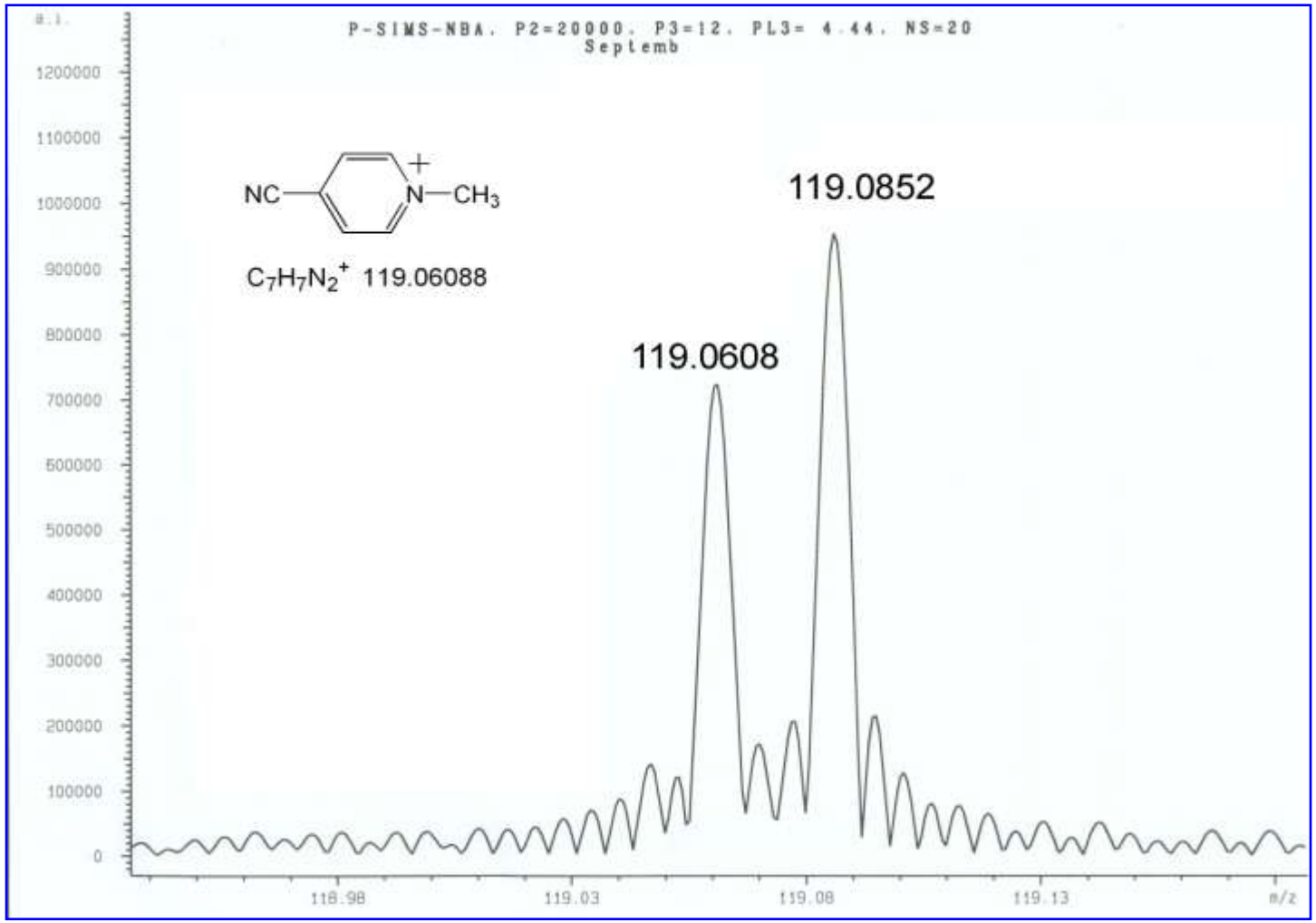
快原子轰击
Fast Atom Bombardment (FAB)



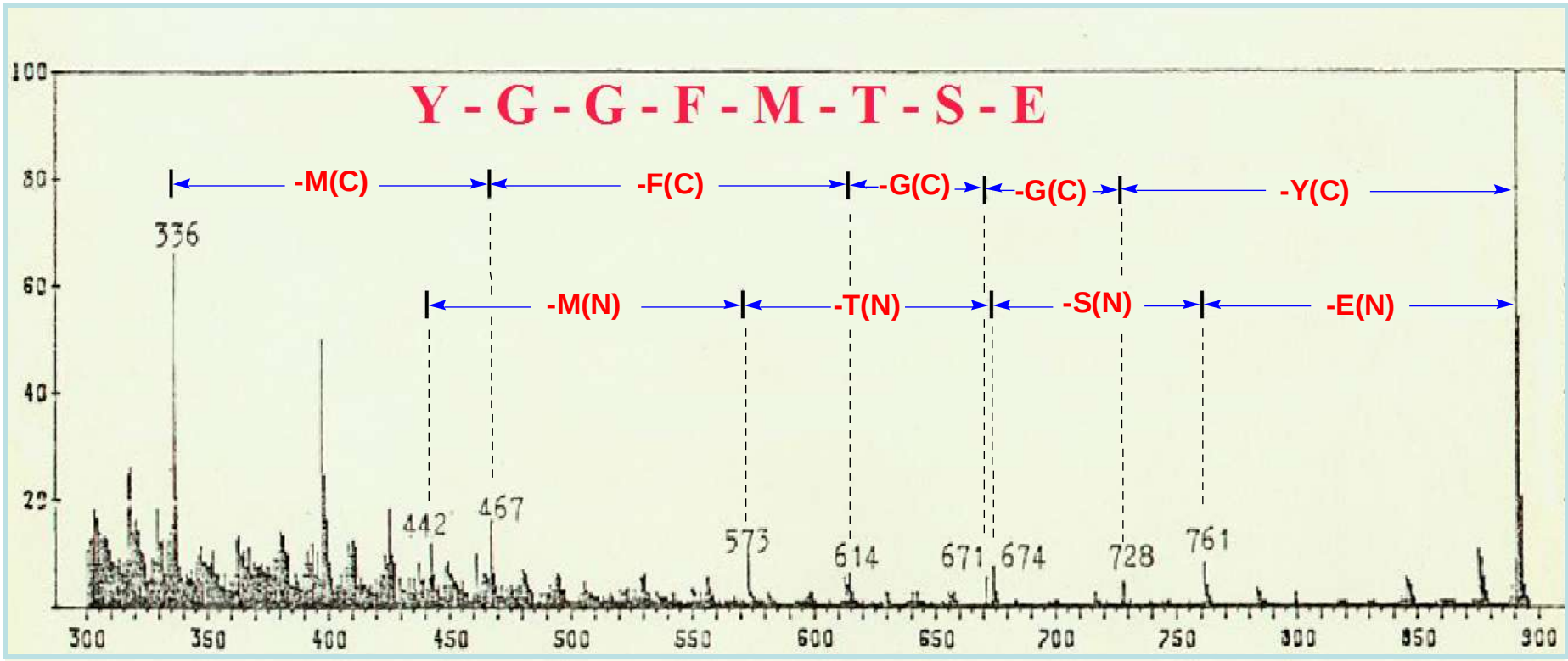
某烃基季胺盐样品的SIMS质谱图



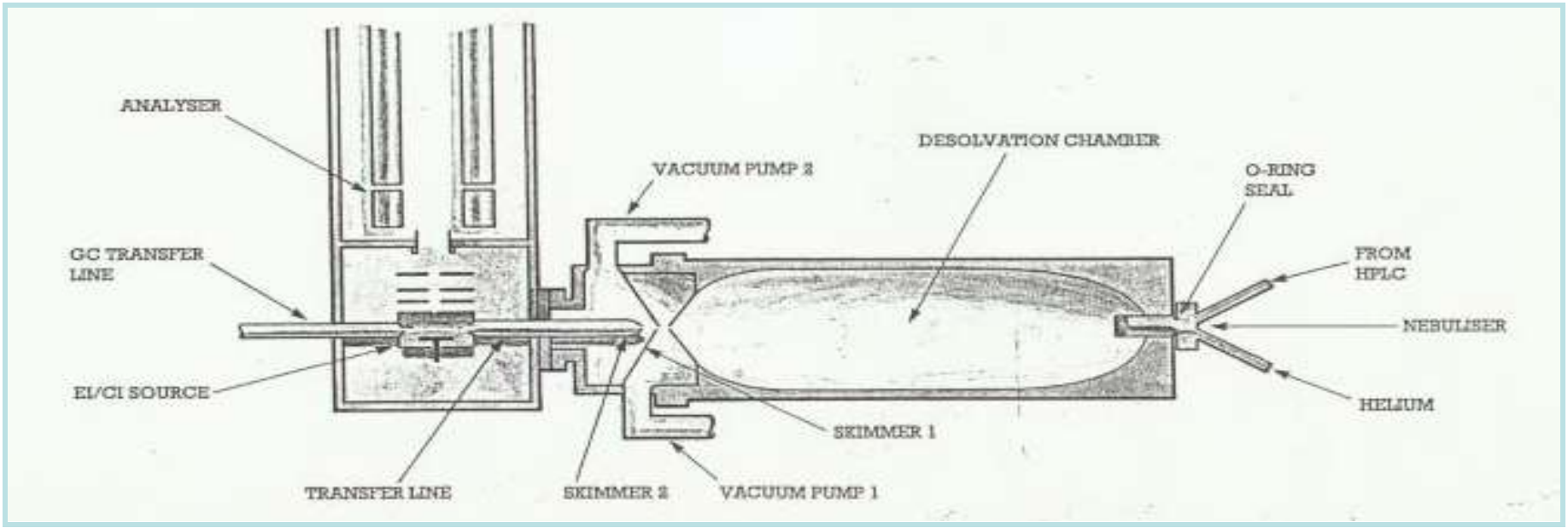
高分辨质谱的优点

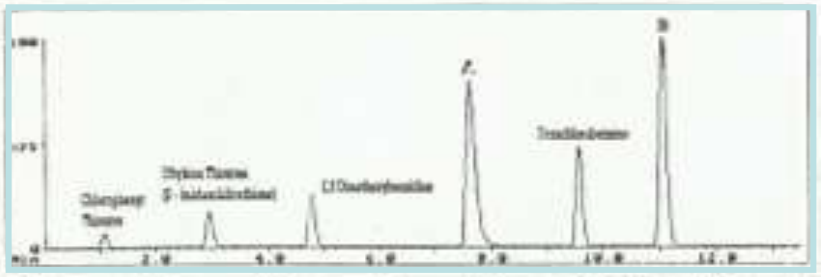

P-SIMS-NBA. P2=20000. P3=12. PL3= 4.44. NS=20
Septemb
NC
N
CH3
C7H7N2+ 119.06088
119.0852
119.0608
1200000
1100000
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
118.98
119.03
119.08
119.13
m/z

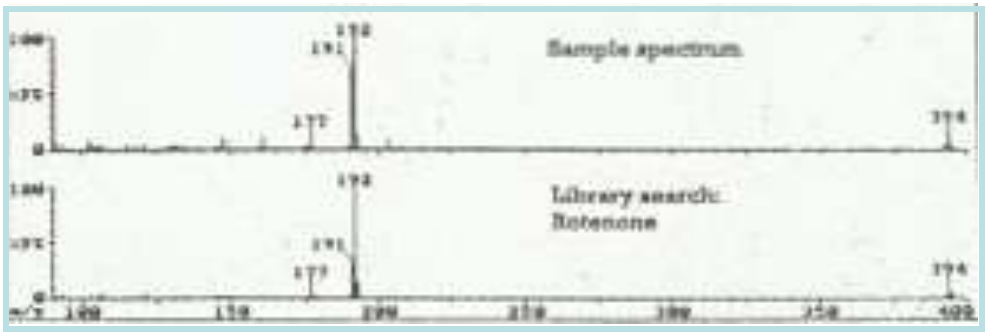
八肽的 FAB 质谱图


Y - G - G - F - M - T - S - E
-M(C)
-F(C)
-G(C)
-G(C)
-Y(C)
-M(N)
-T(N)
-S(N)
-E(N)
336
442
467
573
614
671
674
728
761
100
80
60
40
20
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
800
850
900

粒子束 (Partical Beam)

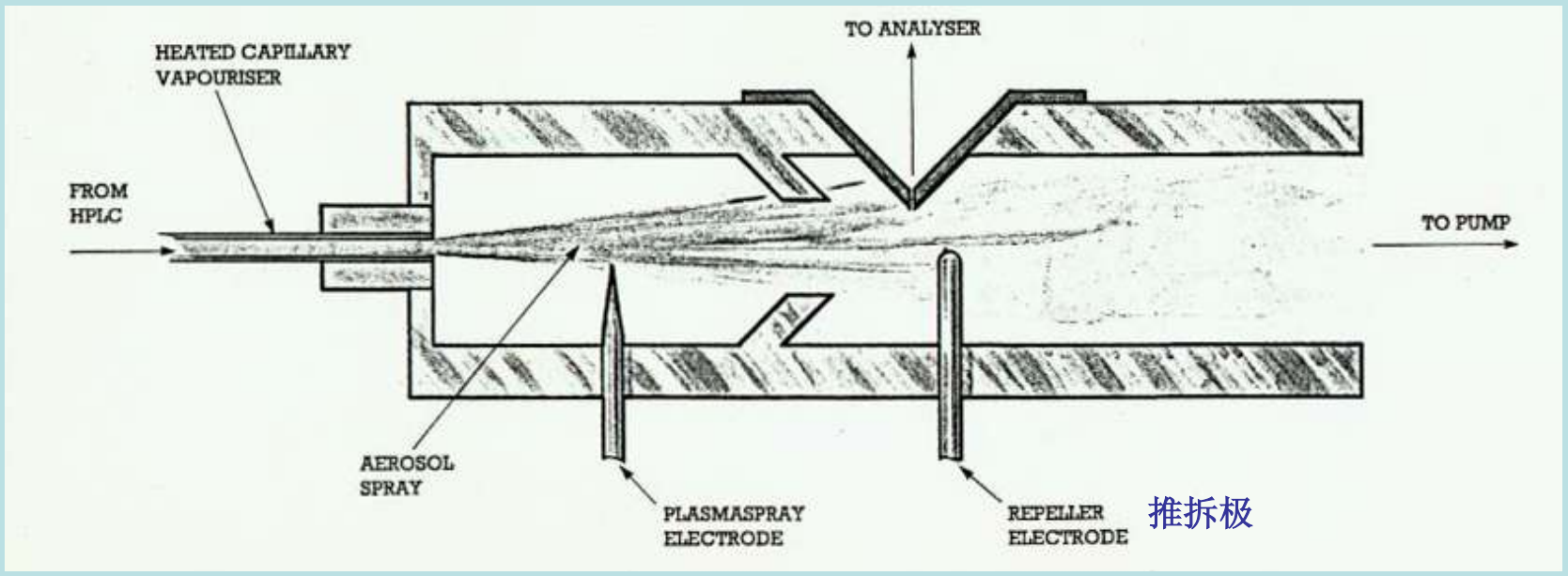


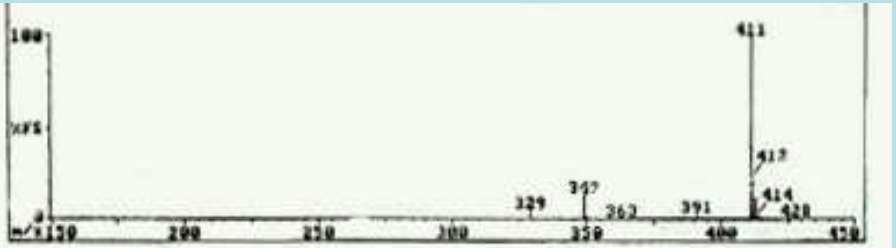




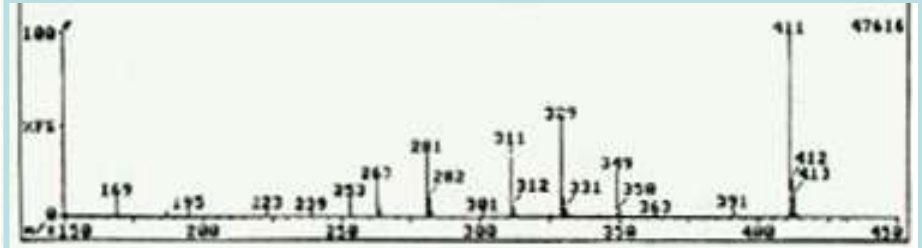


热喷雾 (Thermospray)



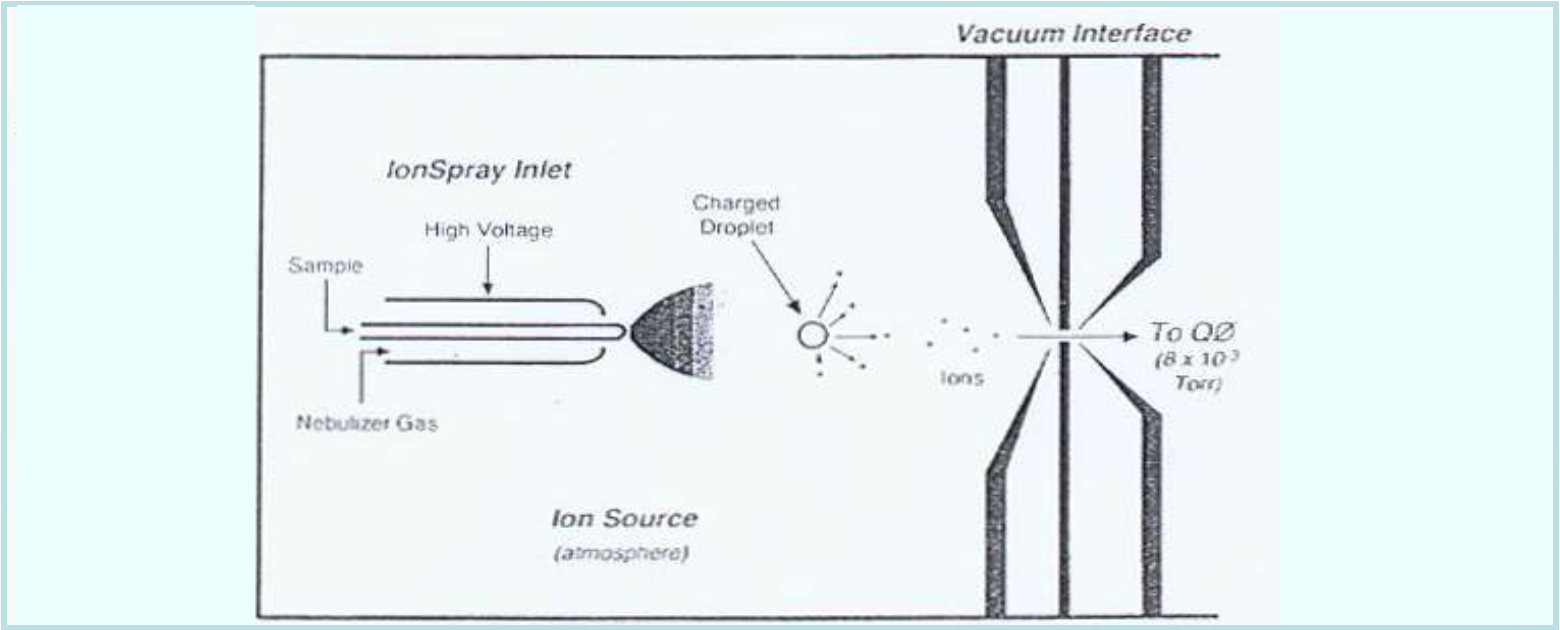


Data obtained in the thermospray mode, with low ion repeller voltage Typical of this technique, the spectrum obtained is dominated by the protonated molecular ion.



The effect of a high ion repeller voltage: The molecular ion information is complemented by significant structurally important fragment ions.

电喷雾电离 (Electro-spray Ionnization ESI)

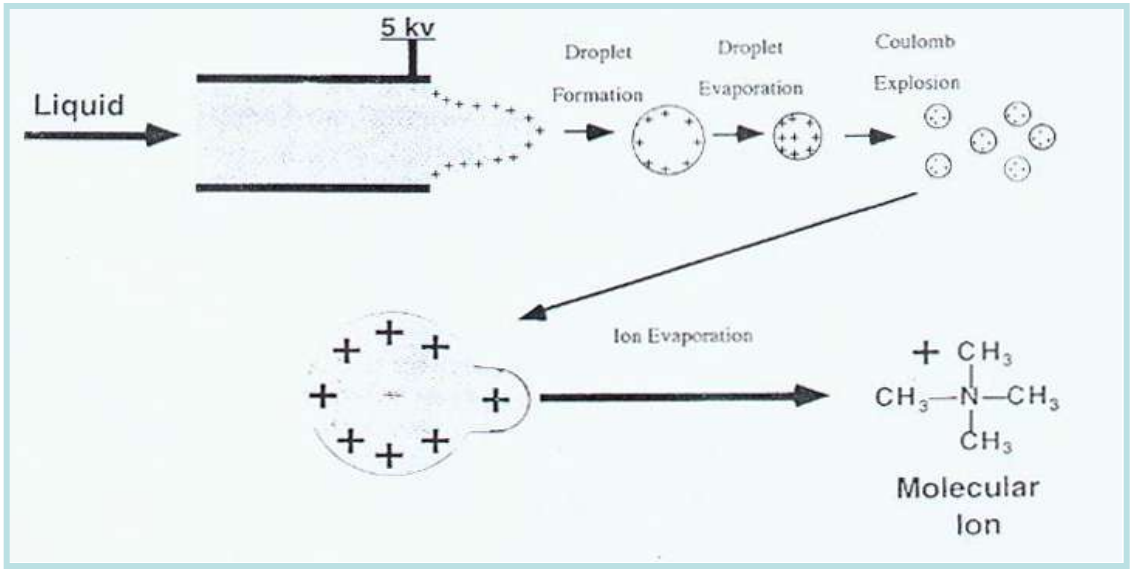


离子化过程 (三步)

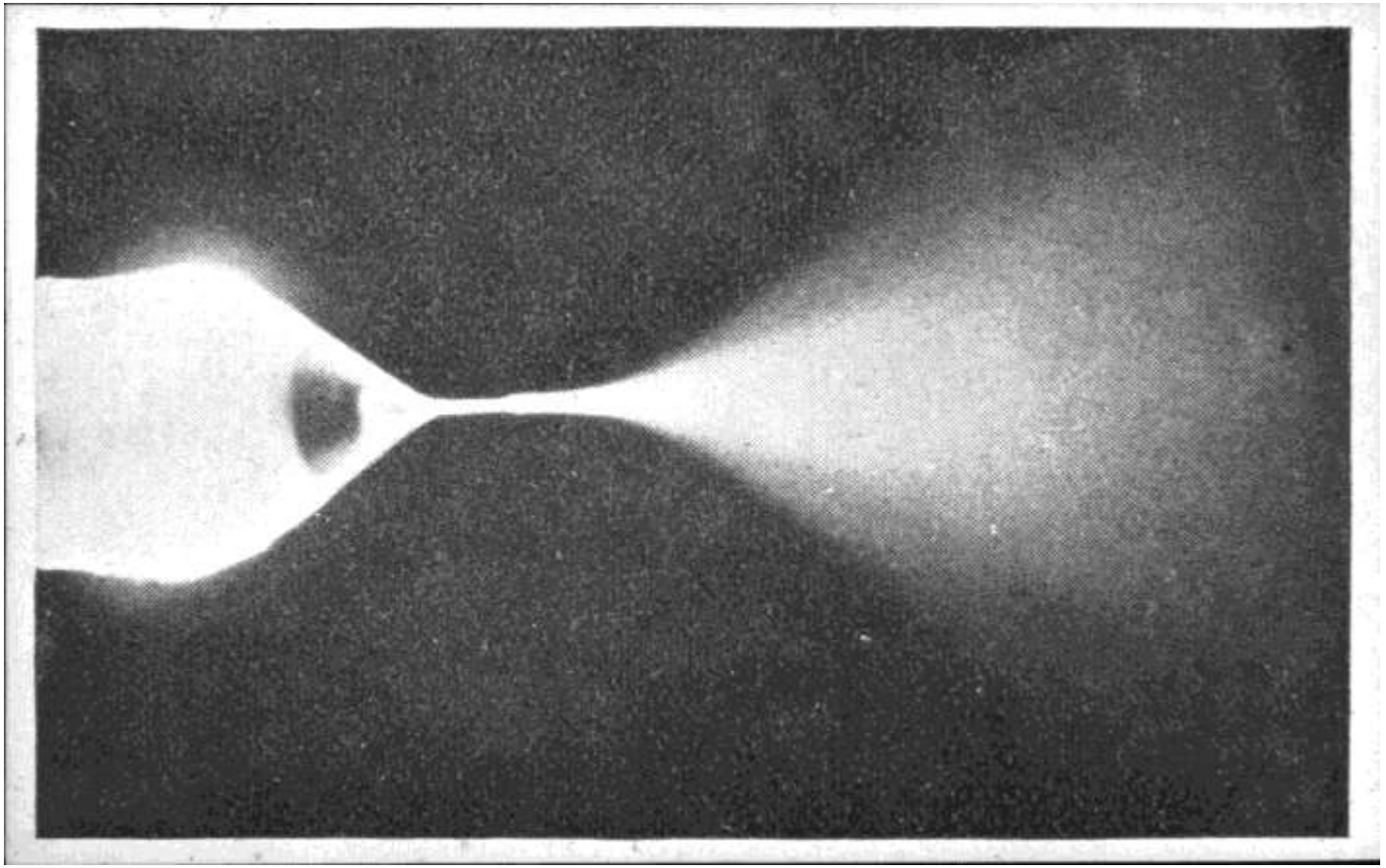
(1) 样品溶液 喷雾(带电)

(2) 雾滴 分裂

(3) 溶液中离子 转变为气相离子



电喷雾电离（ESI）

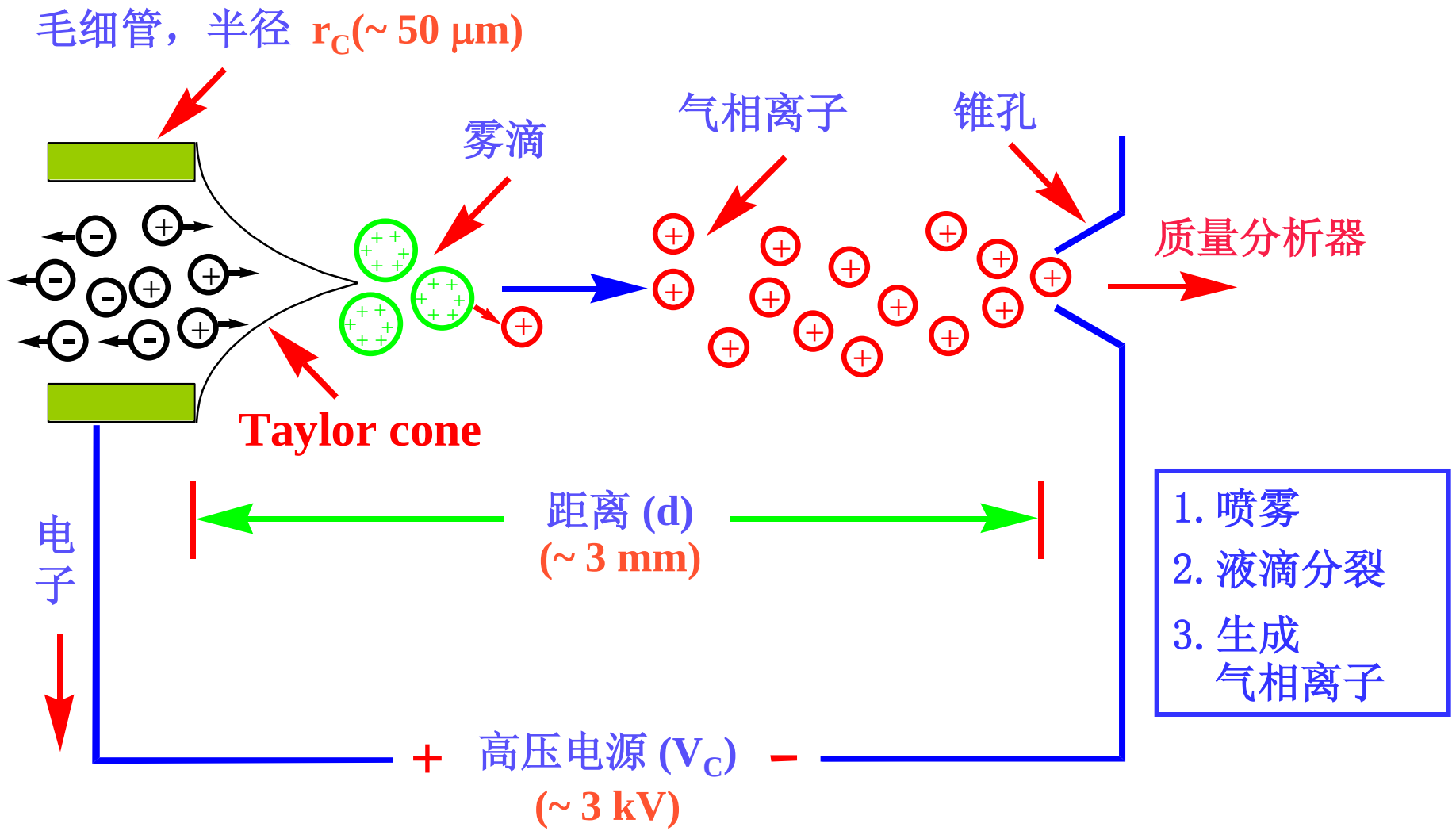


J. Zelene, Phys. Rev., 10, 1-6 (1917)

首次介绍电喷雾

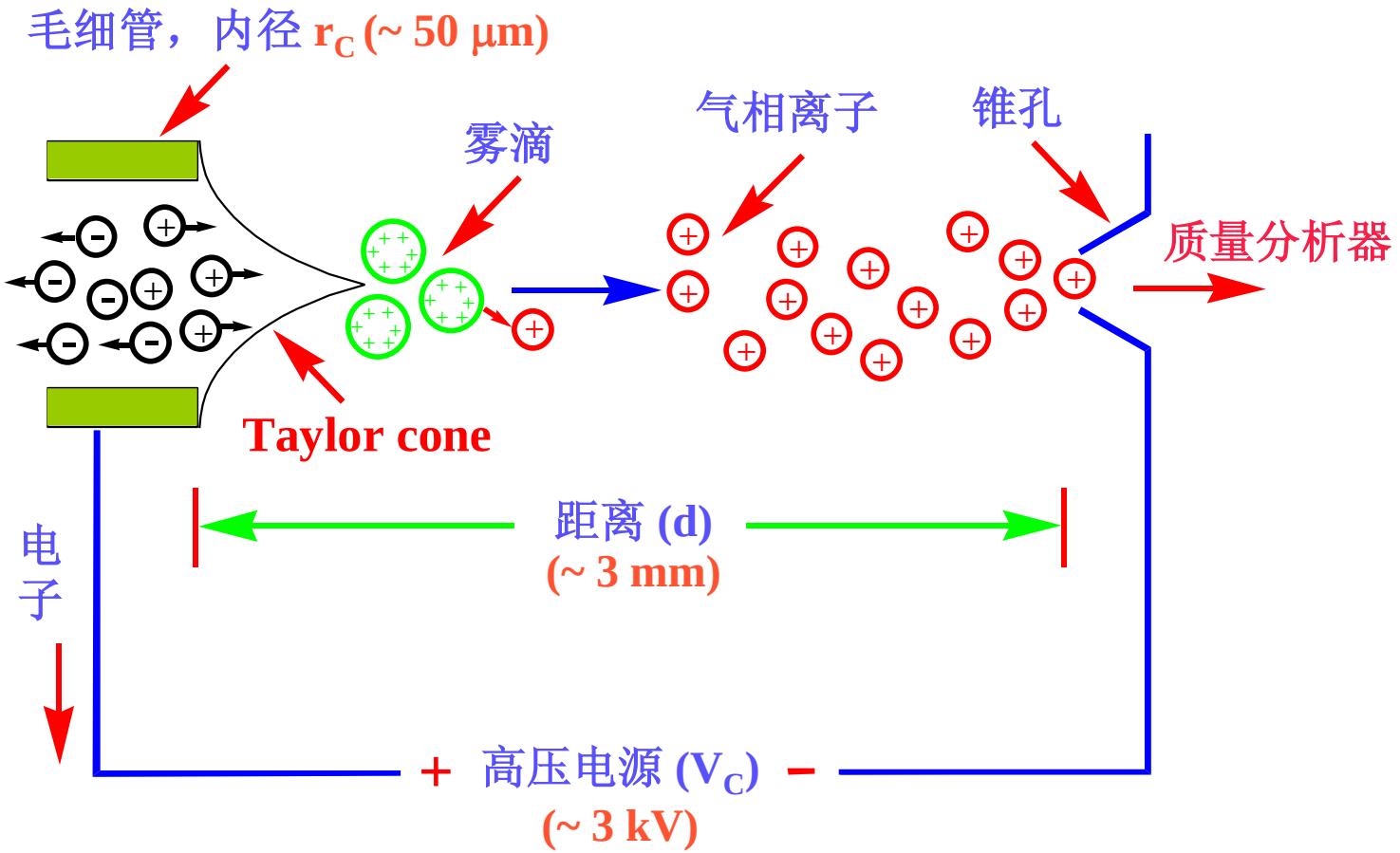
纳升喷雾(Nano Spray) 工作原理

(纯粹的电喷雾)



发生稳定喷雾的条件

- （1）要有足够强的电场（喷雾、电荷分离）
- （2）流体要有一定的线速度
- （3）流体要含有一定量的电介质（离子）



溶剂：

水、甲醇、乙氰、各种比例混合液（常用）

乙醇、异丙醇、丁醇、二氯甲烷、 二氯甲烷/甲醇混合液

四氢呋喃、丙酮、**DMSO***、**DMF***（* 沸点较高）

甲苯(用于富勒烯)

水的纯度：

电导率 ≥ **18** $M\Omega/cm^3$

（多肽、蛋白质、PMF 分析，不希望有钠、钾加合离子）

缓冲试剂：（含量 0.5~1%）

甲酸、乙酸、乙酸铵、氢氧化铵、甲铵、三乙铵

钠盐、钾盐（10 ～15 μM ）

三氟乙酸(TFA)的抑制作用

三氟乙酸阴离子与样品形成离子对，导致中性化。

0.1% TFA会使样品信号下降至 1/5 ~ 1/10

克服方法

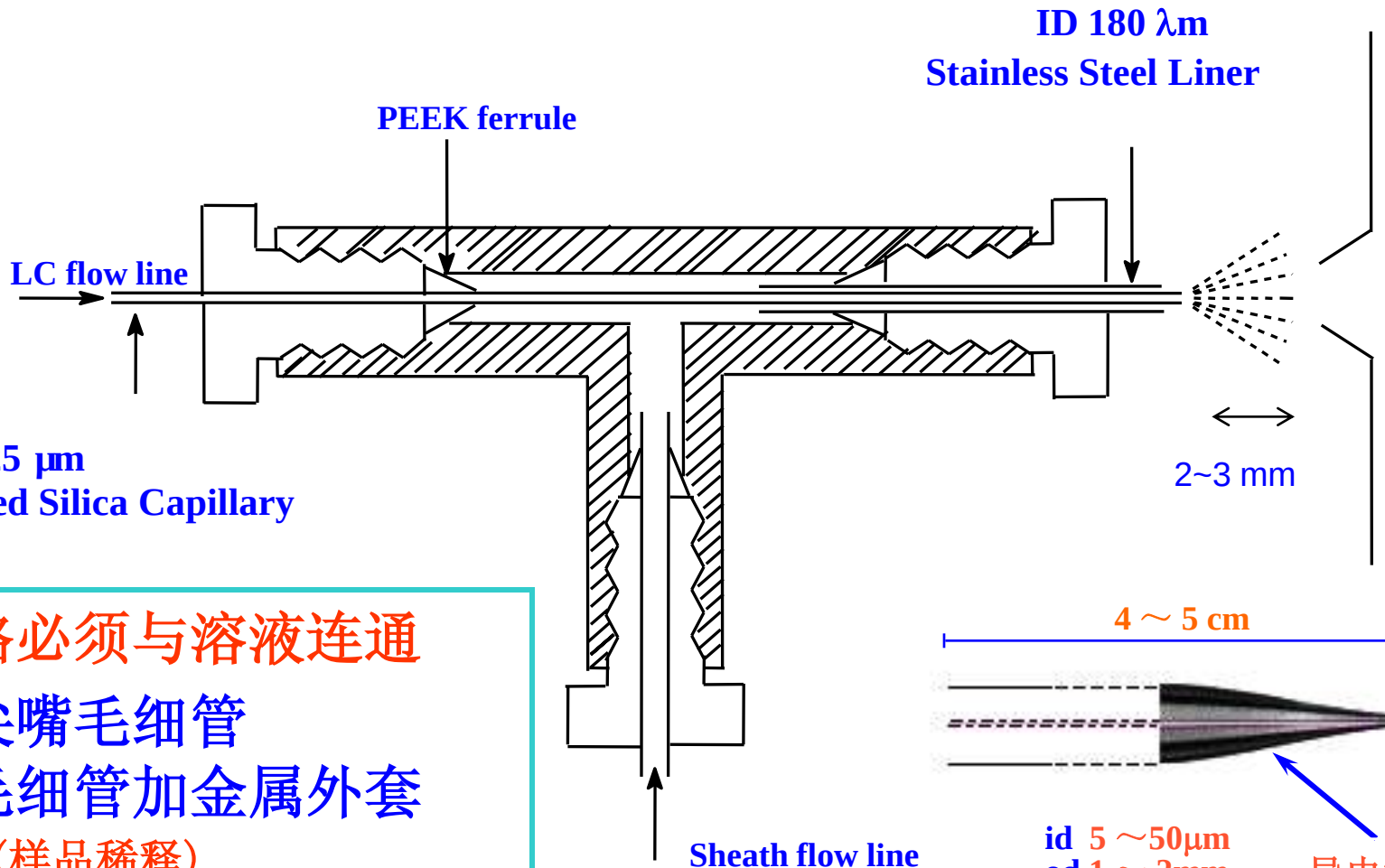
鞘流：20 ～50% 丙酸的异丙醇溶液

杂质干扰：

- 邻苯二甲酸二辛酯 **m/z 391 $[M+H]^+$**
  m/z 413 $[M+Na]^+$
- 蛋白质常含 硫酸盐、磷酸盐会出现 **$[M+ 1+98]^+$**
- 十二烷基磺酸钠(SDS)、**Triton X**

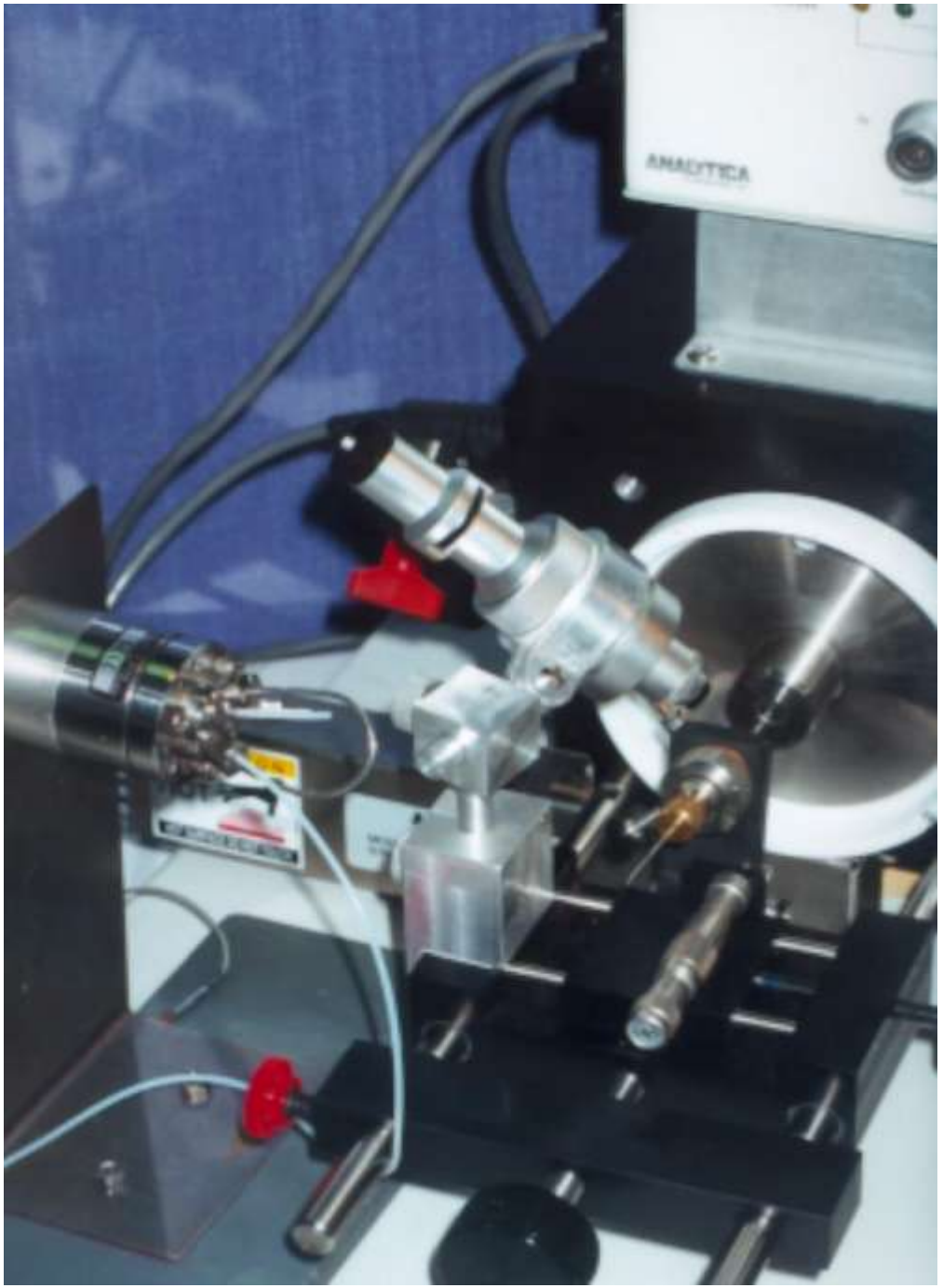
会完全掩盖蛋白质信号

Nano Spray Interface

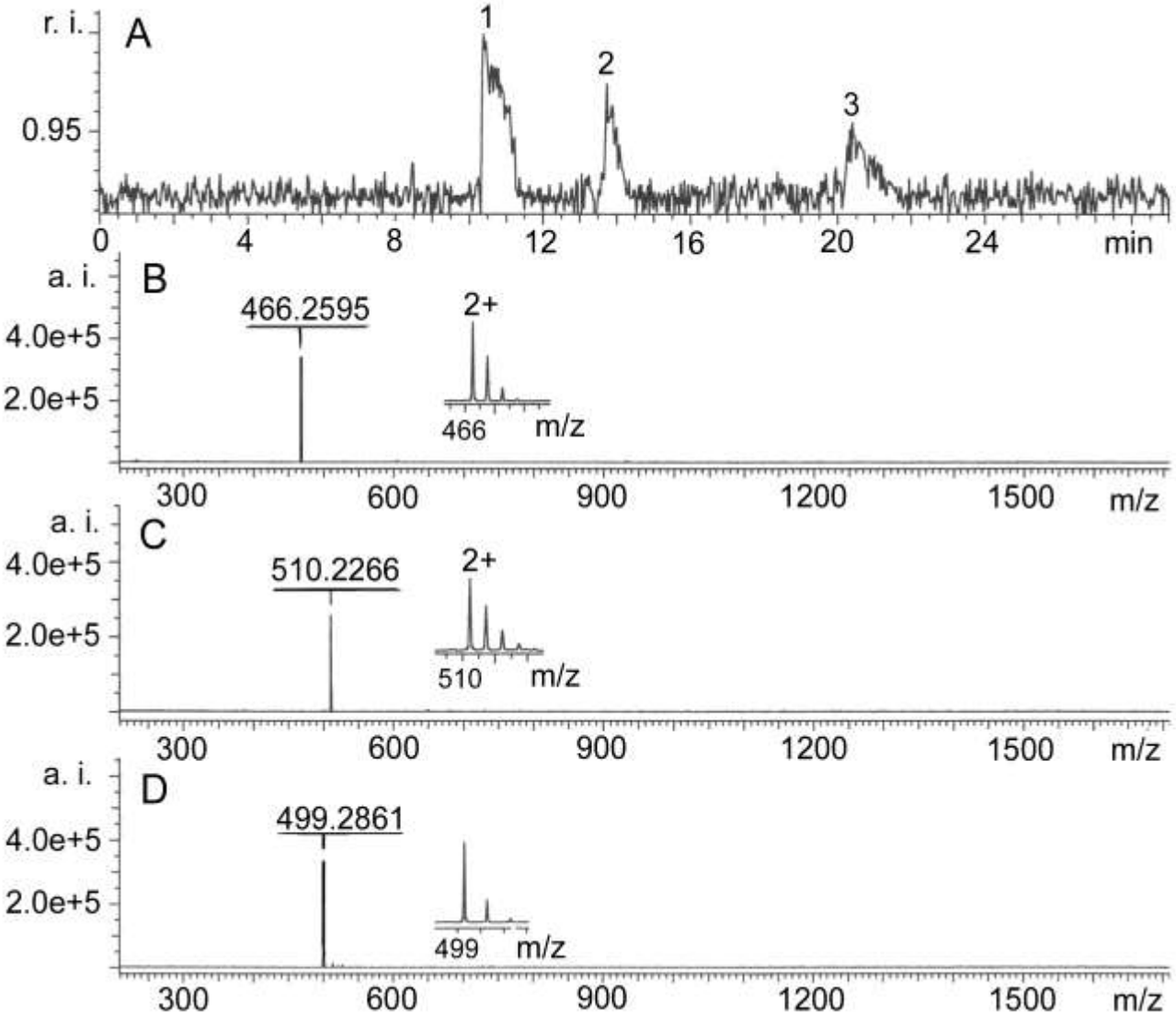


电路必须与溶液连通

1. 尖嘴毛细管
2. 毛细管加金属外套
   （样品稀释）
3. 分段毛细管
   （死体积）


ANALYTICA

On-line Separation and Detection of Peptides by Capillary Electrophoresis / Capillary ESI-FTMS



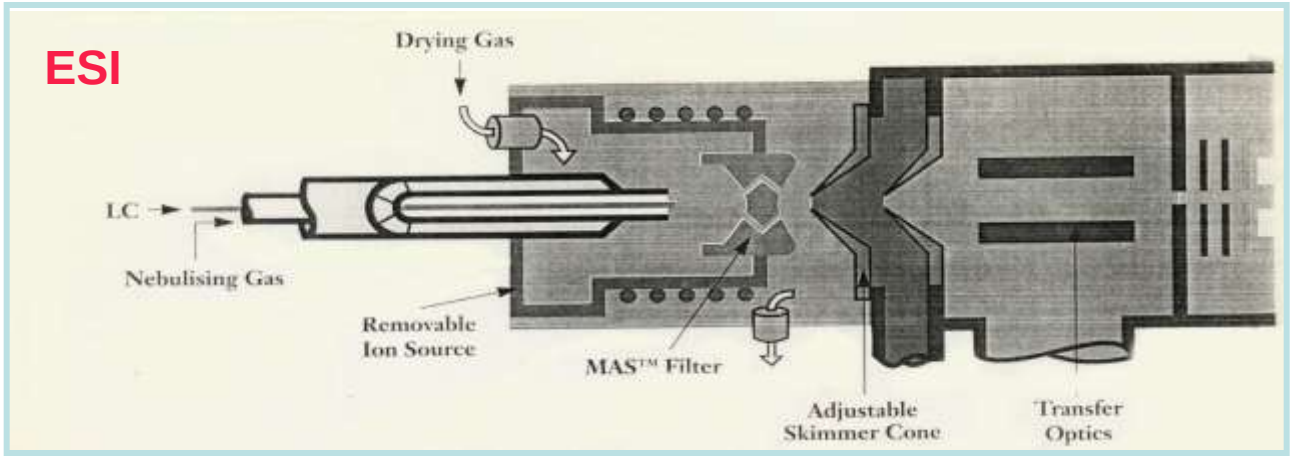
API 离子源

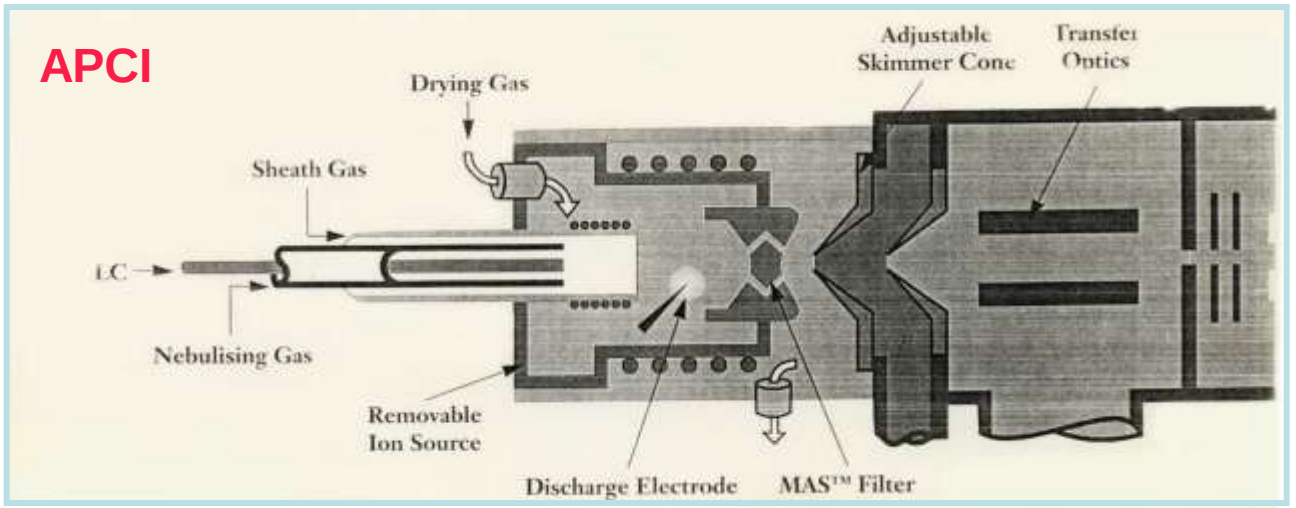
用锥孔隔开大气压和真空室

新结构：

垂直喷雾

Z 喷雾

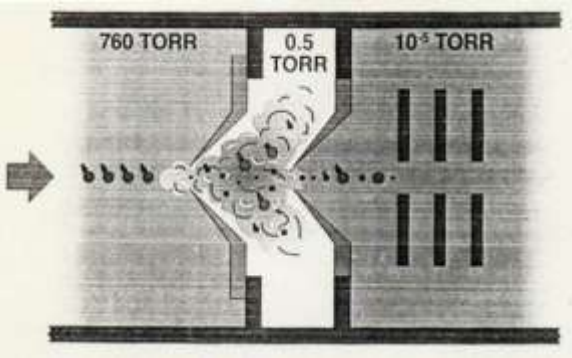


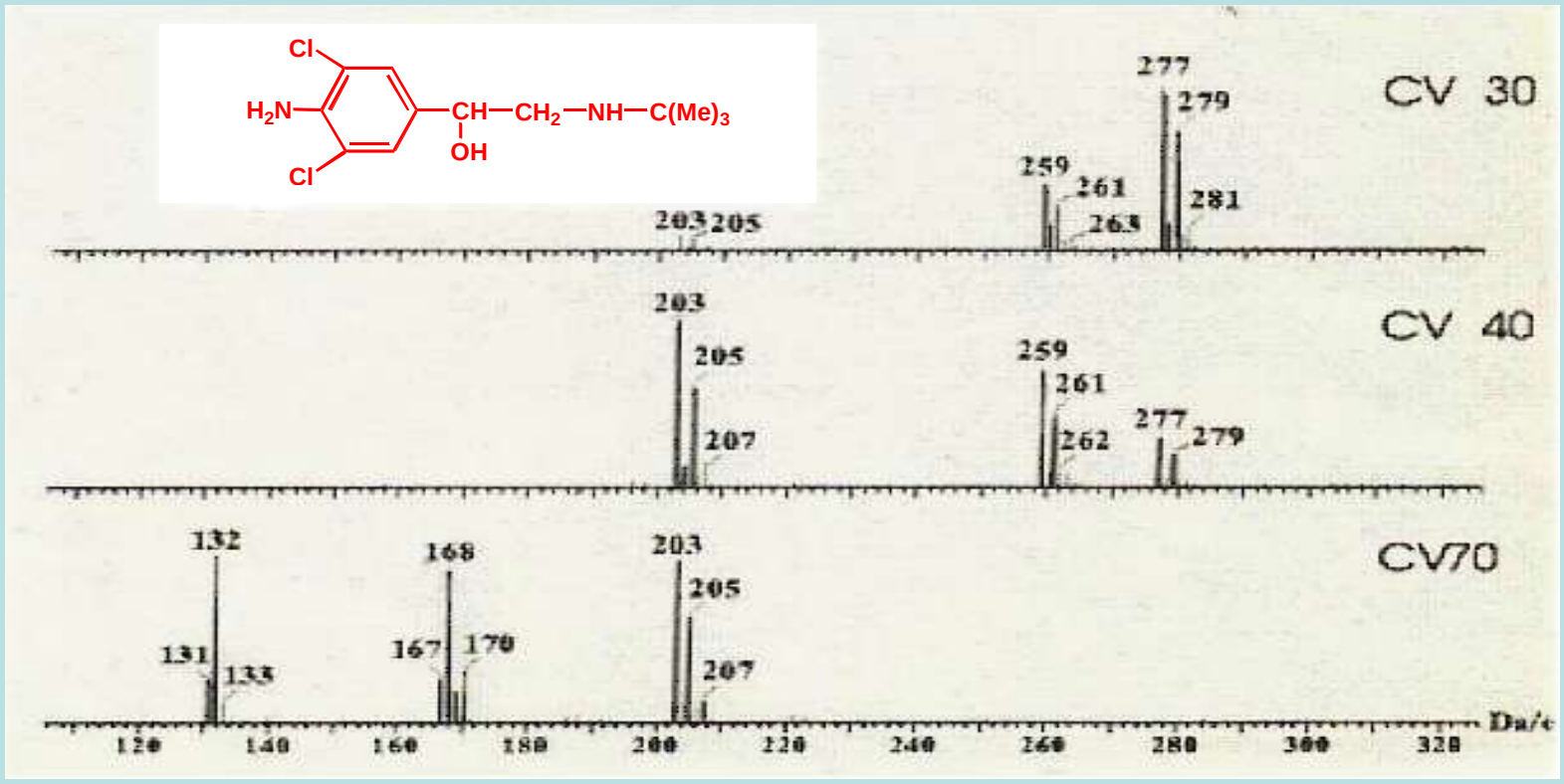


特点 1

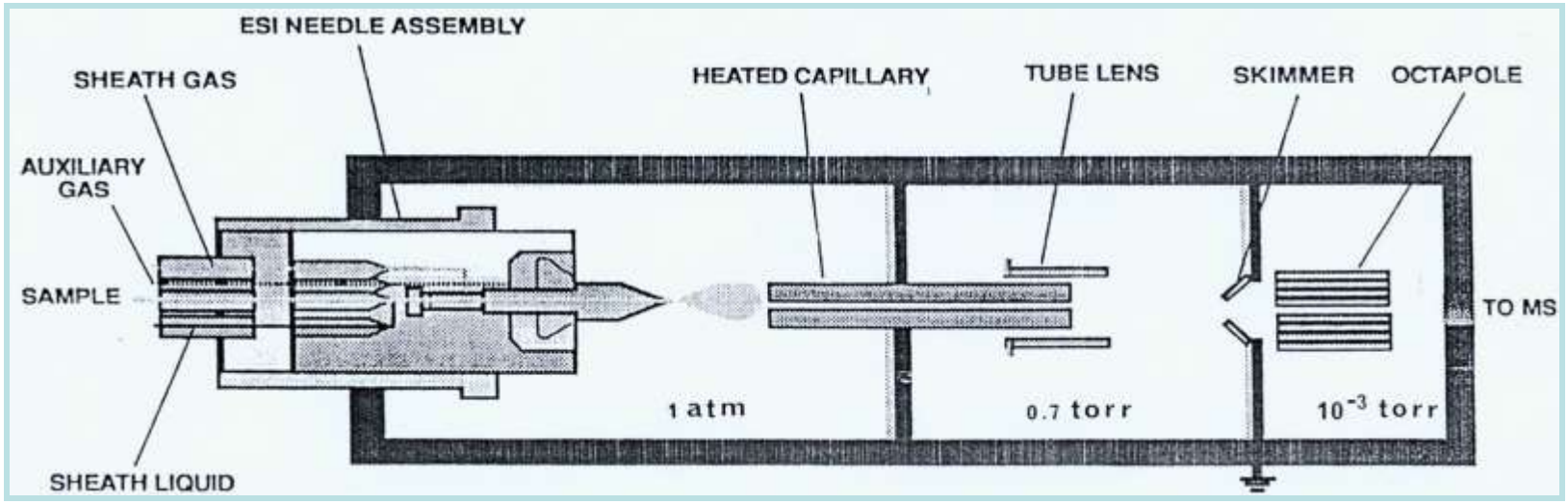
In-source CID fragmentation (clenbuterol)

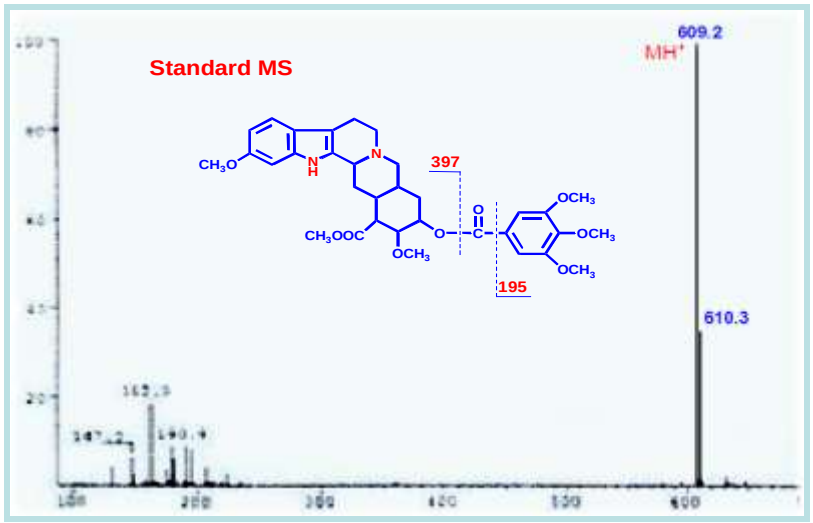
可获得结构信息

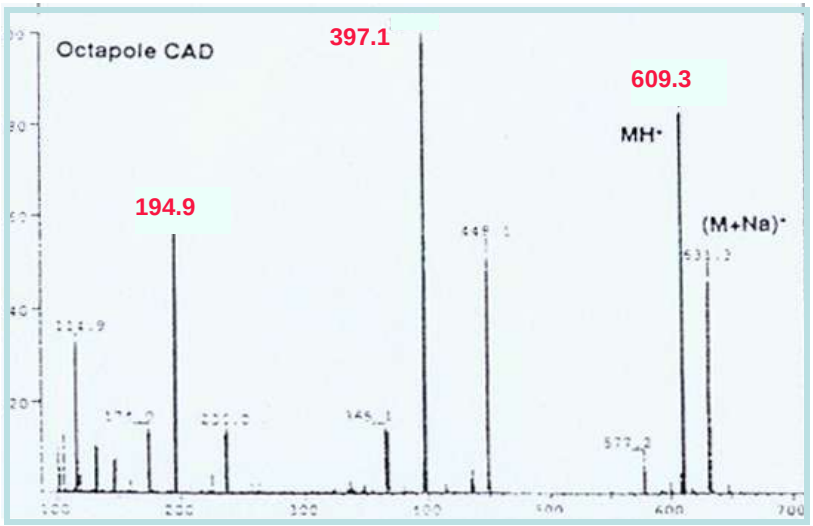




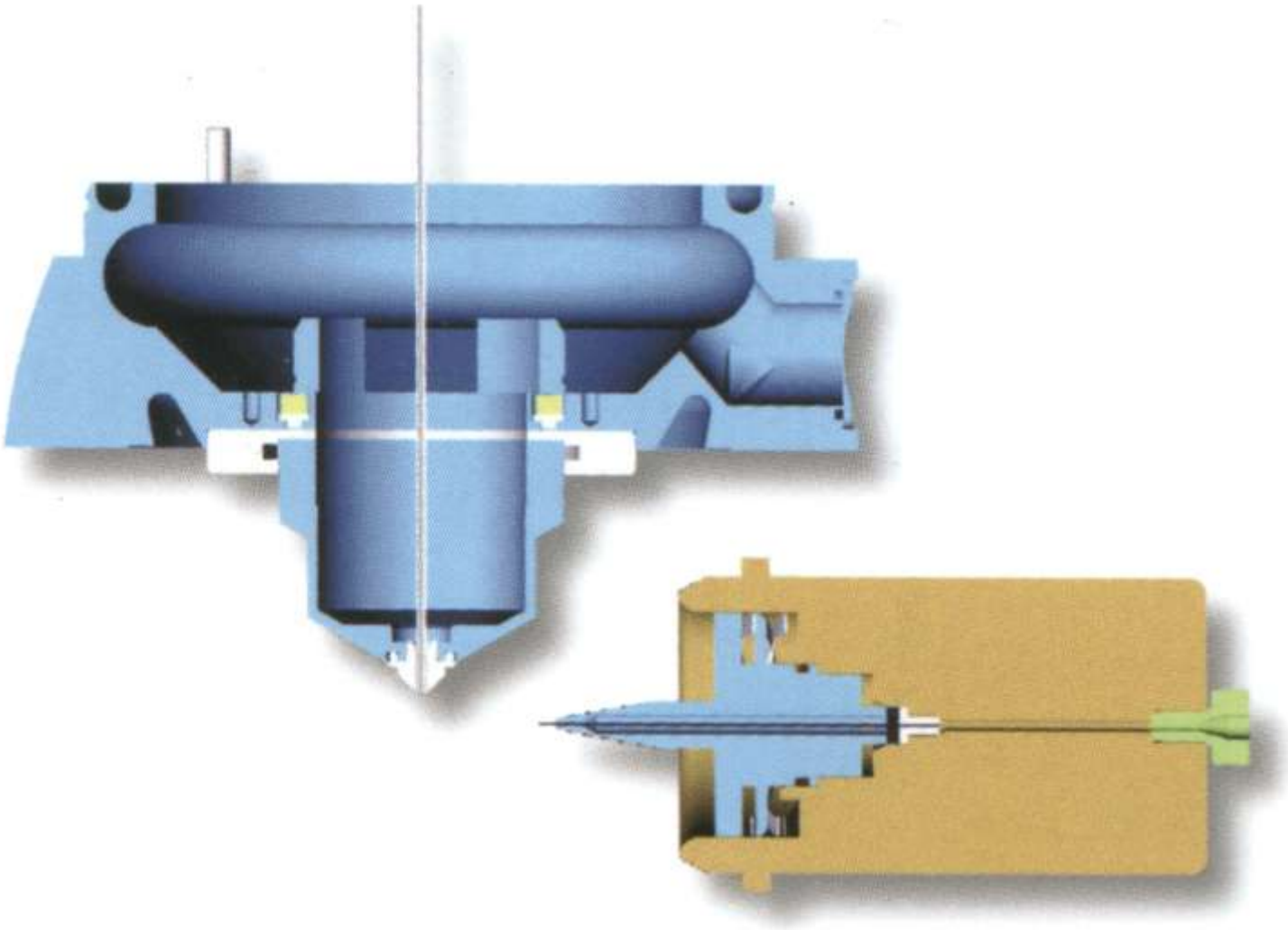
用毛细管隔开大气压和真空室



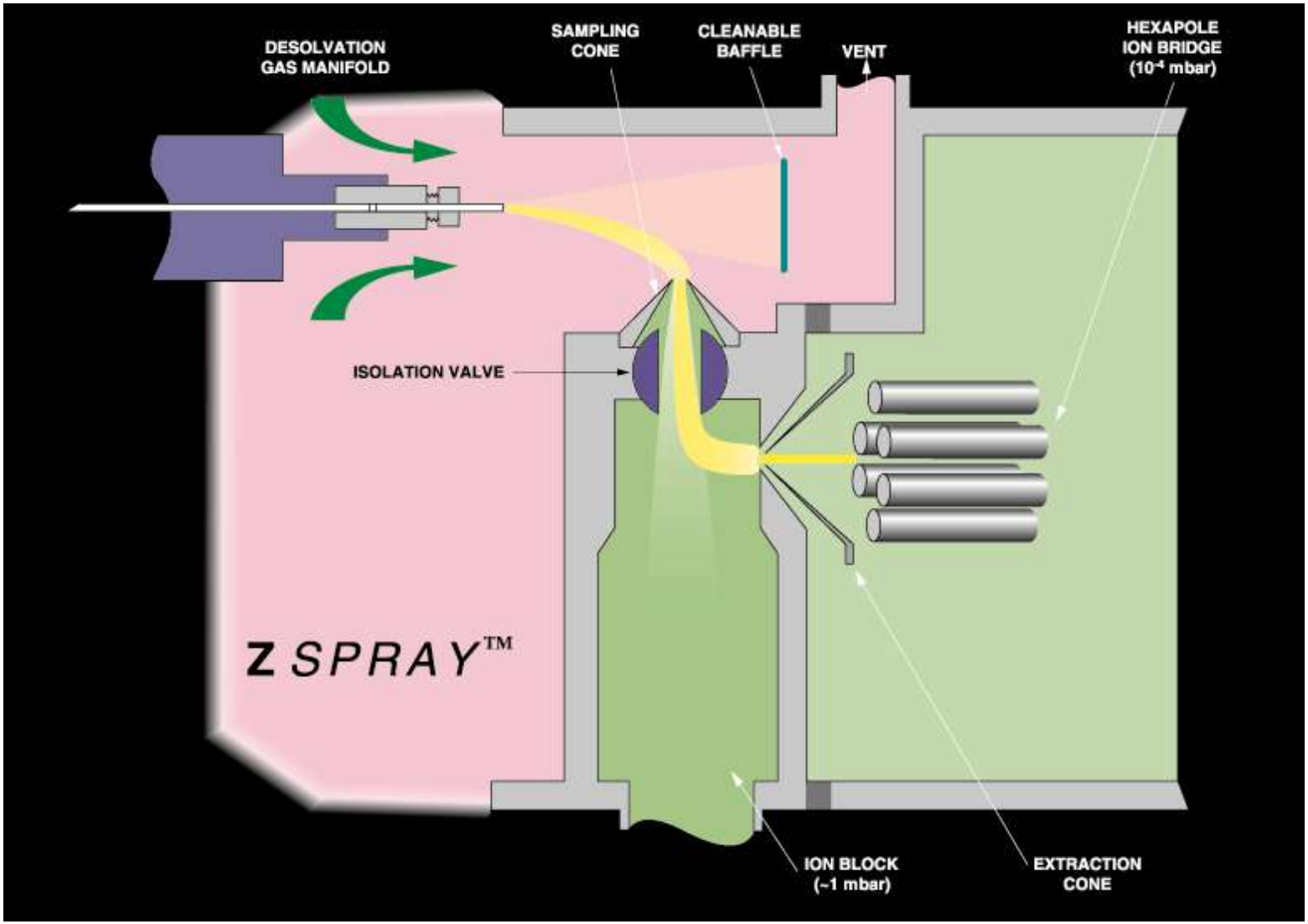




垂直喷雾



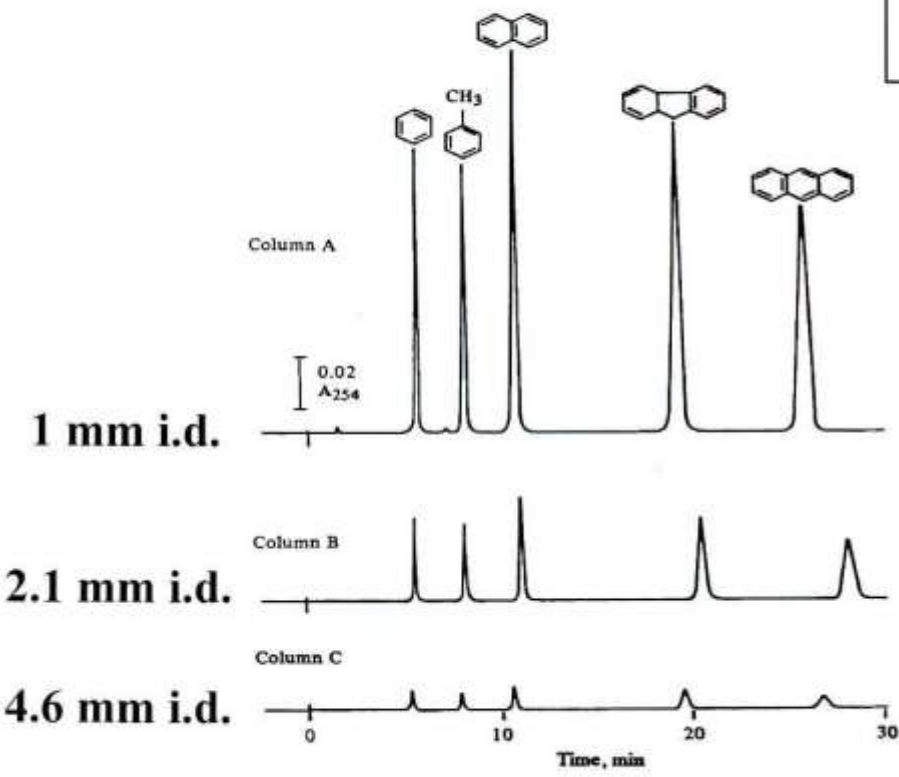
Z 型喷雾


DESOLVATION
GAS MANIFOLD
SAMPLING
CONE
CLEANABLE
BAFFLE
VENT
HEXAPOLE
ION BRIDGE
(10⁻⁴ mbar)
ISOLATION VALVE
Z SPRAY™
ION BLOCK
(~1 mbar)
EXTRACTION
CONE

ESI 的发展趋势 - nano spray

微径柱与常规柱比较

Length = 15 cm
Mobile Phase = 55% ACN/H_2O
Column: C18, 5µm



1 mm i.d. — 0.05-mL/min (24mL/8hrs)

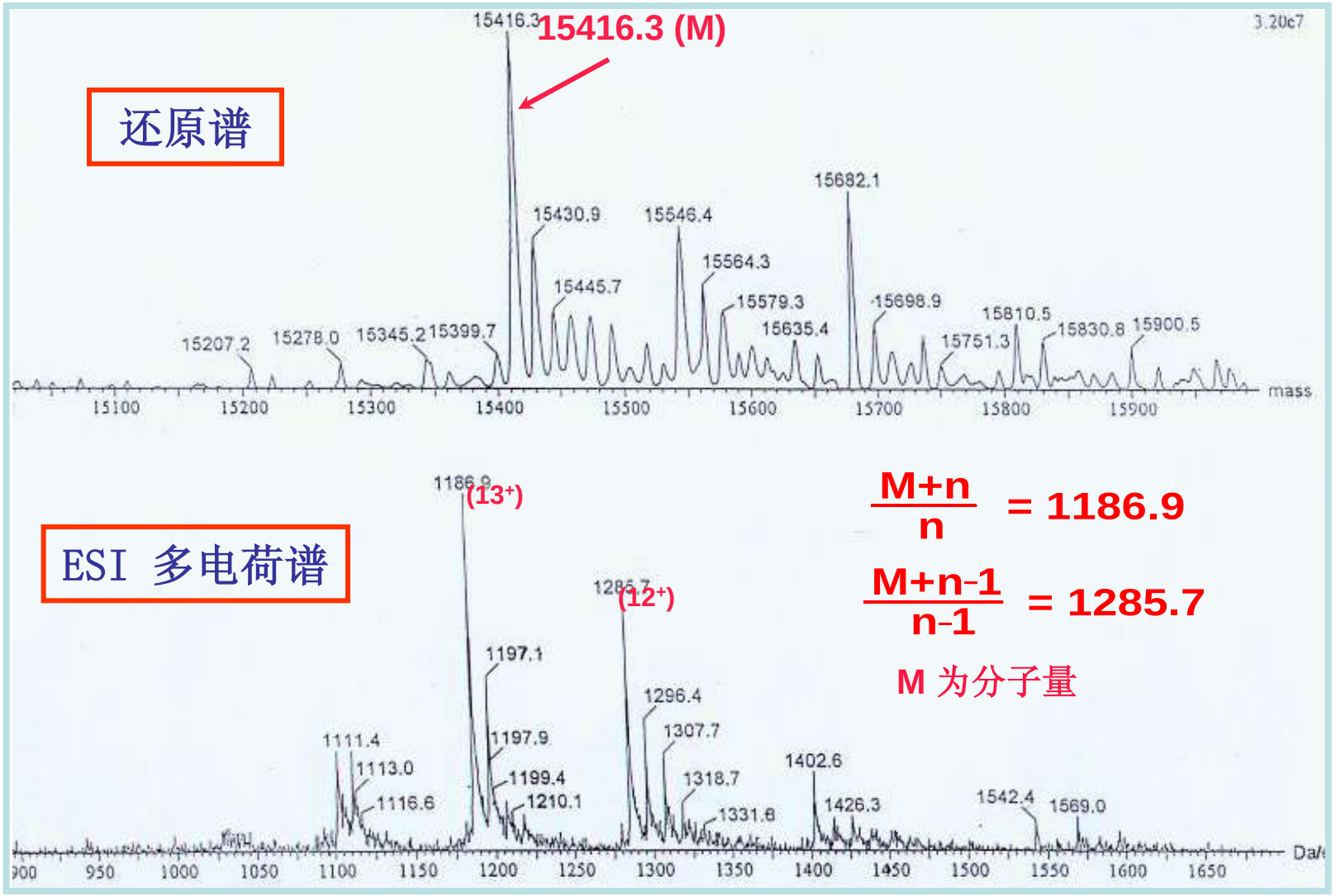
2.1 mm i.d. — 0.20-mL/min (96mL/8hrs)

4.6 mm i.d. — 1.00-mL/min (480mL/8hrs)

*Sample mass injected is the same.

蛋白的 ESI 质谱图(多电荷离子)

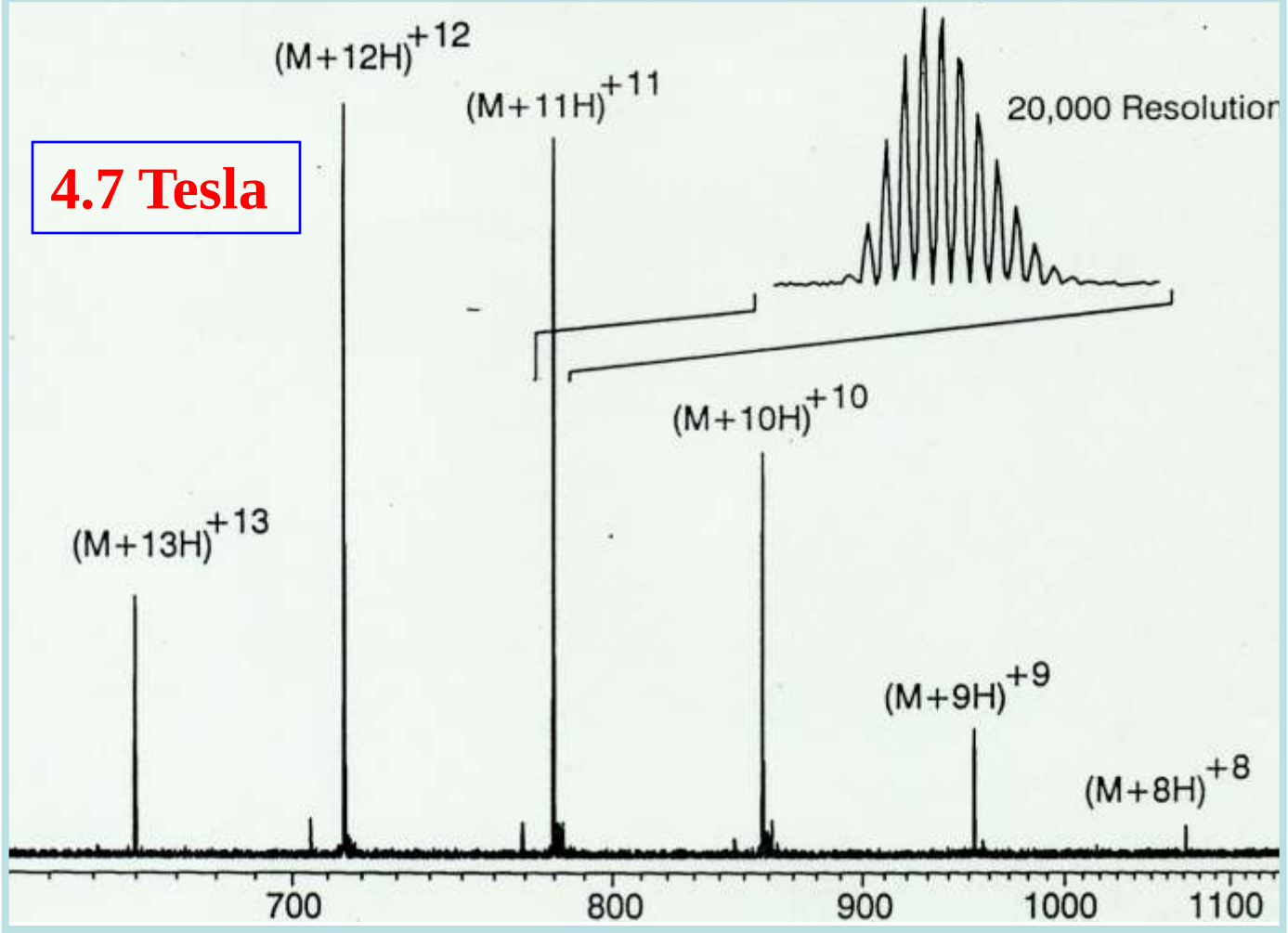
- 多电荷离子降低了 m/z ，用四极杆，离子井质谱仪可测定大分子
- 需要通过解联立方程才能由低分辨质谱图解得分子量和电荷数



高分辨 ESI 谱图

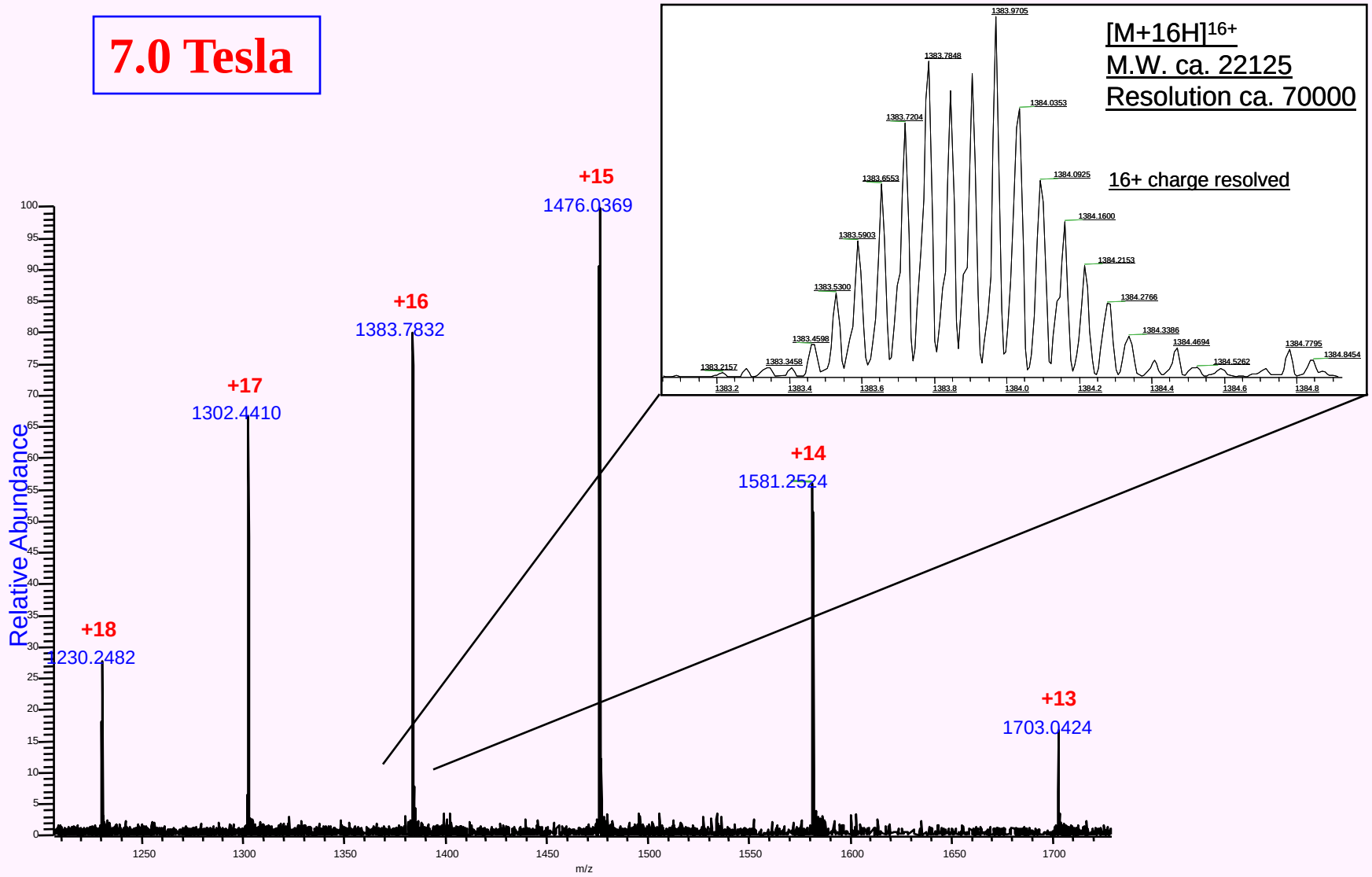
高分辨离子回旋共振质谱仪(ICRMS)能把多电荷离子的同位素峰分开，从而容易确定各个峰的电荷数

ubiquitin



Human Growth Hormon (intact): FTMS Spectrum

7.0 Tesla



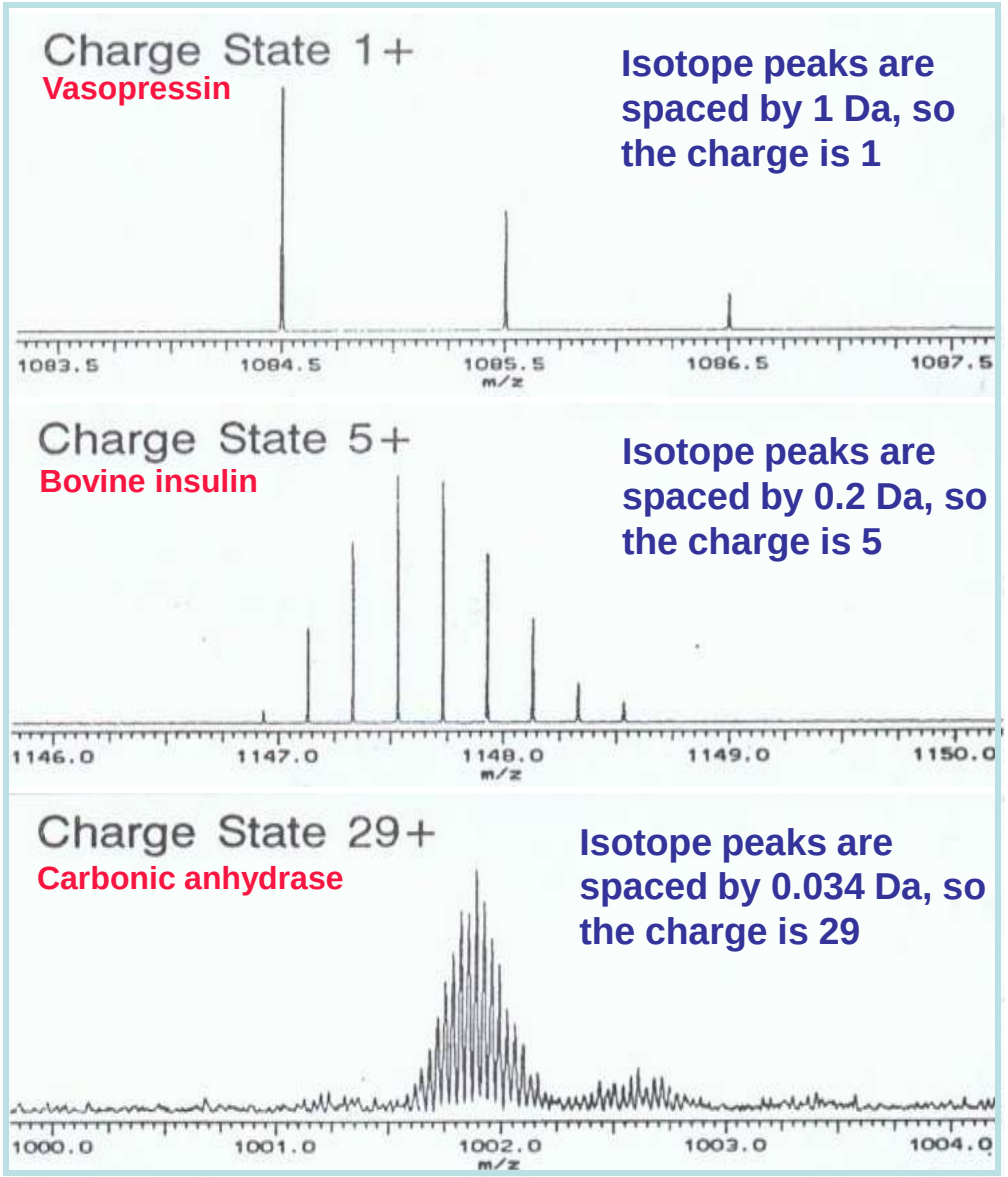
高分辨 ESI

解电荷数
计算分子量

$$\text{电荷数} = \frac{1}{\text{同位素峰间质量差}}$$

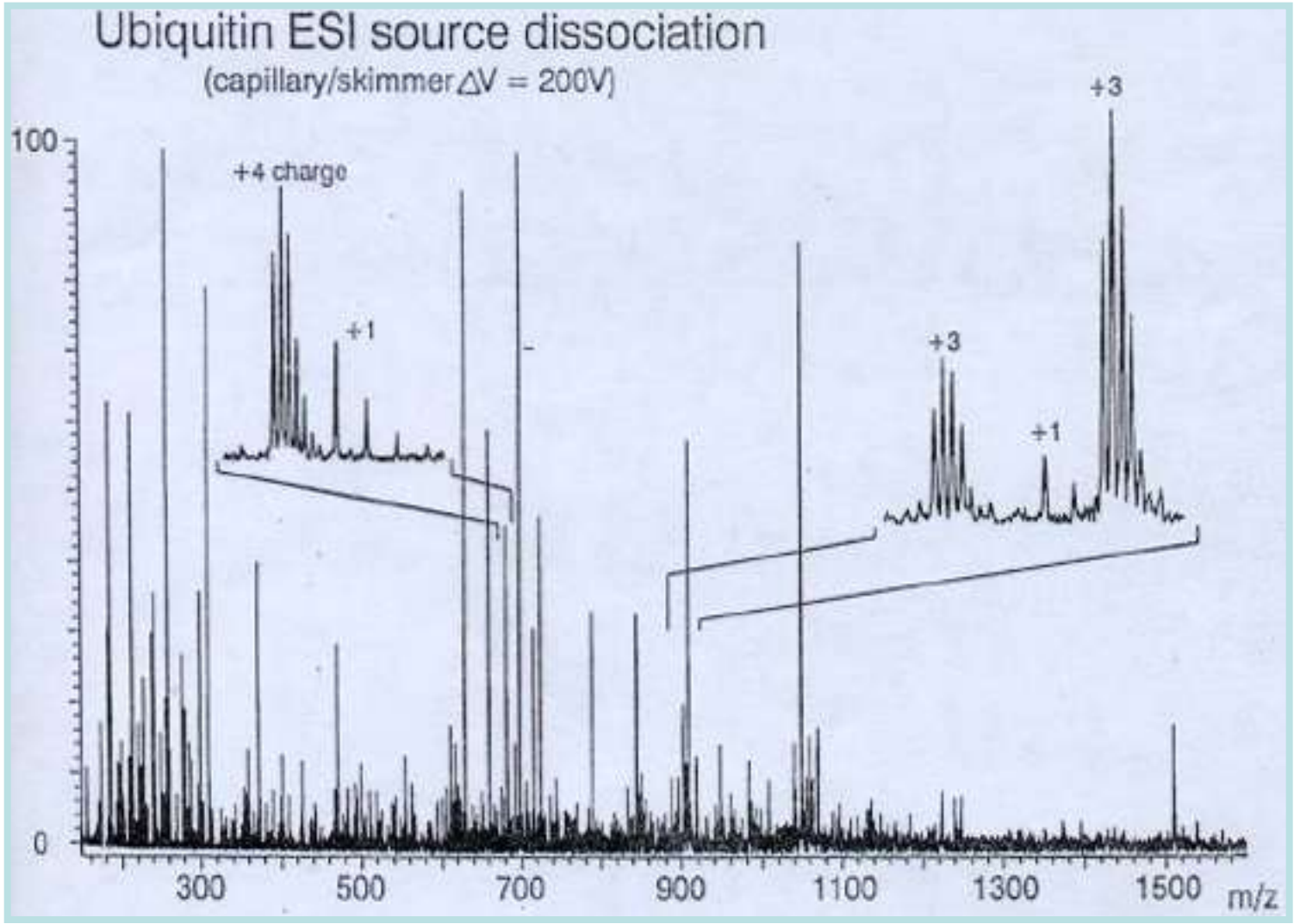
$$\frac{1}{0.2} = 5$$

$$\frac{1}{0.034} = 29$$



多电荷离子在 ESI 源内 CID

- 若这是低分辨质谱图则很难得到其还原谱图
- 只有高分辨质谱图才有可能作这种还原



非共价键相互作用

分子间或集团间弱的相互作用，包括：

(1) 静电作用

(2) 氢键作用

(3) 范德华力作用

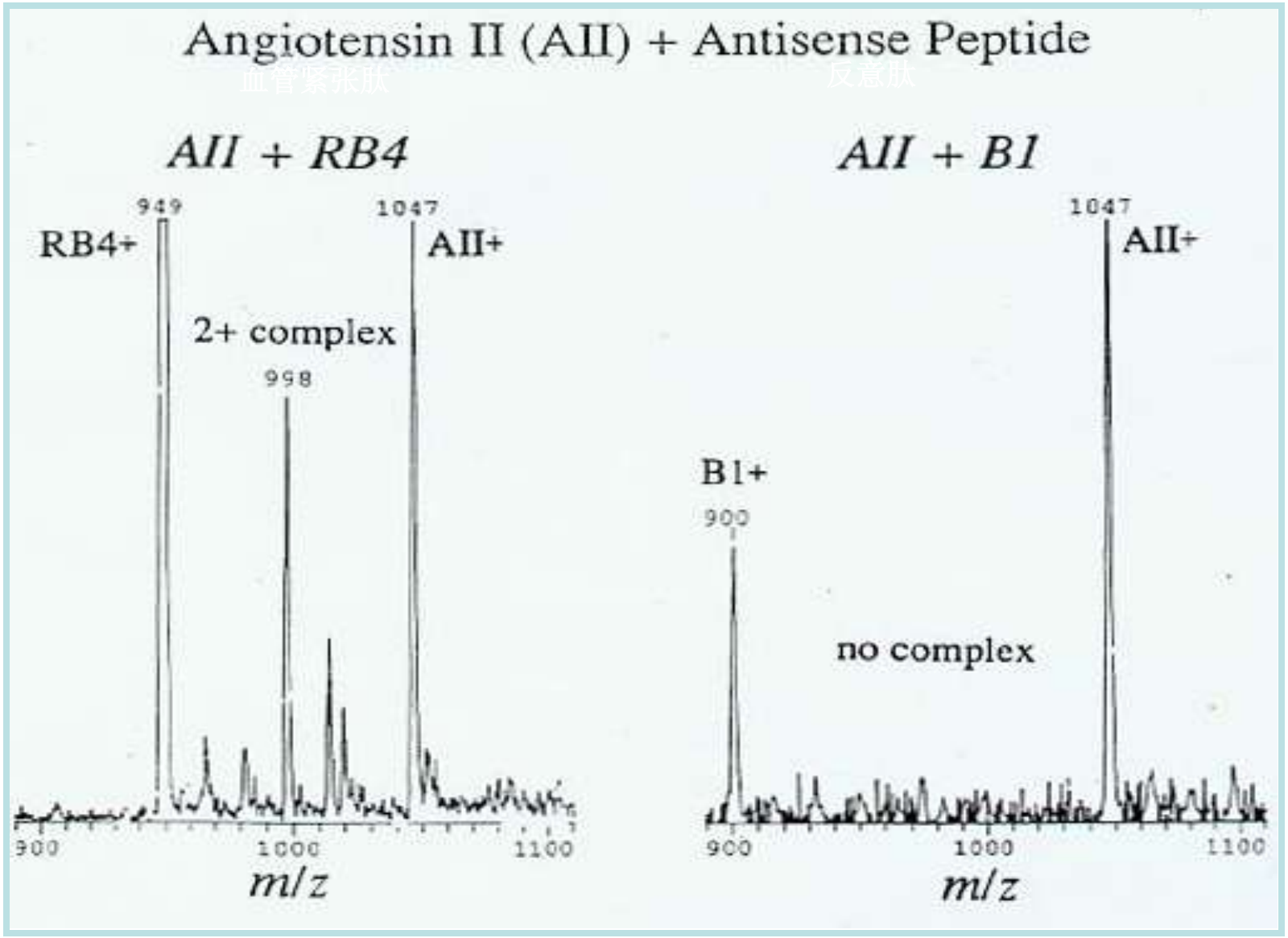
(4) 疏水作用

(5) 阳离子 – π 键相互作用

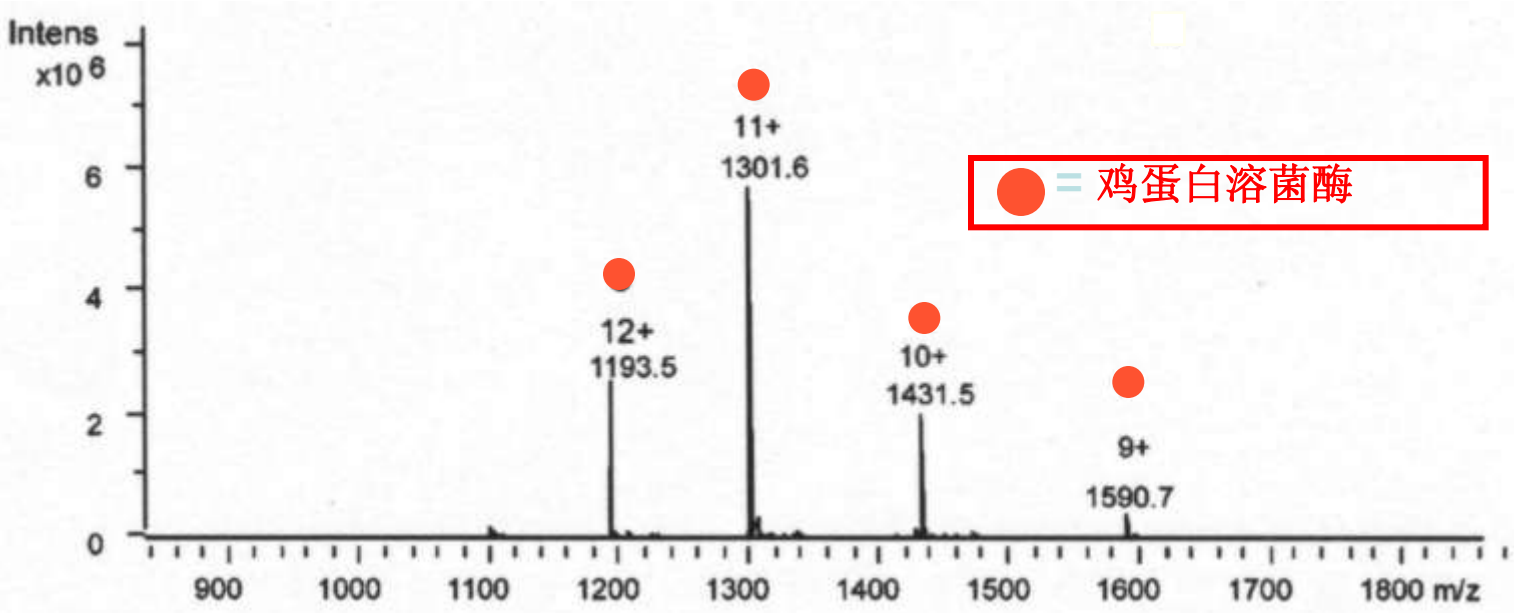
用 **ESI** (软电离技术) 可研究非共价键相互作用

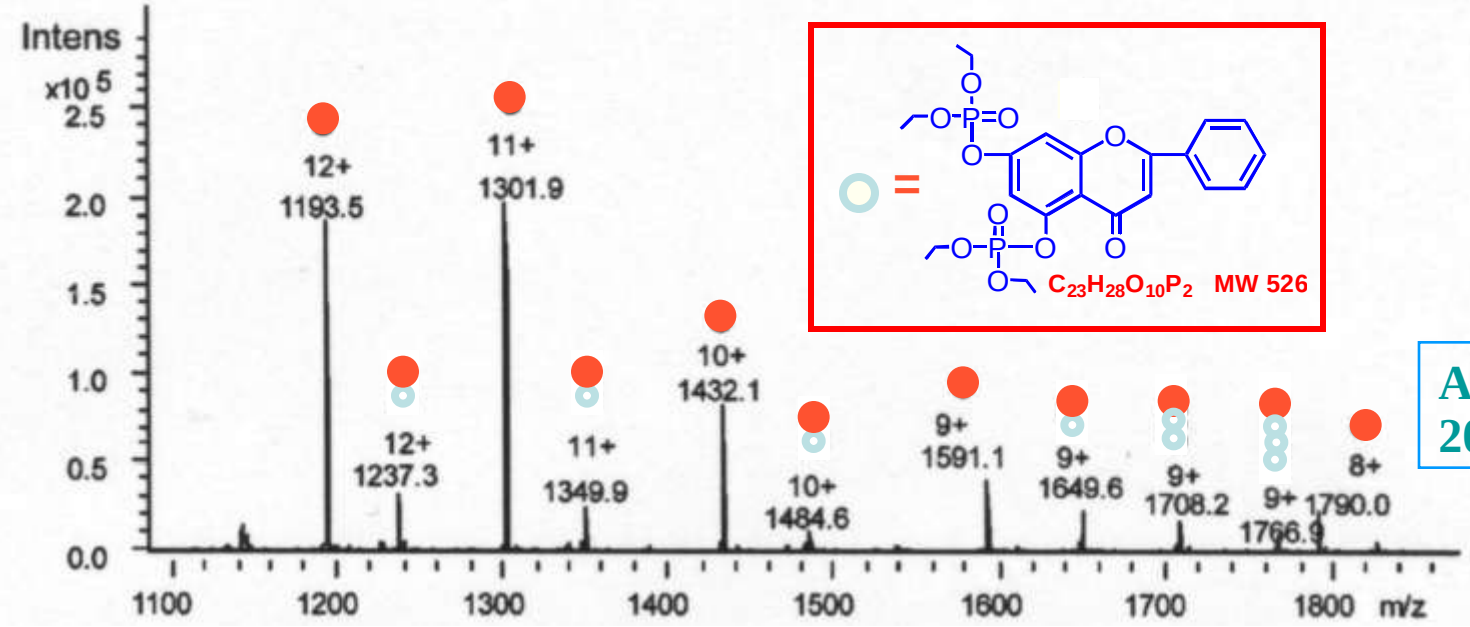
ESI 是目前最温和**(Soft)**的离子化技术

用 ESI 研究非共价键相互作用



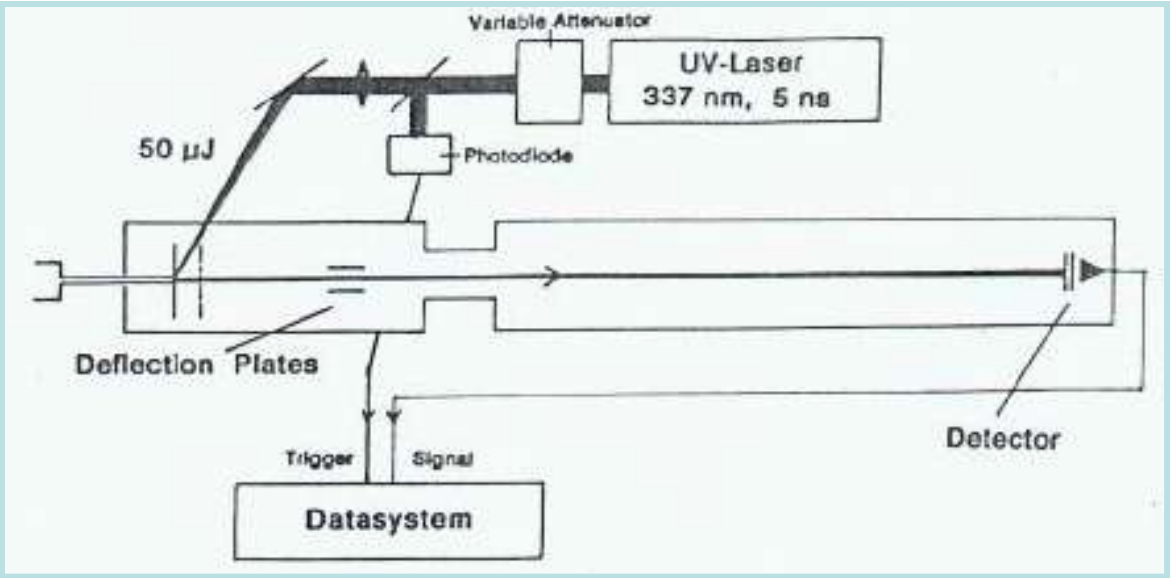
用 ESI 研究非共价键相互作用

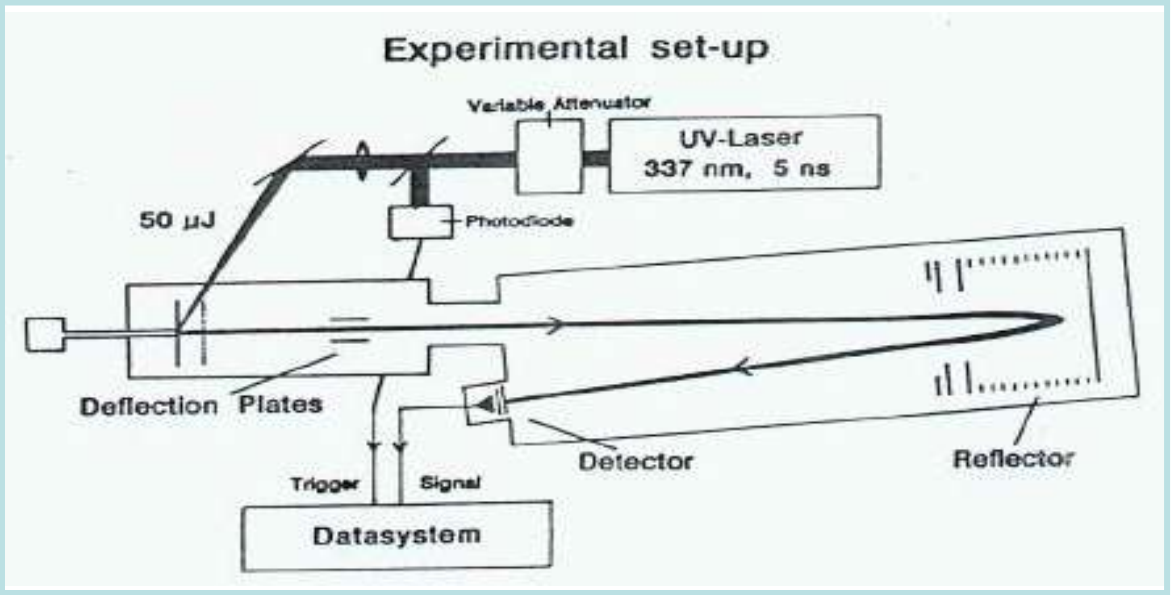




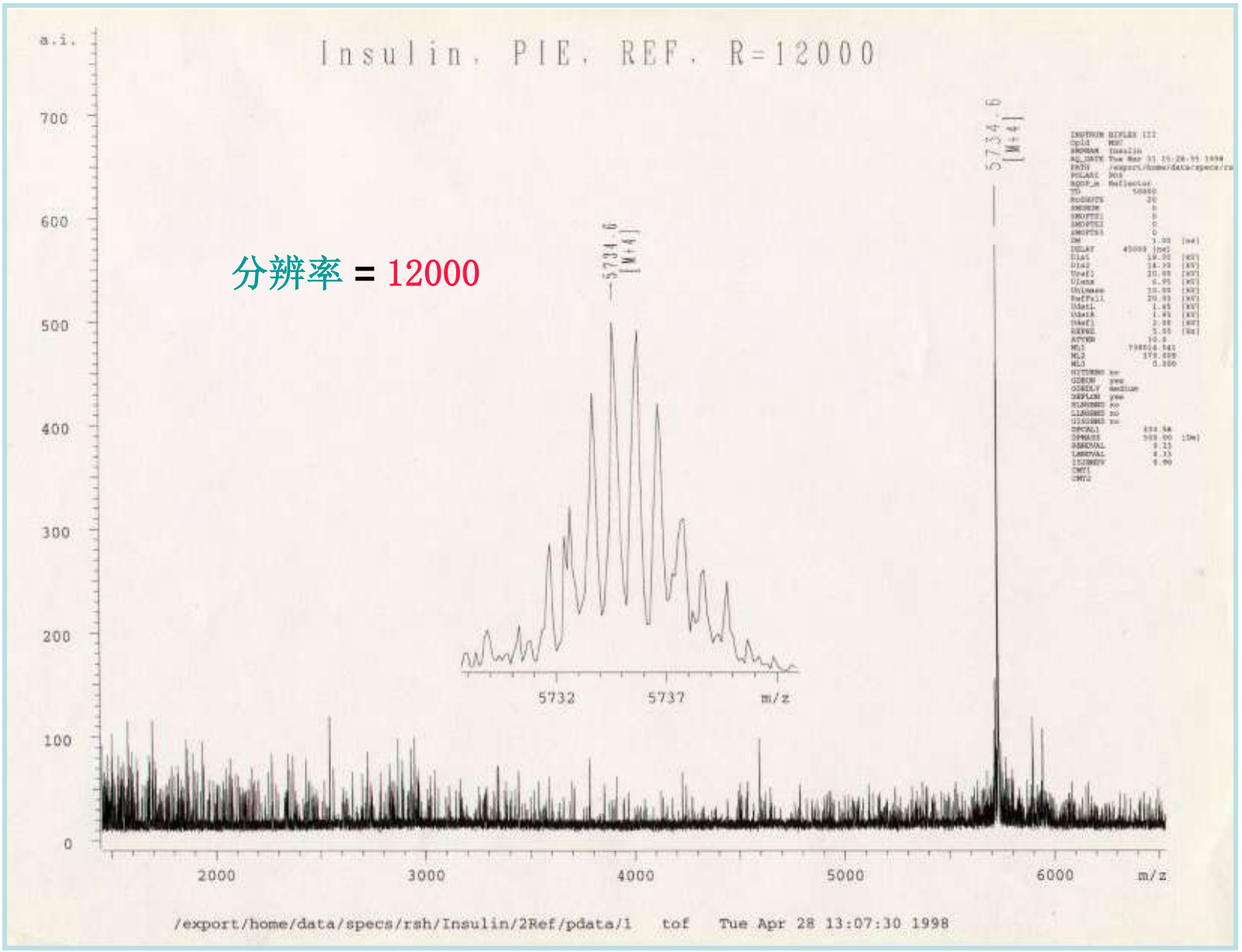
Anal. Chem. 2004, 76, 211

基质辅助激光解吸电离
Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI





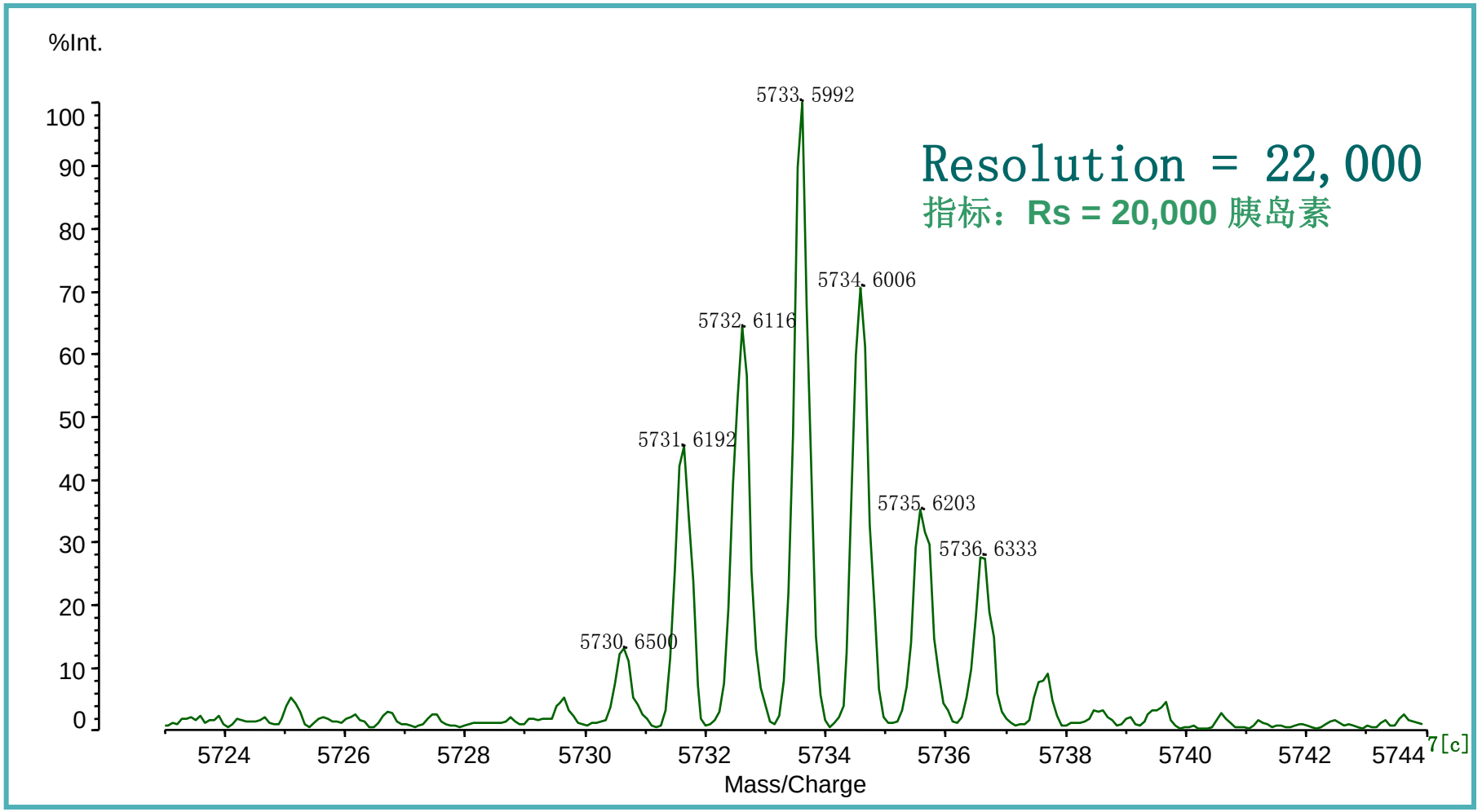
胰岛素的 MALDI-TOF 质谱图



分辨率 = 12000

反射方式分辨率

Measurement Mode : **Reflectron MS**
Sample : Bovine Insulin
Matrix : Sinapinic acid



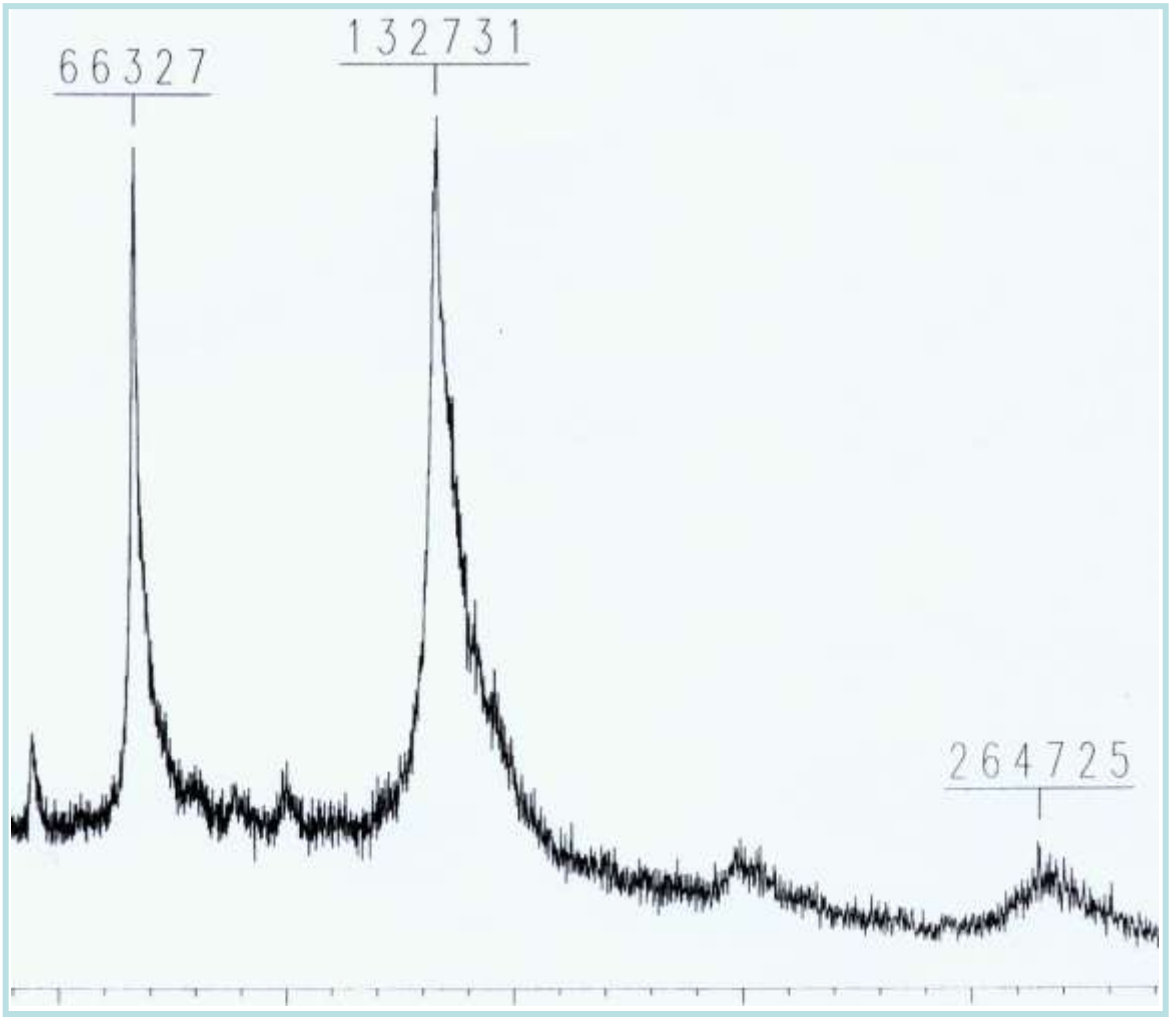
AXIMA-CFR *plus*

SHIMADZU BIOTECH

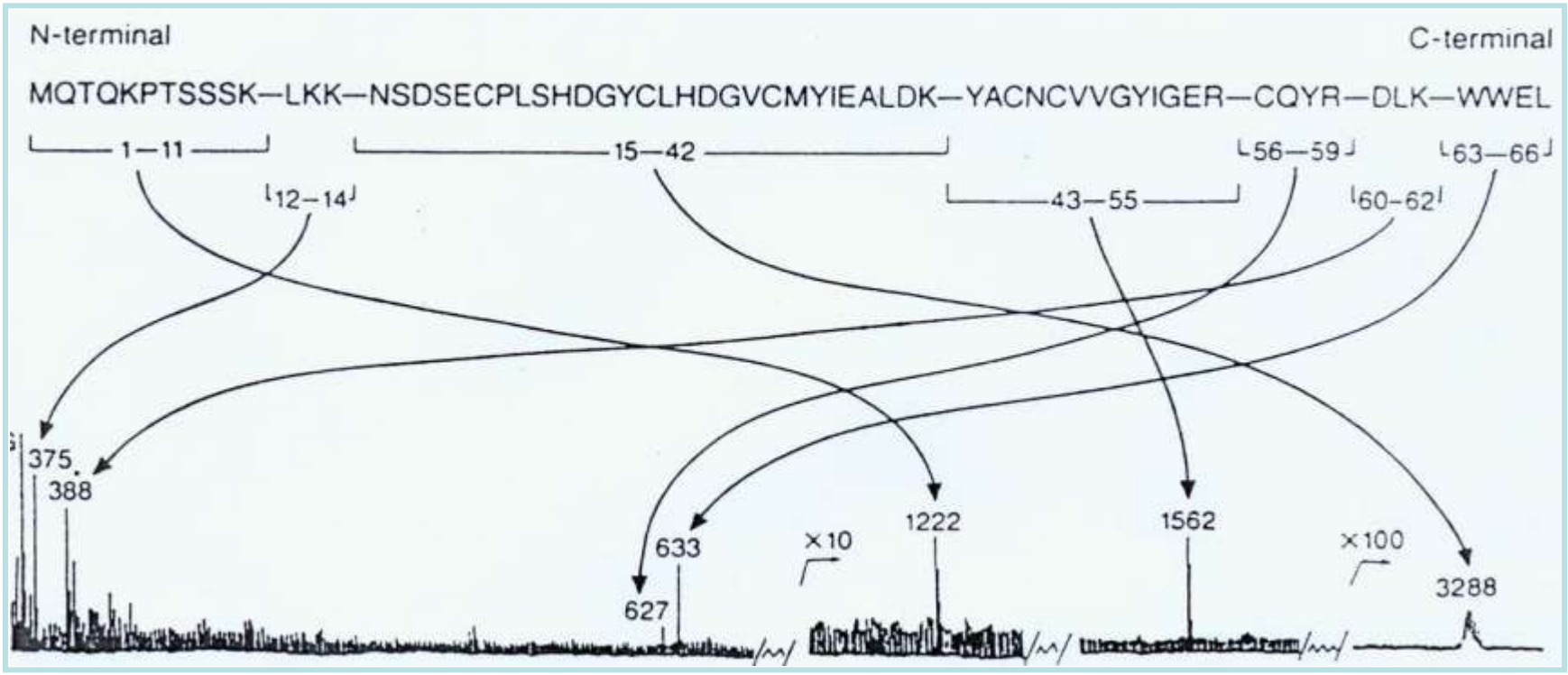
牛血清白蛋白 (BSA) 的 MALDI-TOF 质谱图

MALDI-TOF 能分析的大分子

样品是 BSA 的二聚体, (MH^+)=13,2731，还可观察到两个二聚体的缔合物，质量数高达 26,4725



肽质量指纹谱
Peptide Mass Figerprinting, PMF



人肺癌细胞中蛋白的二维凝胶电泳分离

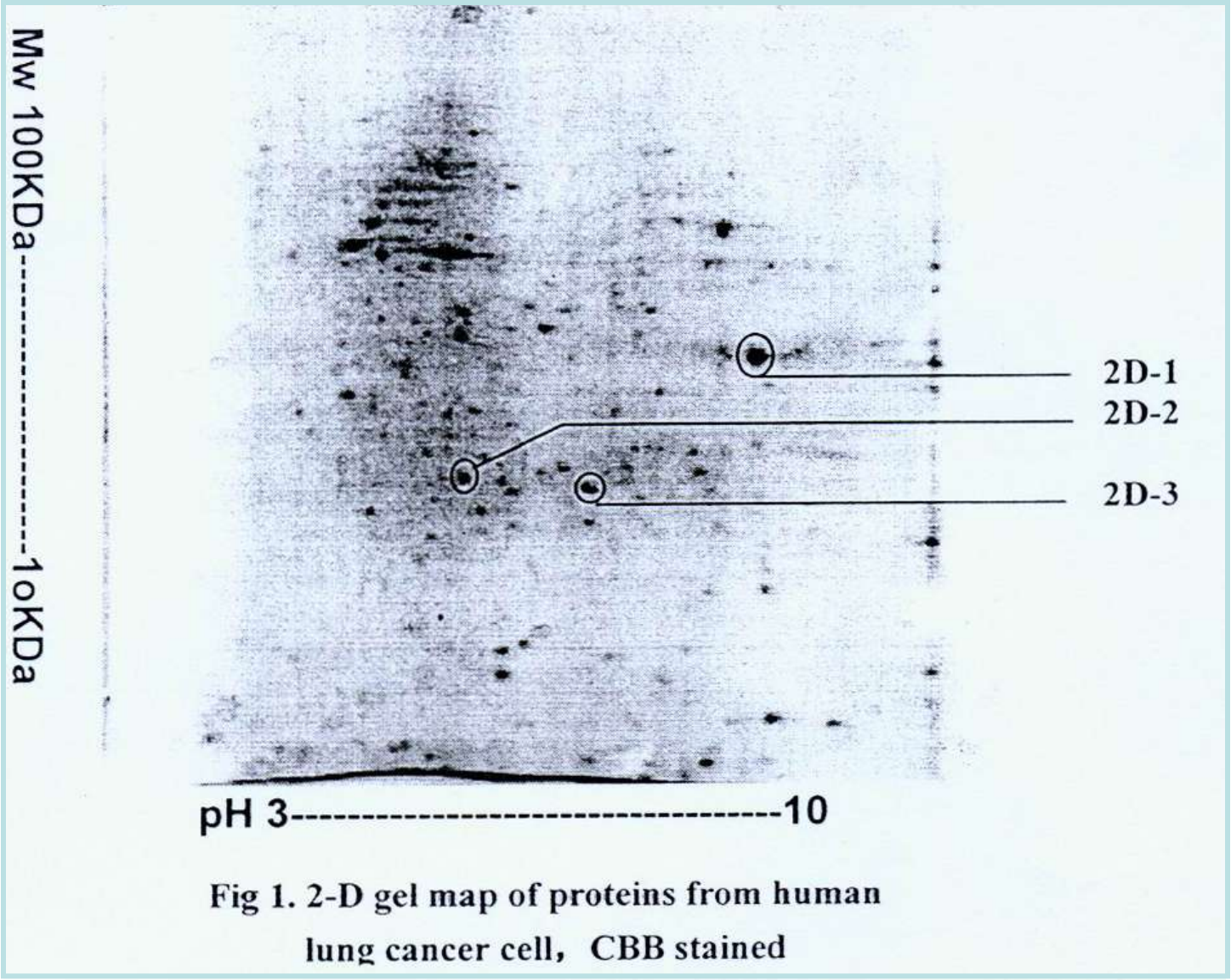
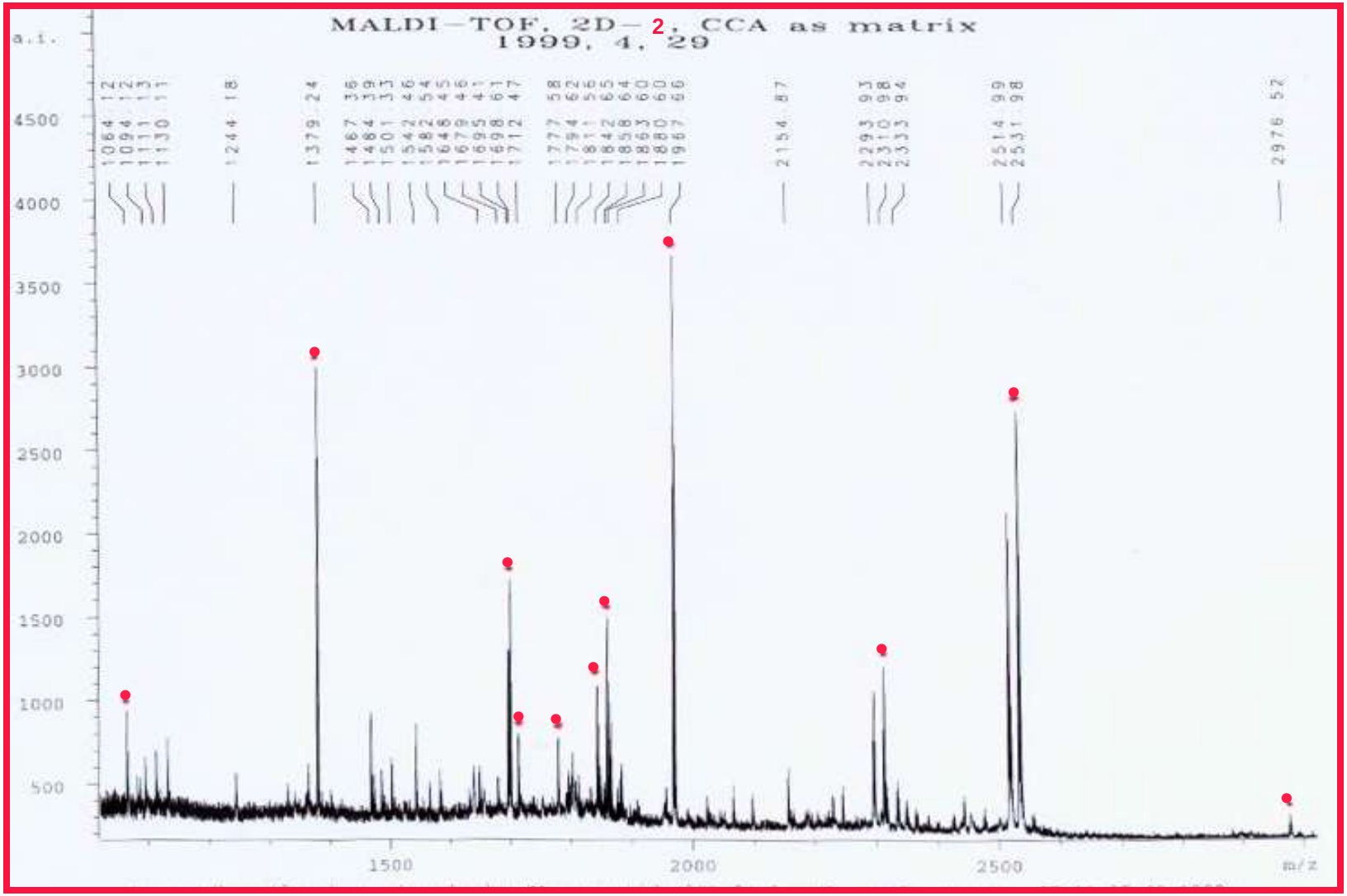


Fig 1. 2-D gel map of proteins from human lung cancer cell, CBB stained

2D-3 点上蛋白的 PMF 谱

图上 • 表示其质量数与库中某蛋白的肽段相符



2D-2 号蛋白检索结果

点 2D-2 的检索结果如表 3 所示：

Table 3. Database searching result of spot 2D-2

1 match found.

Score	# peptide matches	AC	ID	Description	pI	Mw
0.53	9	P09936	UBL1_ HUMAN	UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE ISOZYME L1 (EC 3.1.2.15) (UCH- L1) (UBIQUITIN THIOLESTERASE L1) (NEURONCYTOPLASMIC PROTEIN 9.5) (PGP 9.5). - HOMO SAPIENS (HUMAN).	5.33	24824.34

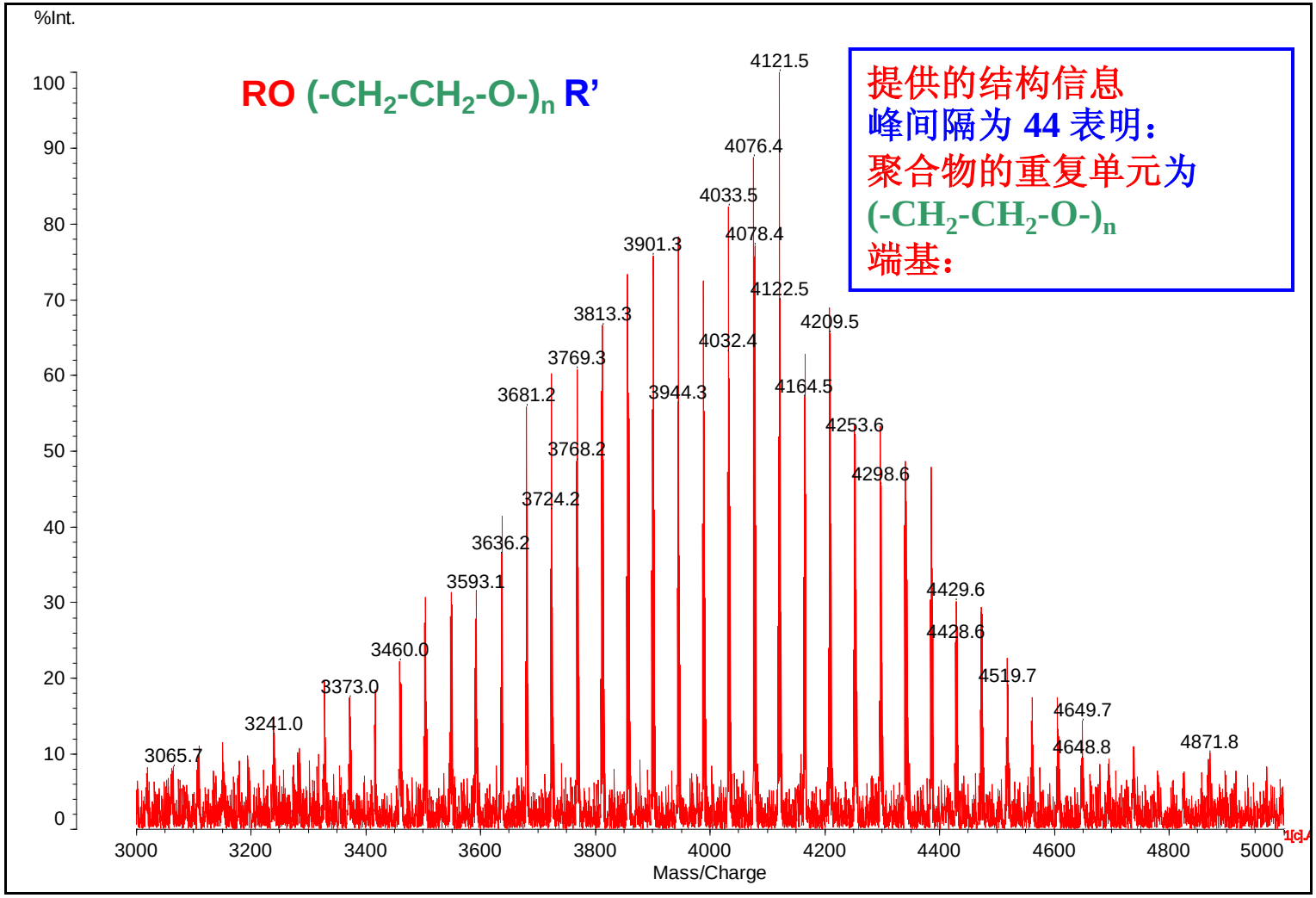
Detailed results

User mass	Matching mass	Delta mass (Dalton)	#MC	modification	Position	Peptide Sequence
1064.12	1064.5622	0.4422	0		106-115	LGFEDGSVLK
1379.24	1379.655	0.415	1		203-213	EFTEREQGEVR
1712.47	1712.7796	0.3096	1	MSO:124	116-129	QFLSETEKMSPEDR

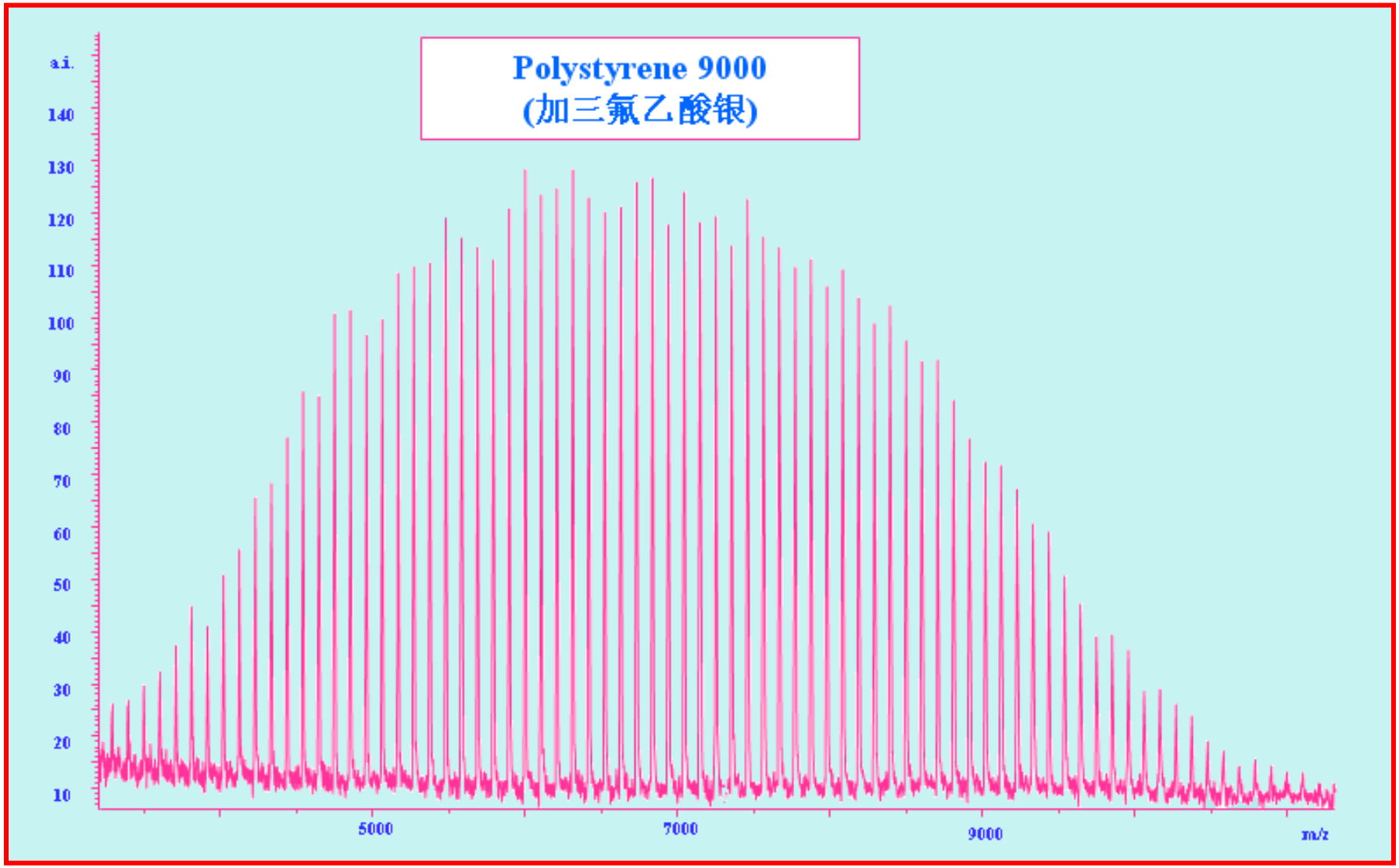
MALDI 的应用

- 蛋白和多肽 (Peptides and Proteins)
- 寡聚核苷酸 (Oligonucleotides)
- 碳水化合物 (Carbohydrate)
- 合成高分子聚合物 (Synthetic polymers)
- 类脂类 (Lipids)
- 天然产物 (Natural products)
  (生物碱、甙类、甾类等)
- 合成有机物

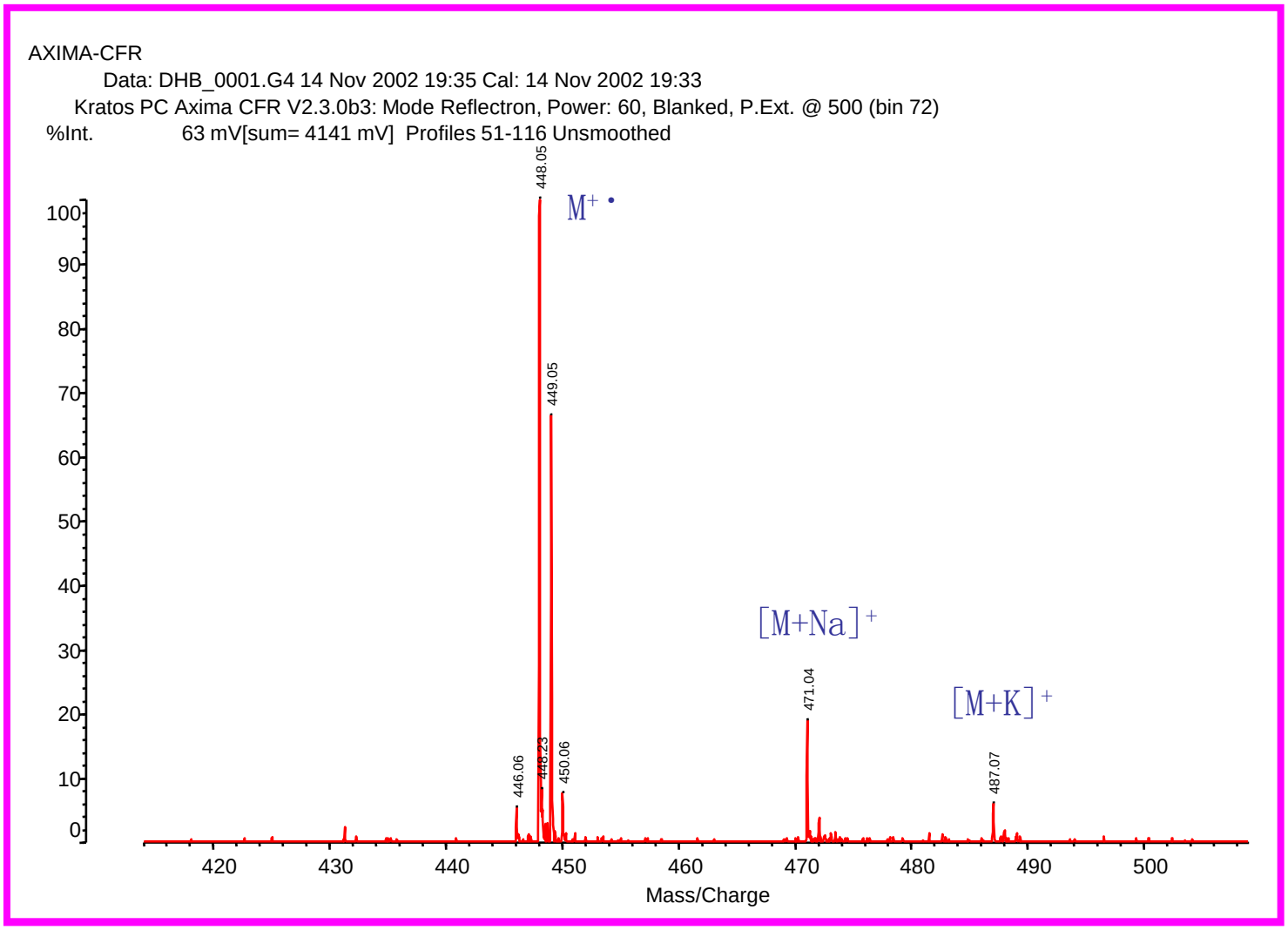
Polymers (e.g. PEG4000-Li)



非极性高聚物聚苯乙烯

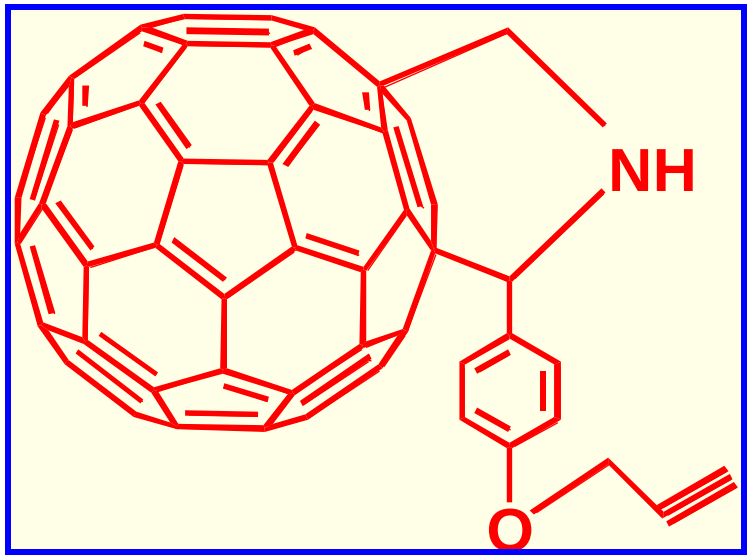

Polystyrene 9000
(加三氟乙酸银)
a.i.
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5000
7000
9000
m/z

Small molecules / pharmaceuticals



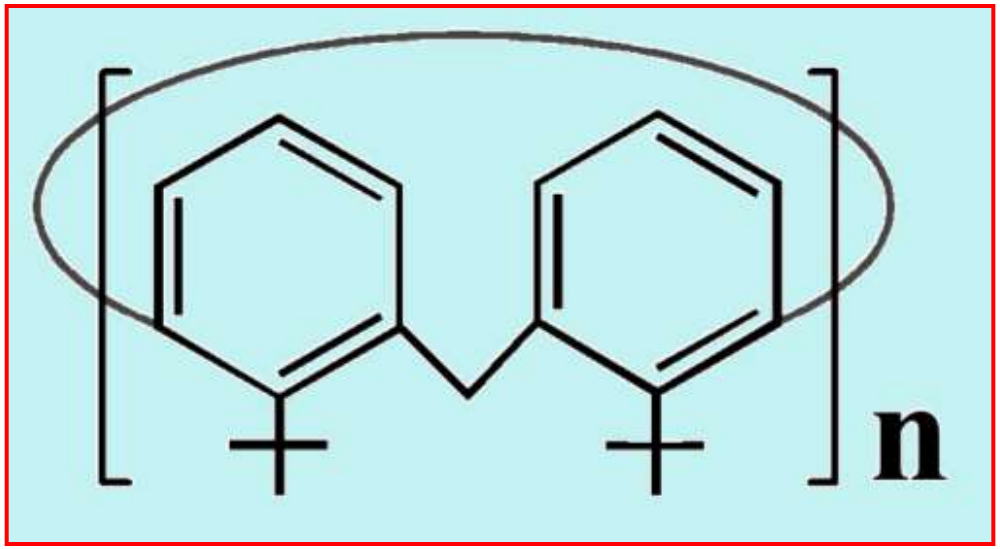
Sample 3 (exp. Mass = 448.1086 Da). Matrix: DHB

合成有机物

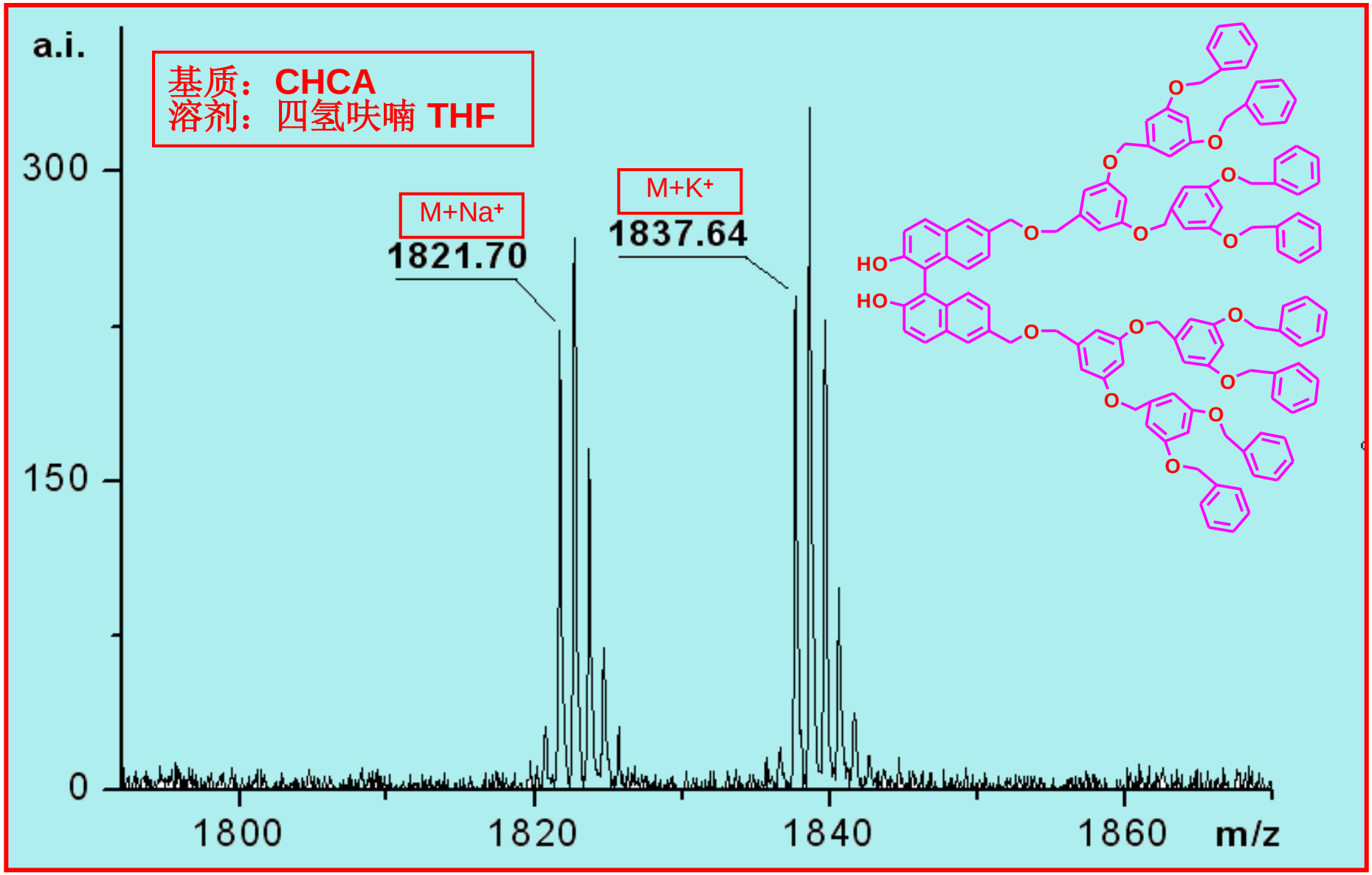


C_{60} 衍生物

杯芳烃

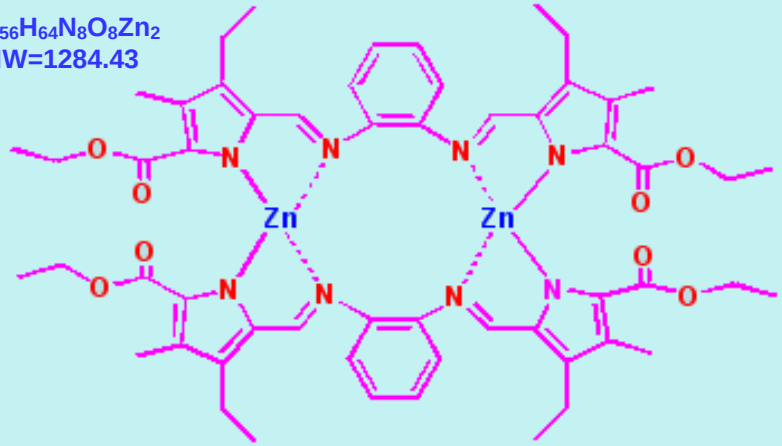


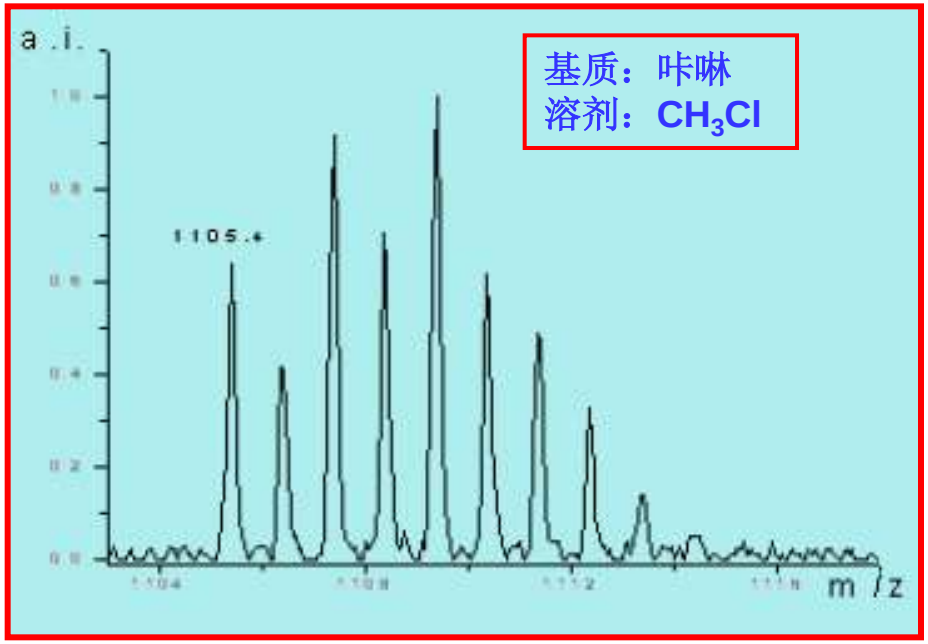
树枝状化合物 (*Dendrimer*)



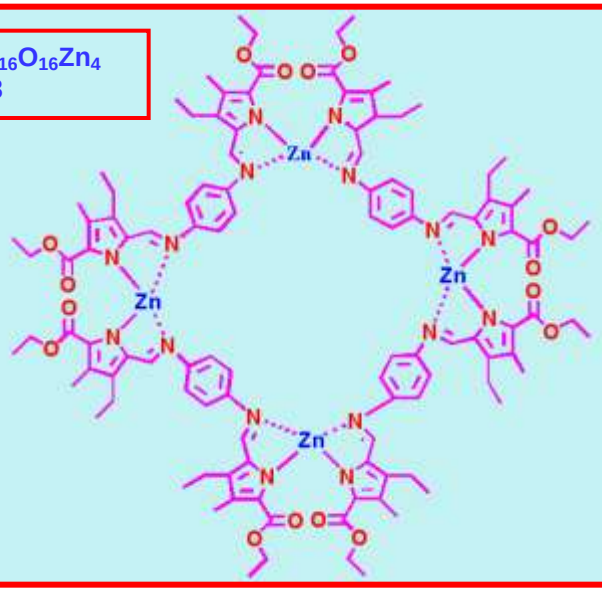
金属有机化合物

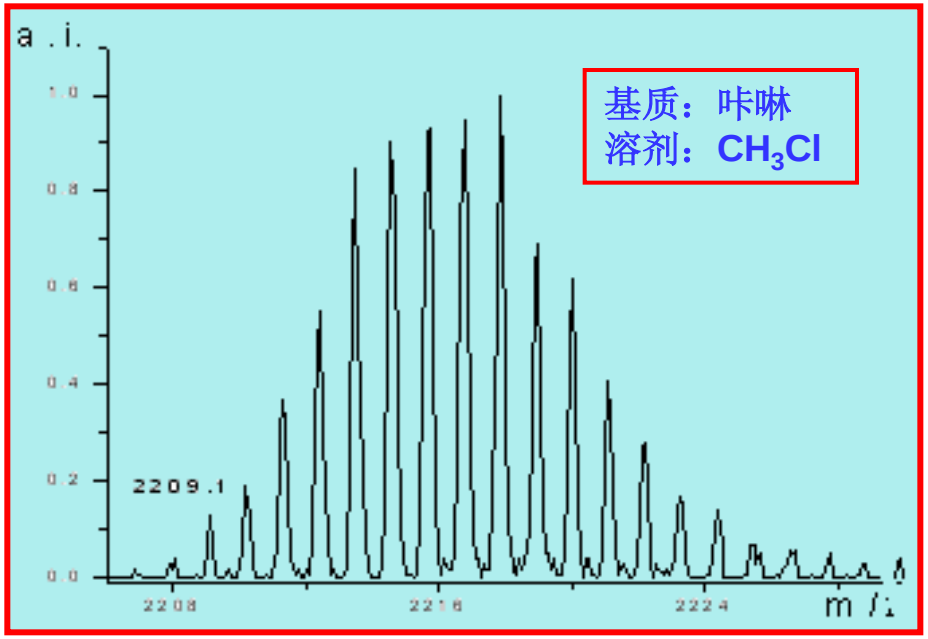
$C_{56}H_{64}N_8O_8Zn_2$
MW=1284.43





$C_{112}H_{128}N_{16}O_{16}Zn_4$
MW=2208

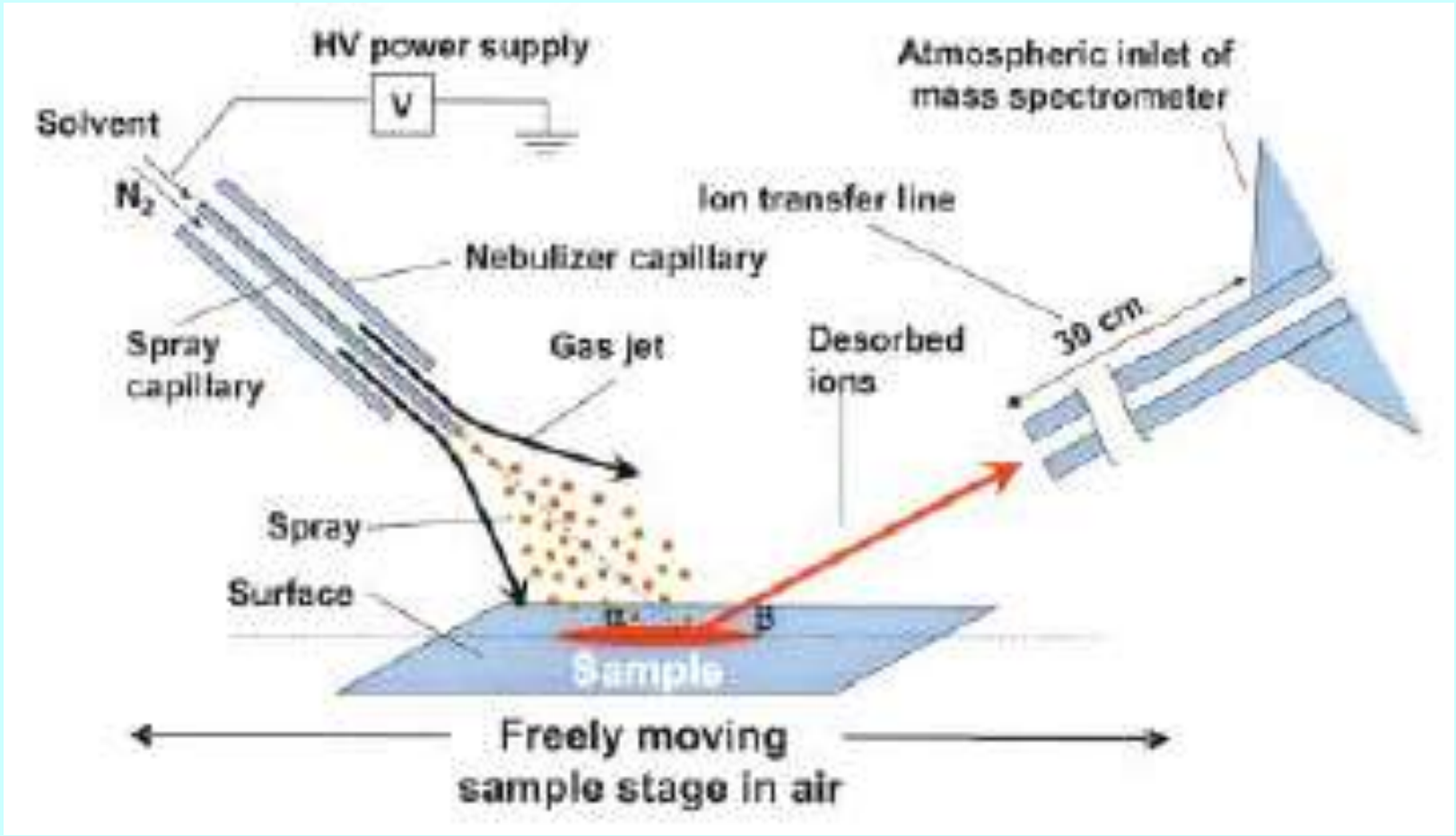




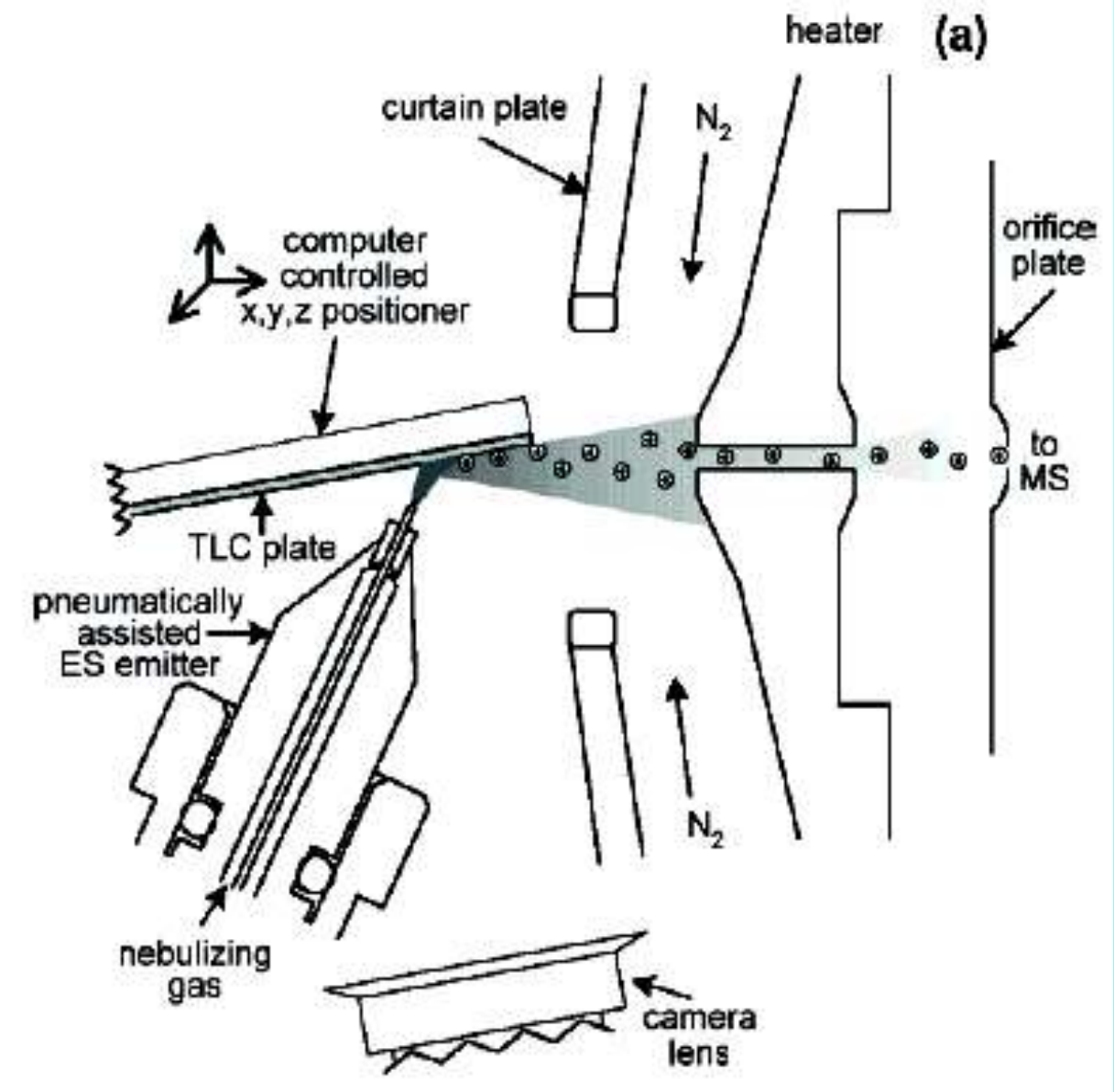
Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 3271-3274.

Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization

SCIENCE VOL 306, 471 (15 OCTOBER 2004)



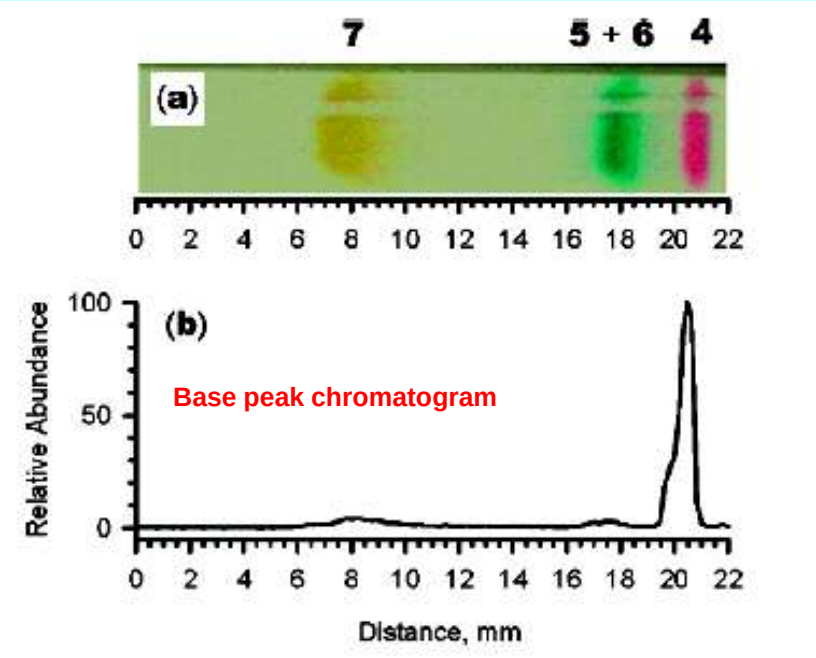
Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry Coupled Using Desorption Electrospray Ionization

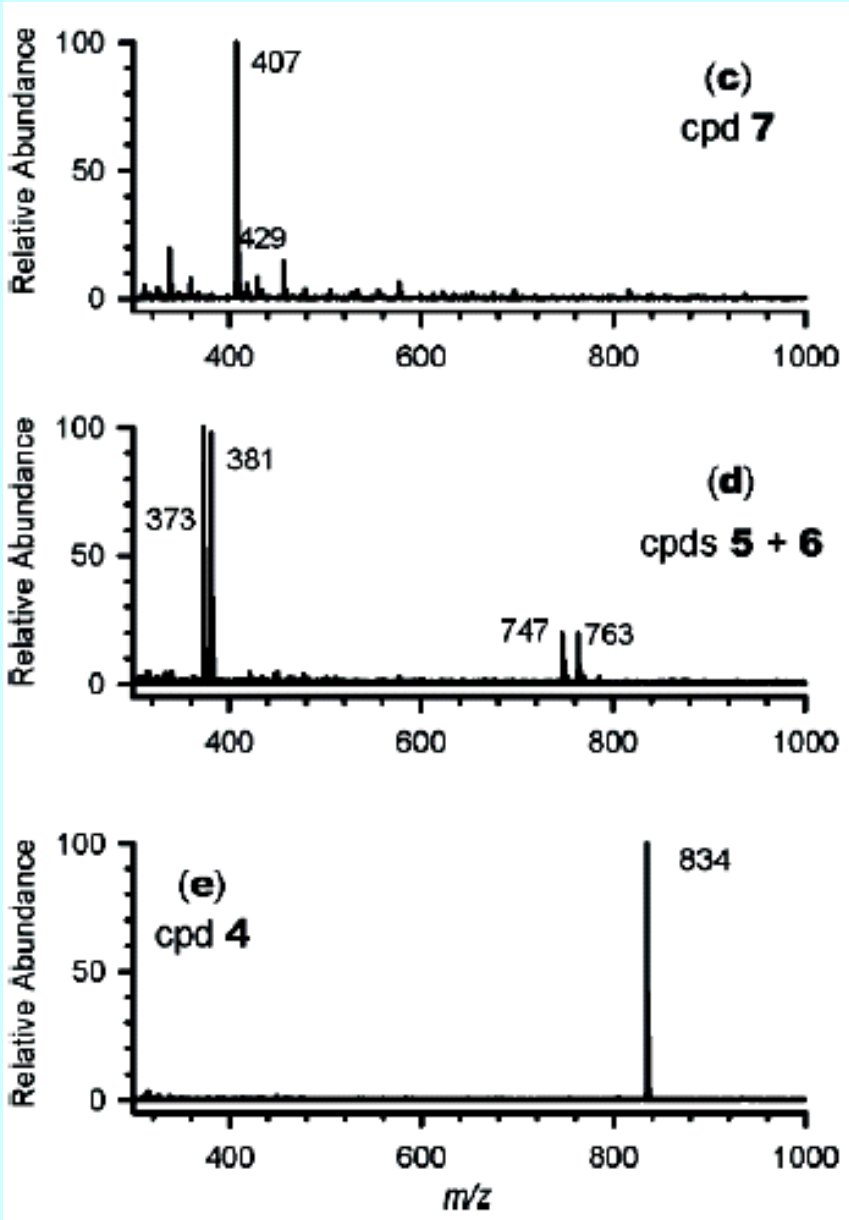


Anal. Chem. 2005, 77,1207-1215

Thin-Layer Chromatography and Mass Spectrometry Coupled Using Desorption Electrospray Ionization

mixture of FD&C dyes





北京质谱中心

- 国内第一个联合共建的大型仪器中心
- 出资部委：科技部、教育部、科学院
- 地点：中国科学院化学研究所
- 依托单位：中国科学院化学研究所
- 人员组成：化学所、北京大学
- 仪器管理、维护、配套条件：化学所
- 管理机构：协调小组→管理委员会→学术委员会→中心主任→中心工作人员

仪器1　Apex II型FT-ICR质谱仪



仪器2　Biflex III型MALDI-TOF质谱仪



仪器3　GCT型GC-TOF质谱仪



仪器4　QP2010型GC/MS质谱仪



仪器5　LCMS2010型LC/MS质谱仪



仪器6　Ultima Global型Q-TOF质谱仪




谢 谢