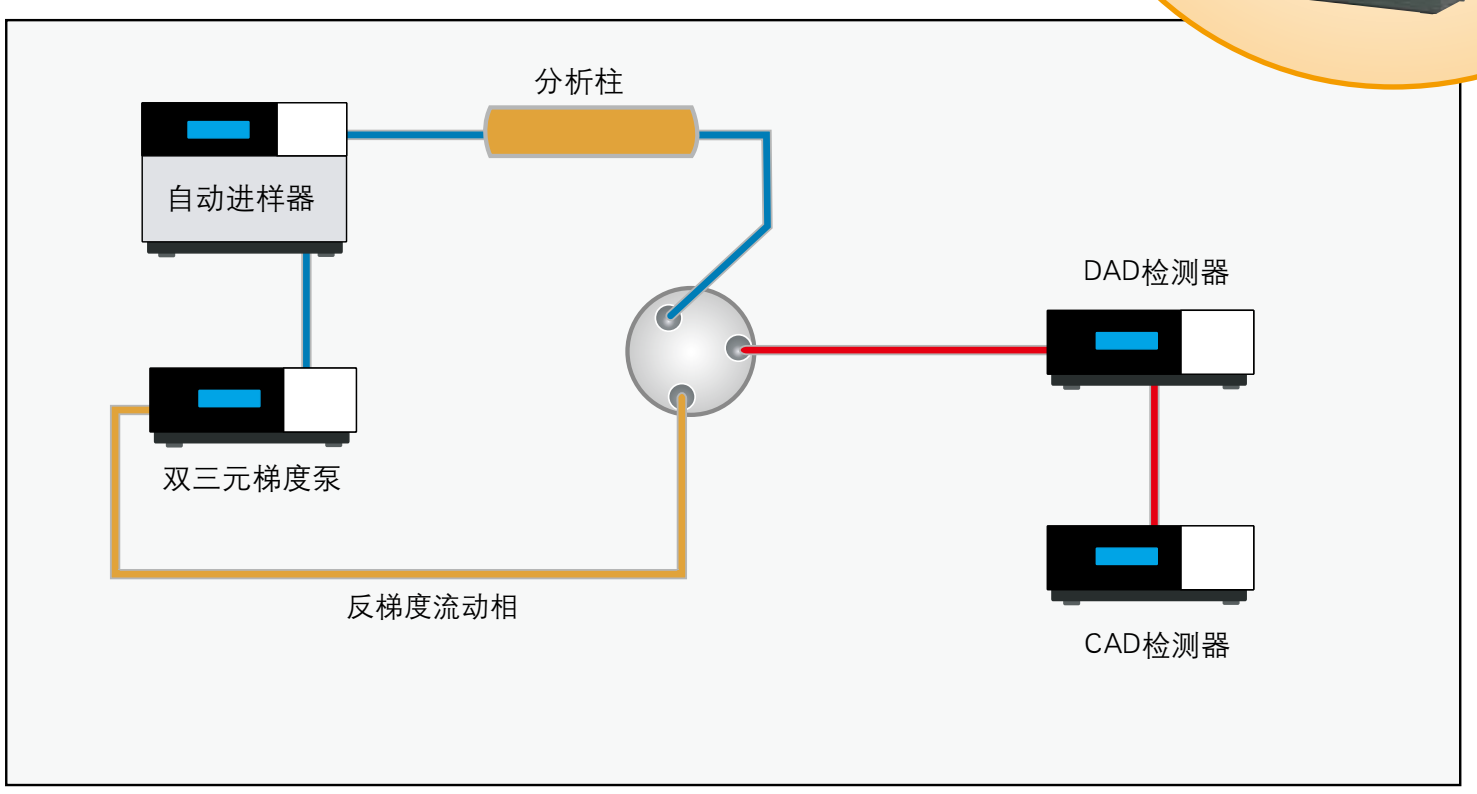
赛默飞创新技术应用系列

双三元液相色谱DGLC（四）

在线柱后衍生和反梯度补偿技术



ThermoFisher
SCIENTIFIC

全国免费服务热线：800 810 5118，400 650 5118

—— 在线柱后衍生和反梯度补偿技术

衍生化是指被测物质与相应的试剂发生化学反应，改变被测物质的化学和物理性质，提高被测物质的检测灵敏度，改善被测物质混合物的分离度，从而达到利于分析的目的。衍生化在HPLC分析中应用广泛，其中在线柱后衍生使用居多。传统的在线柱后衍生需要一个独立的泵来输送衍生试剂以实现衍生的目的，但这些额外的独立装置有时由于与液相色谱系统本身不能进行很好的联用，往往导致运行不甚理想。赛默飞双三元液相色谱系统由于具有两个独立的泵和流路，一个泵进行分析，另外一个泵可以完成如输送衍生试剂等的辅助功能，可以很好地实现在线柱后衍生应用，而且这些功能很多情况只需要一个简单的柱后三通或反应管的连接就可以实现。此外，在HPLC和MS联用时，为了增强离子化效率，需要另外的流路泵入甲酸或乙腈，使用赛默飞双三元液相色谱系统也可以简单方便地实现这样的功能。

反梯度补偿技术是指在色谱柱后进入检测器前加入另一与分析时溶剂组成相同但比例相反的溶剂，使进入检测器的溶剂浓度保持不变，从而使检测条件更加稳定，提高检测效果。当使用基于雾化机理的检测器（如电雾式检测器CAD或蒸发光散射检测器ELSD）进行梯度分析时，由于被测物质的响应值与雾化效率密切相关，而流动相的组成是影响雾化效率的重要因素，但由于梯度分析时流动相的组成在不断改变，样品中各组分的雾化效率也随着在不断变化，这将直接影响待测物质响应的一致性。使用双泵设计的赛默飞双三元液相色谱系统，通过应用反梯度补偿技术可以避免该因素对检测的影响，从而实现对目标物的准确分析。

在线柱后衍生改善被测物质的检测灵敏度

黄曲霉毒素（AF）是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物，具有极强的毒性和致癌性，可引发动物的肝癌、肾癌、胃癌等，其中B1的毒性最强。我国规定在玉米、花生、花生油、坚果和干果等食品中的最高允许含量为20 μg/kg。1995年，世界卫生组织制定的食品黄曲霉毒素最高允许浓度为15 μg/kg。要准确测定黄曲霉毒素的含量，需将其衍生化以提高检测灵敏度。采用双三元液相色谱系统，使用双三元液相色谱的右泵作为分析泵，左泵做衍生泵，以0.05%碘溶液作为衍生反应试剂，一套系统即可方便自动化地实现在线柱后衍生，提高黄曲霉毒素的检测灵敏度，以满足法规的检测要求。

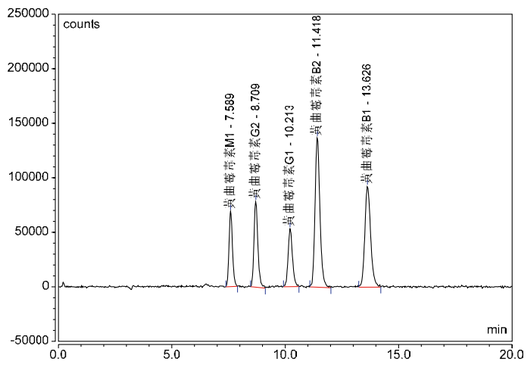


图1 黄曲霉毒素标准品测定谱图
（黄曲霉毒素M1：2.5 ppb；黄曲霉毒素G1、G2、B1、B2：0.75 ppb）

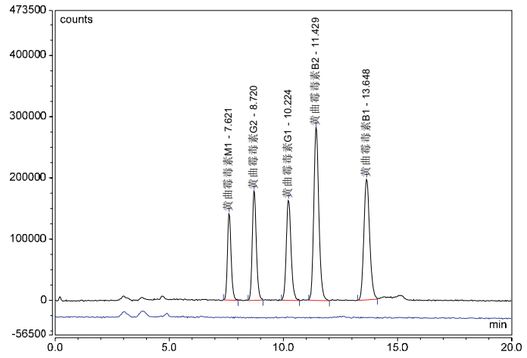


图2 样品及其加标测定谱图

通过系统的方法学验证表明该方法完全满足法规的测定要求，检测灵敏度较高，检出限分别为M1 0.1 ppb、G1 0.04 ppb、G2 0.03 ppb、B1 0.03 ppb和B2 0.018 ppb，方法准确度和重现性较好。

针对雾化机理检测器的反梯度补偿技术

所有基于雾化原理的检测器（如CAD,ELSD），其响应值均会随流动相中有机相比例的变化而变化，通过双三元液相色谱系统的反梯度补偿技术，可以使流动相组成保持不变，从而使相同含量的组分具有更加趋于一致的响应。电雾式检测器（Charged Aerosol Detector, CAD）为赛默飞独有的一种新型质量通用型检测器，可用于分析无（或弱）紫外吸收的不（半）挥发性成分。可对分析物提供独立于化学结构的一致的响应，无需复杂的优化即可得到可预见的结果。在药物杂质分析和天然药物多组分定量分析中，经常无法获得所有物质的对照品，却需要对所有物质进行定量或半定量分析，CAD检测器则可以解决这个难题，它可以在只有其中一种对照品的情况下实现对其他组分的定量或半定量分析。如果您配备了双三元液相色谱系统，在梯度分析过程中就可以进行反梯度程序进行柱后梯度补偿，从而可在整个梯度范围内获得一致的响应，使分析结果更加准确。仪器连接示意图见图4.

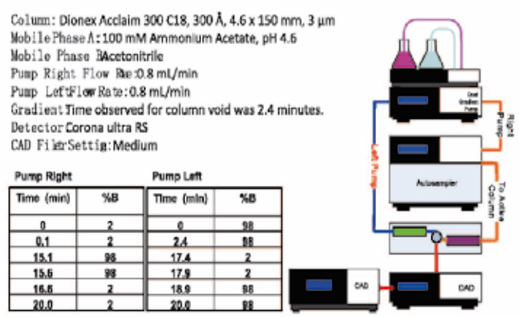
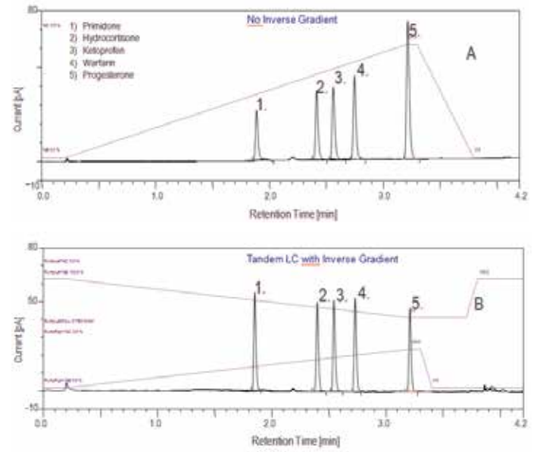


图3 双三元液相色谱系统反梯度补偿技术示意图

分析柱（Active column，紫色）按照常规使用，与右泵、自动进样器和检测器连接（本图为DAD与CAD串联分析待测化合物），并安装在柱温箱中；柱后补偿柱（Delay column，绿色）也安装在柱温箱中，且规格尺寸与分析柱一样，利用三通连接管将分析柱和补偿柱连接在入口处一端，检测器则连接在出口处一端。所有连接管线耐压且具有良好密封性。通过反梯度补偿技术使得进入CAD检测器的流动相组分比例保持恒定从而产生一致的响应信号，如图4所示。



A. 未使用反梯度补偿技术 B. 使用反梯度补偿技术
图4 反梯度补偿技术对响应信号的影响

通过以上的介绍可知，赛默飞UltiMate 3000双三元液相色谱（DGLC）系统，采用独特的双泵设计，每个泵作为一个单独的体系，有各自独立的比例阀和流动相体系，可同时单独控制三种不同的流动相，在Chromeleon变色龙软件的支持下，可实现如在线柱后衍生和反梯度补偿等的辅助功能应用，极大地满足您对一些特殊应用的需求。

参考文献

1 柱后碘衍生法测定芝麻中的黄曲霉毒素

2 双三元液相色谱应用文集