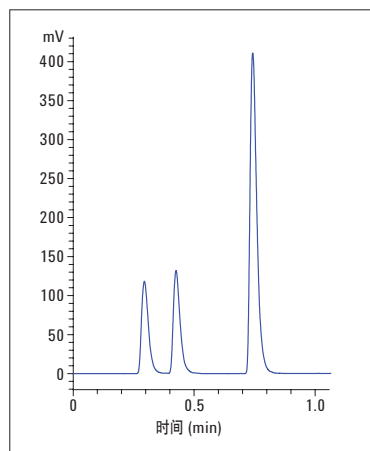


# Agilent 1290 Infinity 蒸发光散射检测器的性能特点

## 技术概述

### 作者

Bettina Schuhn  
安捷伦科技有限公司  
德国瓦尔德布隆



### 摘要

Agilent 1290 Infinity 蒸发光散射检测器 (ELSD) 对于多种化合物可以实现宽检测范围, 同时具有优异的低至纳克水平的检测灵敏度、更高的效能和更好的重现性。它非常适合分析半挥发和不挥发性化合物, 以及没有 UV 发色团的化合物, 例如多数氨基酸和糖类。1290 Infinity ELSD 不依赖于化合物的光学特性, 无需衍生和繁冗的样品制备即可对化合物进行检测。

本技术概述阐明与 Agilent 1290 Infinity LC 系统联用的 1290 Infinity ELSD 可改善检测灵敏度和性能。1290 Infinity ELSD 显然比其它任何 ELSD 都具有更高的检测灵敏度, 即使在低浓度下也能给出满意的数据。



**Agilent Technologies**

## 前言

1290 Infinity ELSD 是对没有发色团的分析物进行分析的理想检测器。ESLD 检测基于分析物的通性，所使用的蓝色激光光源可以在宽浓度范围内获得高灵敏度的结果。1290 Infinity ELSD 可以高速输出数据，从而可以与 1290 Infinity LC 联用。1290 Infinity ELSD 非常适合快速液相色谱分析应用。与 Agilent 385 ESLD 相比，本技术概述展示出 1290 Infinity ELSD 具有明显更低的检测限。更高的激光强度辅以高增益光电倍增管和数字信号处理技术，提高了其信号强度并降低了噪音。

本技术概述展示了该检测器具有极好的数据重现性，并且结果更加可靠和准确，一致性更高。在不衍生的条件下，我们分离检测了咖啡因和三种氨基酸。采用蒸发光散射检测器进行检测，同时串联 UV/DAD 检测。

1290 Infinity ELSD 可以单独使用，或者在 HPLC 系统中与其它类型的检测器串联使用。如果连同其它检测器一起使用，必须将 1290 Infinity ELSD 串联到末尾位置，因为在分析过程中会将溶剂和洗脱液蒸干。

## 操作原理

1290 Infinity ELSD 是一款高灵敏度检测器，可对液流中半挥发和不挥发性化合物进行检测。含有溶质的溶剂流首先被雾化 (1)，并被气流携带通过蒸发室 (2)。溶

剂挥发掉，留下溶质颗粒形成的薄雾，它可将光散射至光敏器件 (3)。信号被放大后，一定的电压输出可以使我们了解通过光检测池的溶质颗粒的浓度 (图 1)。

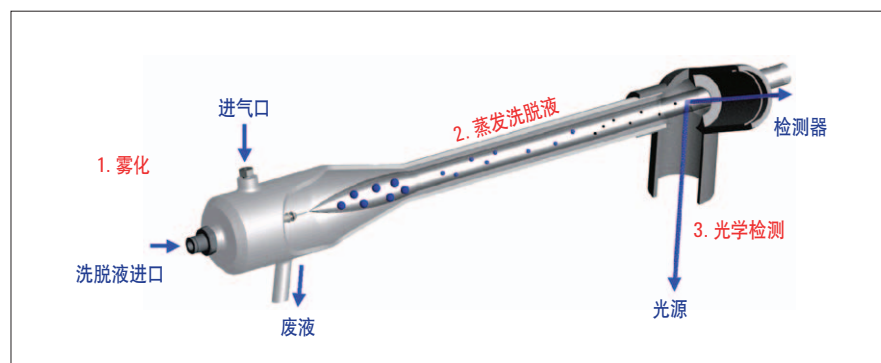


图 1  
ELSD 工作原理图

## Agilent 1290 Infinity ELSD – 设计更完善

- **雾化**：使用低气体流速实现高效雾化是安捷伦 ELSD 的特点之一。独立的雾化器温度和气流控制提供了极佳的稳定性和重现性。通过排液端口排出雾化不佳的洗脱液，最大限度地降低了基线噪音
- **蒸发**：雾流通过一个独立温控的蒸发管，此时溶剂在高温下被去除，留下挥发性较低的颗粒。1290 Infinity ELSD 配有专利气流控制技术，可以使用短蒸发管。因此吹扫体积极低，使峰扩散程度降至最低，同时使分离度最大化（这对使用短色谱柱的分析工作尤其重要）
- **光学检测**：当溶质颗粒通过光检测池时即进行检测。1290 Infinity ELSD 配有蓝色激光光源、高增益光电倍增管，以及可以增强信号并大大减小基线噪音的数字信号处理技术，从而提高了检测灵敏度。检测限可以提高一个数量级

## 实验条件

### 溶剂

乙腈为 LC 级，购自 Sigma Aldrich 公司（圣路易斯，密苏里州，美国）。新鲜的超纯水来自配有 LC-Pak Polisher 的 Milli-Q Integral 系统。

### 样品

缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸购自 Sigma Aldrich 公司（圣路易斯，密苏里州，美国），纯度 >98%。咖啡因来自安捷伦科技公司（圣克拉拉，美国），纯度 >99%（部件号 8500-6762）。

### 软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation (A.01.04 版)

部件号	说明
G4261B	Agilent 1290 Infinity 蒸发光散射检测器（带制冷功能）
G4212A	Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器（10 mm 光程流通池）
G1316C	Agilent 1290 Infinity 柱温箱
G4226A	Agilent 1290 Infinity 自动进样器
G4220A	Agilent 1290 Infinity 二元泵

表 1  
系统模块

## 1290 Infinity ELSD 性能

### 基线 ASTM 噪音和漂移

使用限流毛细管（部件号 5022-2159）并以水作为流动相测定 ASTM 噪音和漂移。在 40 Hz 的数据输出速率和响应时间（平滑=SMTH）为 20 (2 s) 的条件下采集噪音电平。平滑指可以平均输出数据，以获得更平滑的响应。

对 30 分钟测量过程进行采集以确定 1290 Infinity ELSD 的噪音和漂移。7 次重复测定的 ASTM 噪音平均值为 0.05 mV，漂移为 0.04 mV/h。图 2 中所示为 30 min 过程中噪音和漂移的示例色谱图。通过排液端口排出雾化不佳的洗脱液，最大限度地降低了基线噪音，从而使基线更加平稳。

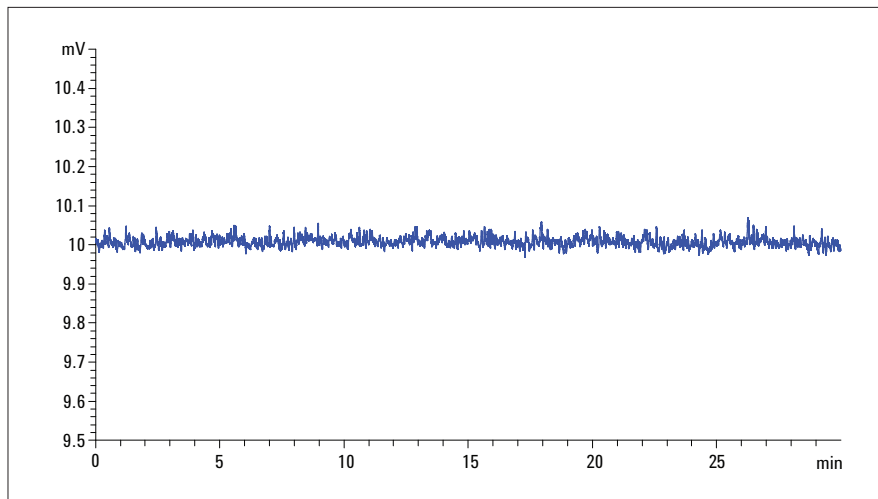


图 2  
采用 100% 水获得的 30 min 色谱图 (n=7)，其中 ASTM 噪音为 0.05 mV，漂移为 0.04 mV/h

#### 色谱条件

色谱柱:	可承受 110 bar 反压的限流毛细管 (部件号 5022-2159)
流动相:	A = 水
流速:	1 mL/min
停止时间:	30 min
ELSD:	蒸发 40 °C/雾化 40 °C/气流 1.2 SLM/平滑 20 (2 s)/PMT 增益 1/40 Hz

## 线性和动态范围

采用包含等摩尔缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu) 和苯丙氨酸 (Phe) 的测试混合物进行线性测定。这些氨基酸是非挥发性的，非常适合由 ELSD 进行检测，也适合由安装在 ELSD 前面的 DAD 进行检测。混合液的浓度范围为 0.05 mM – 20 mM，共 10 个浓度水平。采用反相 UHPLC 梯度洗脱，这些氨基酸在大约 3 min 内实现分离。

图 3 表明 1290 Infinity ELSD 在 0.05 mM – 20 mM 的浓度范围内具有良好的线性。所有化合物的相关系数均大于 0.993。结果表明，所有化合物在 5 – 3300 ng 柱上量范围内，线性关系良好。缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的相关系数范围为 0.9933 – 0.9972 (表 2)。在当前色谱条件下，氨基酸柱上量的最低响应值分别为缬氨酸 5.85 ng、亮氨酸 6.55 ng 和苯丙氨酸 8.25 ng。最高响应值分别为缬氨酸 2340 ng、亮氨酸 2620 ng 和苯丙氨酸 3300 ng。结果表明总体动态范围高达三个数量级，而此时 PMT 的增益设置仅为 1。

在测量线性时，采用了相同的等摩尔浓度化合物混合液，而氨基酸间的响应不同，这说明 1290 Infinity ELSD 可以针对每种化合物提供通用响应。

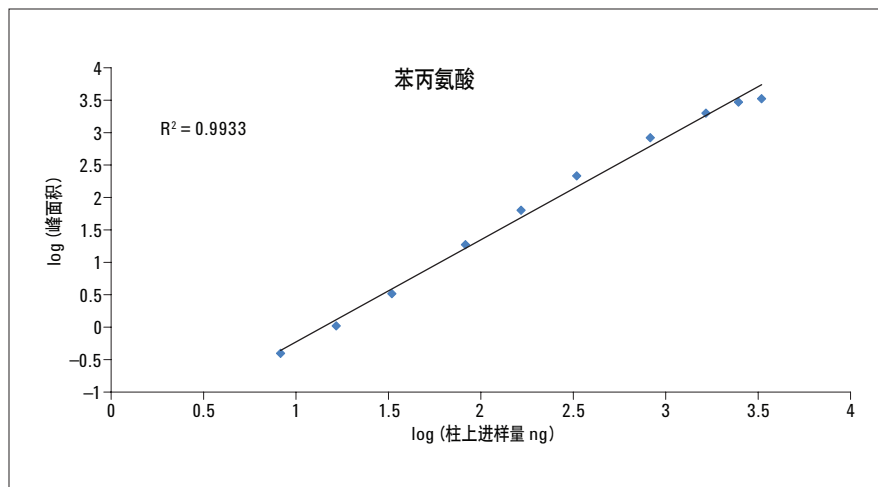


图 3  
对于所有三种氨基酸，Agilent 1290 Infinity ELSD 的动态范围均涵盖了 0.05 - 20 mM 的浓度范围

### 色谱条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RR HD, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm 粒径 (部件号 959757-902)
流动相:	A: 2% 乙腈水溶液 B: 乙腈
流速:	0.6 mL/min
梯度程序:	0 min 5 % B 1.5 – 1.8 min 30% B 1.8 – 2.8 min 100% B
后运行时间:	3 min
柱温:	25 °C
进样体积:	1 μL
DAD:	210/4 nm, 参比关闭
ELSD:	蒸发 50 °C/雾化 50 °C/气流 1.0 SLM/平滑 1 (0.1 s)/PMT 增益 1/40 Hz

化合物	R <sup>2</sup>
缬氨酸	0.9955
亮氨酸	0.9972
苯丙氨酸	0.9933

表 2  
氨基酸的相关系数

## 缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的检测灵敏度

使用浓度为 0.1 mM 的 Val、Leu 和 Phe，通过检测限 (LOD; S/N=3) 和定量限 (LOQ; S/N=10) 确定 1290 Infinity ELSD 的检测灵敏度。采用 7 次重复测定的平均值来计算 LOD 和 LOQ。

图 3 中所示为色谱条件。

表 3 列出了 Val、Leu 和 Phe 的 LOD、LOQ 和信噪比 (S/N) 值。图 4 中所示为这三种氨基酸在 100  $\mu$ M 等摩尔浓度及不同增益设置条件下的色谱图。显示能以高灵敏度检测所有化合物。在样品浓度较低的情况下，可调整检测器增益 (PMT) 设置以增强信号。增益设置为检测器输出信号放大的倍数。在设置增益后，信号和噪音均会根据设置值放大，所以 S/N 值基本不受影响。参数屏幕上显示的原始信号输出反映了这种信号放大处理中的强度增减。增益可在 1-10 的范围内调整。表 4 列出了三种不同的增益设置，以及其对低浓度样品 (100  $\mu$ M) LOD (S/N=3) 的影响。

尤其对于低浓度样品，假如需要手动积分，提高增益设置很有用。不同增益设置条件下的 LOD 变化更多是受数据采集影响而非 ELSD 影响。

一般来讲，雾滴的大小决定了 ELSD 的检测灵敏度。雾滴越大，在光检测阶段的最终颗粒也就越大，散射作用就会越强。为获得理想的雾滴大小，用户可以对雾化气和温度加以控制。

化合物	LOD (ng/ $\mu$ L) (S/N=3)	LOQ (ng/ $\mu$ L) (S/N=10)
缬氨酸	4.22	14.07
亮氨酸	8.09	26.97
苯丙氨酸	5.02	16.72

表 3  
缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的 LOD、LOQ 和 S/N 值 (100  $\mu$ M; n=7), 增益设置为 1

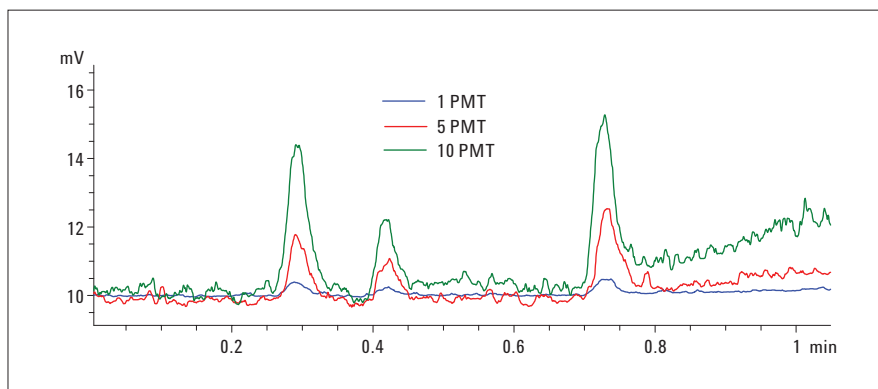


图 4  
0.1 mM 的缬氨酸 (RT 0.290)、亮氨酸 (RT 0.418) 和苯丙氨酸 (RT 0.731) 在增益设置分别为 1 (蓝色)、5 (红色) 和 10 (绿色) 时的色谱图。更高的增益设置仅使化合物变得更易于观察

化合物	LOD (ng/ $\mu$ L)		
	增益 1	增益 5	增益 10
缬氨酸	4.22	3.74	2.75
亮氨酸	8.09	7.23	5.78
苯丙氨酸	5.02	4.77	3.47

表 4  
更高的增益设置几乎不会使 LOD 发生变化

亮氨酸	1 PMT	5 PMT	10 PMT
峰面积	0.52	2.6	4.76
高度	0.23	1.23	2.24
S/N	6.04	5.43	6.79

表 5  
不同的 PMT 增益设置只是改变了色谱图中色谱峰的外观。图 5 中所示为亮氨酸的示例

## DAD 与 ELSD 的比较 – 检测无 UV 发色团的化合物

ELSD 尤其适合分析 DAD 无法检测的无发色团化合物。即使在中等浓度 (1 mM) 条件下, 与 ELSD 相比, DAD 也几乎检测不到缬氨酸和亮氨酸 (图 5)。为了测量 DAD 信号和 ELSD 信号间灵敏度的差异, 我们将 DAD 和 ELSD 在线串联到一起。

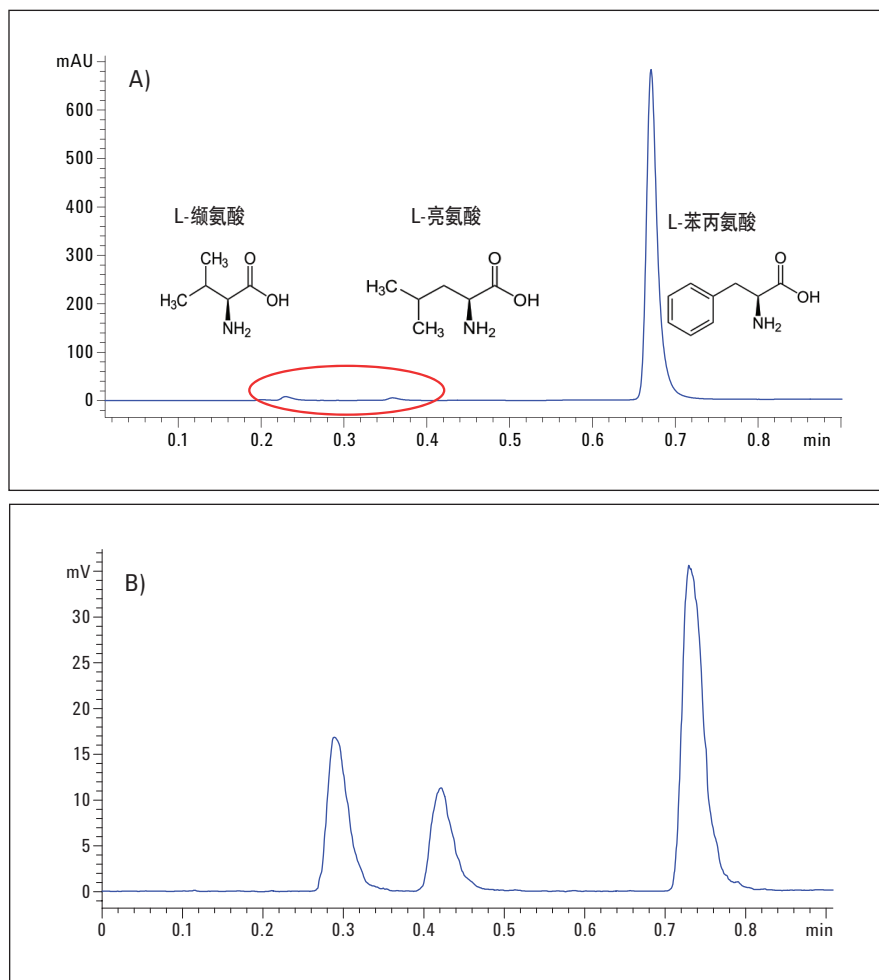


图 5

A) 缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的紫外色谱图。采用紫外检测时, 前两种化合物几乎无法检出。B) 相同化合物的 ELSD 色谱图

## 咖啡因的检测灵敏度

对咖啡因这种半挥发性化合物的检测灵敏度良好。咖啡因的柱上进样量为 40 ng。

如图 6 中所示，咖啡因柱上进样量为 40 ng 时的信噪比为 29.2，说明 1290 Infinity ELSD 具有良好的检测灵敏度。咖啡因的 LOD 为柱上量 4.1 ng。

总之，对于氨基酸和咖啡因这两类不同的化学物质，它们都具有极高的检测灵敏度。所有化合物的 LOD 均在 10 ng 柱上量以下，所有测试的化合物均具有很高的信噪比。带制冷功能的 1290 Infinity ELSD 还是检测半挥发性化合物的理想选择。

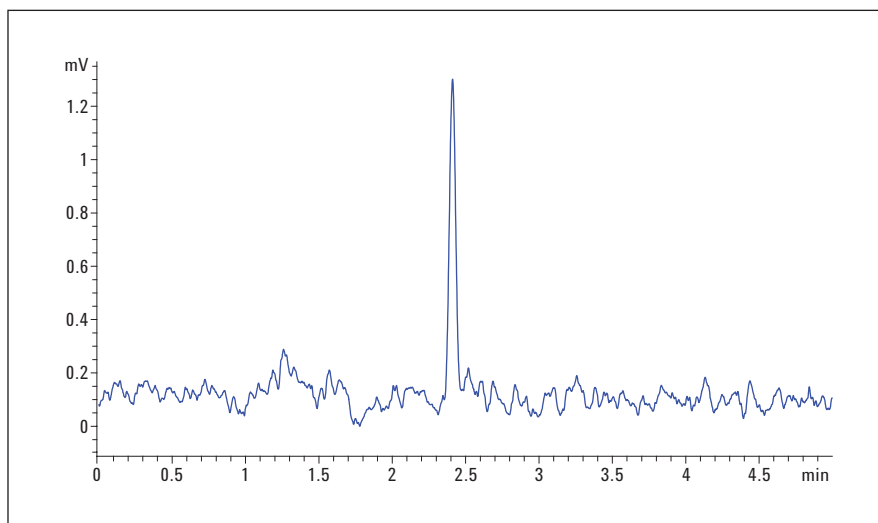


图 6  
咖啡因的柱上进样量为 40 ng 时的色谱图，信噪比为 29.2

### 色谱条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 μm 粒径 (部件号 993967-902)
流动相:	A: 80/20 (水/乙腈)
流速:	1 mL/min
梯度程序:	等度 5 min
柱温:	25 °C
进样体积:	10 μL 浓度为 21 μM 的咖啡因标准溶液 (部件号 8500-6762)
DAD:	273/4 nm, 参比关闭
ELSD:	蒸发 40 °C/雾化 40 °C/气流 1.2 SLM/平滑 20 (2 s)/PMT 增益 5/40 Hz



## 咖啡因的峰面积和保留时间精度

在咖啡因柱上进样量为 250 ng 时检测其保留时间和峰面积精度。取 7 次重复测定的平均值，其保留时间的相对标准偏差 (RSD) 为 0.22%，峰面积精度为 1.10% RSD。图 7 显示了峰面积和保留时间的卓越精度。

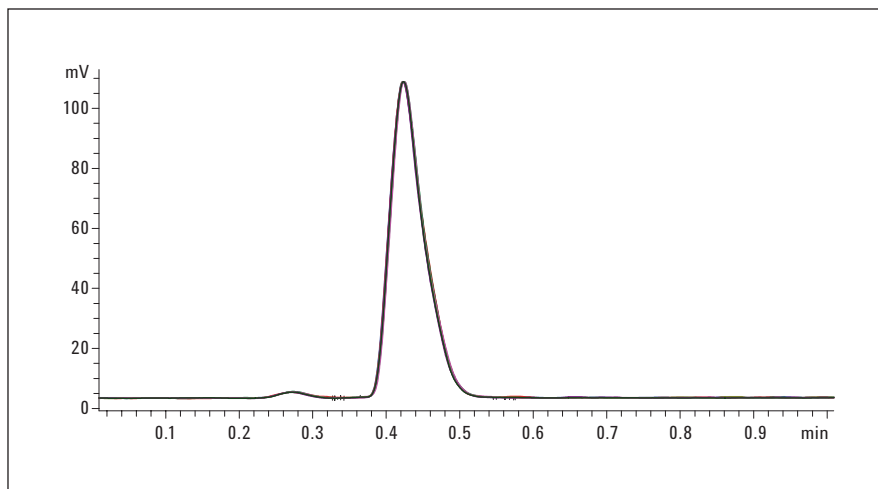


图 7

10  $\mu$ L 咖啡因标准溶液 7 次重复测定的重叠色谱图

### 色谱条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m 粒径 (部件号 993967-902)
流动相:	A: 80/20 (水/乙腈)
流速:	1 mL/min
梯度程序:	等度 5 min
柱温:	25 $^{\circ}$ C
进样体积:	10 $\mu$ L 浓度为 25 $\mu$ M 的咖啡因标准溶液 (部件号 8500-6762)
DAD:	273/4 nm, 参比关闭
ELSD:	蒸发 40 $^{\circ}$ C/雾化 40 $^{\circ}$ C/气流 1.2 SLM/平滑 20 (2 s)/PMT 增益 5/40 Hz

## 结论

本技术概述论证了与 Agilent 1290 Infinity LC 系统联用的 1290 Infinity ELSD 具有极高的检测灵敏度。可以获得高质量的数据, ASTM 噪音为 0.05 mV, 漂移为 0.04 mV/h。可以得到优异的 S/N 值, 例如, 咖啡因柱上进样量为 40 ng 时, 信噪比为 29.2。所有测试化合物的 LOD 均低于 10 ng 柱上量。采用 1290 Infinity ELSD 时, 大多数测试化合物的典型 LOD 为 1 - 25 ng 柱上量。1290 Infinity ELSD 使用蓝色 (405 nm) 激光代替了 LED, 使小颗粒的散射强度最大化, 并且采用数字信号处理技术使基线噪音降至最低, 从而获得了极高的检测灵敏度。

对于所分析的氨基酸, 动态范围约为 3 个数量级, 并且一般来说, 对于大多数化合物动态范围都在 2-3 个数量级之间。

可以获得理想的保留时间和峰面积精度 RSD 值。保留时间精度通常为 0.22% RSD, 峰面积精度通常为 1.10% RSD。

1290 Infinity ELSD 采用激光技术, 具有更高的检测灵敏度、分析效能和重现性。在制药、药物筛选、食品质量检验和化学分析应用中, 1290 Infinity ELSD 是检测半挥发性和不挥发性溶质的理想选择。此外, 低扩散和高数据输出速率 (80 Hz) 使它非常适合快速液相色谱应用, 尤其是采用短色谱柱的应用。



[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2013  
2013年4月1日, 中国出版  
5991-2097CHCN



**Agilent Technologies**