

# 优化 Agilent 1290 Infinity 蒸发光散射检测器的性能

## 技术概述

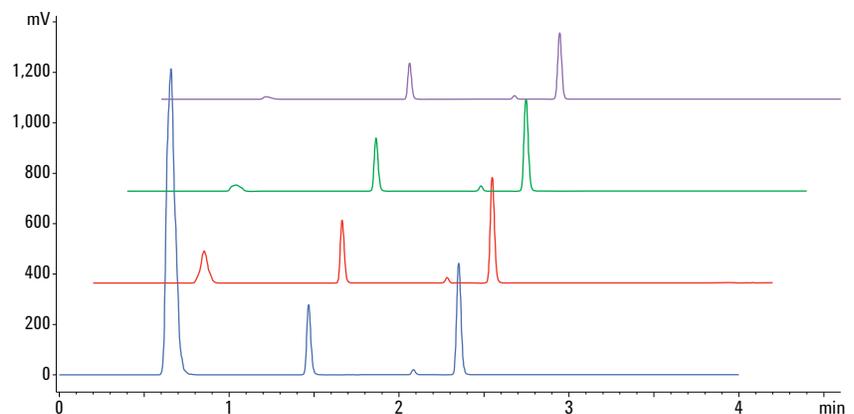
### 作者

Bettina Schuhn  
安捷伦科技有限公司  
德国瓦尔德布隆

### 摘要

本技术概述论述了实现 Agilent 1290 Infinity 蒸发光散射检测器 (ELSD) 最高性能的具体方法。展示并说明了不同参数设置对检测灵敏度和分离度的影响。

Agilent 1290 Infinity ELSD 最主要的优势就是能够通过调整蒸发温度和气体流速等设置去除溶剂, 例如, 在 30 °C 的低蒸发温度下除去二甲亚砜 (DMSO)。此外, 本文还总结了蒸发温度和气体流速对检测限 (LOD) 的影响。采用本文提供的建议, 我们可以很容易地获得具有高灵敏度和高分离度的最佳 ELSD 结果, 而无需再进行繁冗的方法修改。



Agilent Technologies

## 前言

与 UV 和 MS 等检测器相比，1290 Infinity ELSD 的优势在于可以分析无发色团和难于离子化的化合物。1290 Infinity ELSD 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，提高了信号强度并降低了噪音。此外，该 ELSD 还适用于高流速和快速梯度洗脱分离，从而可以检测快速流出的半挥发性化合物。

本技术概述列出了一些提示和技巧，展示了通过调整 1290 Infinity ELSD 的不同参数设置以实现其最佳性能的方法。其中一个重要的参数设置就是蒸发气体流速。对于许多分析应用，例如，在组合化学或药物化学中，必须从色谱图中去除样品溶剂 DMSO 的峰。只有 1290 Infinity ELSD 具有去除 DMSO 的能力，有如下两种方式：

- 可以采用高蒸发温度将 DMSO 从色谱图中去除，但会降低某些化合物的检测灵敏度
- 1290 Infinity ELSD 的设计可以使它在低蒸发温度下，通过提高蒸发气体流速去除 DMSO

蒸发温度对检测灵敏度也有巨大影响，尤其是在 LOD 附近进行测定时。我们采用针对三种氨基酸的分析实例对此进行论证。

除了蒸发温度以外，蒸发气体流速对检测灵敏度影响最大。1290 Infinity ELSD 的独特设计在蒸发区使用了专利的气流技术，以辅助低温下的蒸发作用。附加的氮气流，也称为蒸发气，使较低挥发性的溶剂也很容易蒸发。为有效去除流动相，用户可以对蒸发气体流速和蒸发温度进行调节。

平滑因子，又称为响应时间，是另一个重要的参数。它会影响到色谱峰的宽度、高度和分离度，以及噪音的大小。本文说明了如何根据具体应用选择平滑因子。

表 1. 系统模块

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

## 实验部分

### 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

氨基酸：缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸，以及乙腈、硫脲、对乙酰氨基酚、非那西丁和二甲基砒霜自 Sigma Aldrich 公司（圣路易斯，密苏里州，美国），纯度 >98 %。

### 软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation  
(A.01.04 版)

## 结果与讨论

### 在 30 °C 蒸发温度下去除 DMSO

绝大多数组合化学和药物化学的候选药物都保存在高溶解力和低毒的 DMSO 中以实现稳定储存。DMSO 在色谱图的开始处会形成一个巨大的溶剂峰，较早流出的、被湮没在 DMSO 峰下面的化合物就无法被 UVD 检测到，尤其是在低波长处。

1290 Infinity ELSD 采取了两种措施将 DMSO 峰从色谱图中去除。第一种选择是提高蒸发温度。但是对于某些化合物，较高的温度会降低检测灵敏度。

第二种选择是在低温下提高蒸发气体流速来去除 DMSO。在本技术概述中，DMSO 里溶解了四种化合物，其中一种早洗脱出的化合物完全与 DMSO 共流出。

### 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB C8  
4.6 × 50 mm, 5 μm  
(部件号 846975-906)

流动相: A: 水  
B: 乙腈

流速: 1 mL/min

等度: 0 min 5% B  
4 min 100% B

色谱柱  
柱温: 30 °C

进样体积: 5 μL

ELSD: 蒸发温度 25–38 °C  
雾化温度 25 °C  
气体流速 1.6–2.5 SLM  
平滑因子 10 (1 s)  
PMT 增益 1/40 Hz

样品: 硫脲、对乙酰氨基酚、乙酰苯胺  
和非那西丁的等摩尔浓度混合液  
(2.3 mM)

图 1 是 DMSO 空白进样的色谱图。如图所示，1290 Infinity ELSD 采用两种方式去除 DMSO。可以在 38 °C 的蒸发温度去除，或者在 30 °C 的低温下采用 2.5 SLM (标准升每分钟) 的气体流速去除。

在第二个实验中，进样硫脲、对乙酰氨基酚、乙酰苯胺和非那西丁的 DMSO 等摩尔浓度混合液 (2.3 mM)。如图 2 中所示，硫脲

(峰 2) 与 DMSO (峰 1, 保留时间 <RT> 0.6–0.75 min) 有相同的保留时间。为了高灵敏度地检测硫脲，必须从色谱图中完全除去 DMSO 峰。

如图 2 中所示，除去 DMSO 峰需要的最低蒸发温度是 38 °C，但是，乙酰苯胺 (峰 4) 的峰高随着蒸发温度的升高而降低。

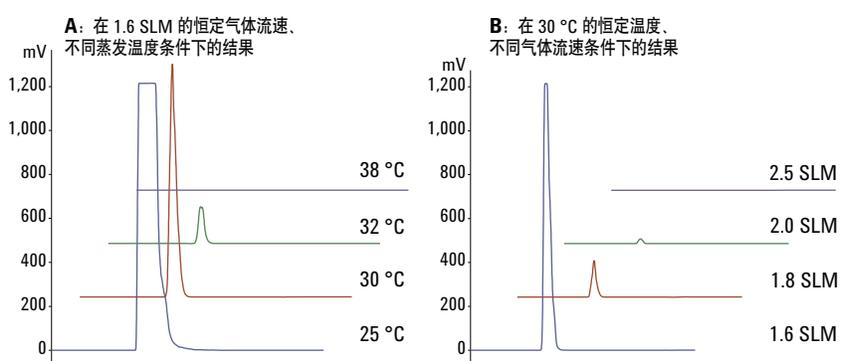


图 1. 采用 A) 38 °C 的蒸发温度, B) 30 °C 的蒸发温度和 2.5 SLM 的气体流速去除纯 DMSO

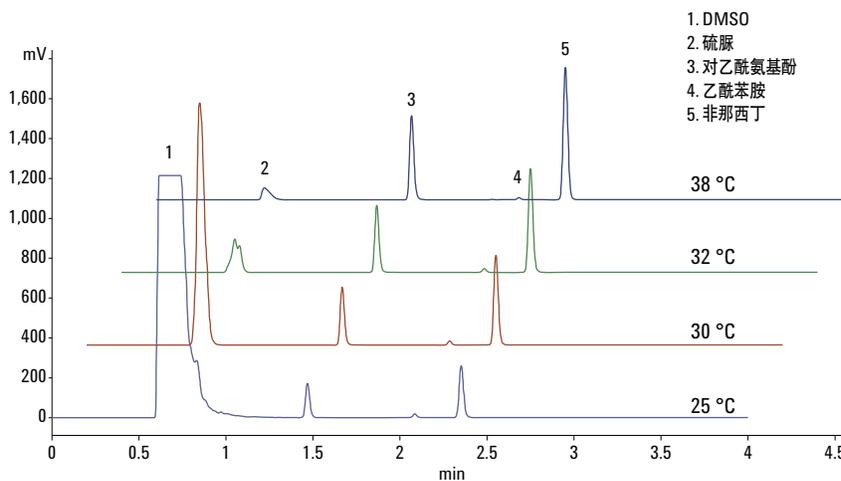


图 2. 溶解在 DMSO 中不同化合物的色谱图

在另一个实验中 (图 3), 无需改变蒸发温度即可除去 DMSO。在 30 °C 的蒸发温度下, 即可通过将蒸发气体流速从 1.6 提高到 2.5 SLM 来去除 DMSO (雾化温度 25 °C)。

无需提高蒸发温度, 2.5 SLM 的中等气体流速即可完全除去 DMSO。从而检测到峰 2 (硫脲), 并且由于蒸发温度较低, 可以在一次运行中分析热敏感化合物乙酰苯胺 (峰 4)。

与图 2 相比, 图 3 显示如乙酰苯胺 (峰 4) 等半挥发性化合物的响应强度下降程度较轻。

图 4 直接比较了乙酰苯胺在 38 °C 的蒸发温度 (蓝色峰) 和 30 °C 时 2.5 SLM 蒸发气体流速下 (红色峰) 的情况。先前的色谱图表明在这些设置下已去除了 DMSO。表 2 列出了乙酰苯胺的峰面积, 以展示不同蒸发温度和气体流速的影响。

如表 2 中所示, 在一定范围内的蒸发温度和气体流速条件下, 乙酰苯胺的峰面积是稳定的。但在 38 °C 的蒸发温度下, 峰面积下降了超过 50%。如果恒定蒸发温度 30 °C, 提高气体流速到 2.5 SLM, 其峰面积的损失小于 25%。

**提示:** 1290 ELSD 能够完全去除 DMSO, 从而检测到较早流出的化合物。系统可以通过提高蒸发温度, 或者提高蒸发气体流速来去除 DMSO。

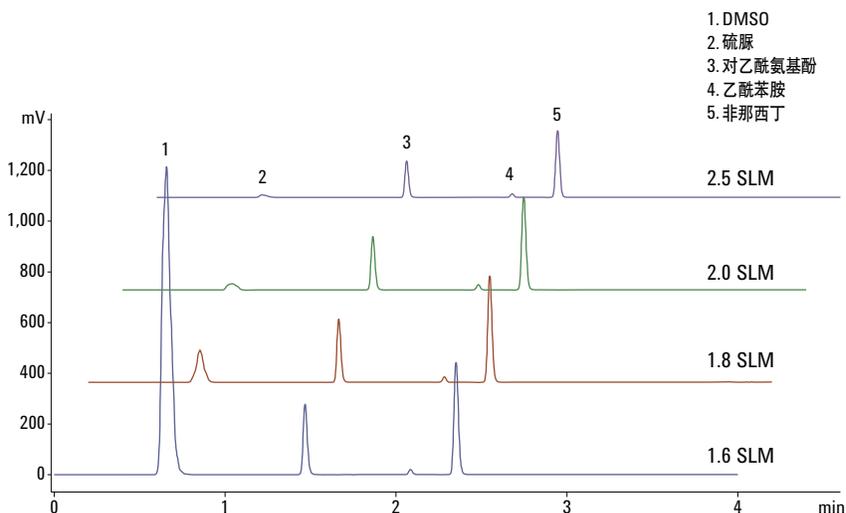


图 3. 在 30 °C 的恒定蒸发温度下, 通过提高蒸发气体流速来去除 DMSO

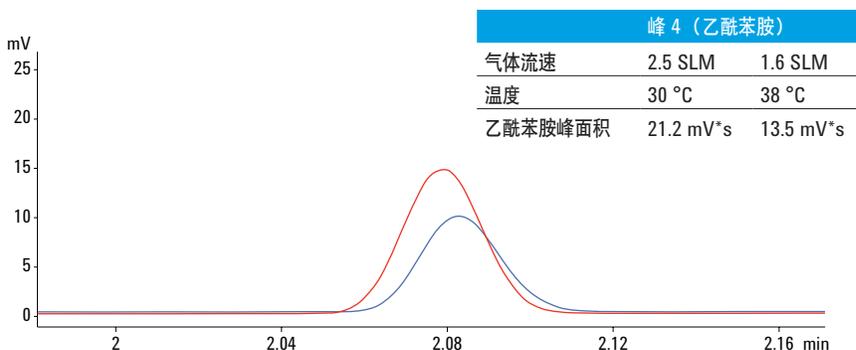


图 4. 在 38 °C 的蒸发温度 (蓝色) 和 30 °C、2.5 SLM 的流速条件下 (红色), 乙酰苯胺 (峰 4) 的重叠色谱图

表 2. 不同蒸发器设置及其对乙酰苯胺峰面积的影响

不同蒸发温度下乙酰苯胺的峰面积		不同蒸发气体流速下乙酰苯胺的峰面积	
25 °C	29.0 mV*s	1.6 SLM	29.9 mV*s
30 °C	29.7 mV*s	1.8 SLM	30.6 mV*s
32 °C	27.8 mV*s	2.0 SLM	28.8 mV*s
38 °C	13.5 mV*s	2.5 SLM	21.2 mV*s

← DMSO 去除

去除 DMSO 后使通常与 DMSO 峰共流出化合物的检测灵敏度最大化。在 30 °C 条件下, 1.8 SLM 的气体流速一般已足够去除或显著降低 DMSO 峰的强度。如果 1.8 SLM 的流速尚显不足, 可以提高气体流速直至 DMSO 完全去除。<sup>2,3</sup>

### 蒸发温度对 LOD 的影响

蒸发温度对不同化合物的检测灵敏度有巨大影响。为了更详细地说明温度效应, 我们在 LOD 浓度附近测定了三种氨基酸。

### 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm (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

色谱柱: 25 °C

柱温: 25 °C

进样体积: 1 μL

DAD: 210/4 nm, 参比关闭

ELSD: 蒸发温度 40–70 °C  
雾化温度 °C  
气体流速 1.0 SLM  
平滑因子 1 (0.1 s)  
PMT 增益 1/40 Hz

样品: 缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸 (0.1 mM)

等摩尔浓度的混合液: 分别在 40 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 的蒸发温度下测定缬氨酸 (RT 0.29 min)、亮氨酸 (RT 0.42 min) 和苯丙氨酸 (RT 0.73 min)。

图 5 中所示为不同蒸发温度下获得的重叠色谱图。

图 5 和表 3 表明蒸发温度对检测灵敏度有显著影响。如果蒸发温度过低, 如 40 °C, 蒸发管就不能去除所有溶剂, 从而导致检测灵敏度下降。对于这些氨基酸, 最佳的蒸发温度是 50 °C。如果采用更高的温度, 如 60 °C 和 70 °C, 则检测灵敏度会下降。如表 3 中所示, 如果温度设置不当, 则信号强度和信噪比 (S/N) 都会下降。

提示: 通常情况下, 对于非挥发性化合物, 可以将蒸发温度设置为约 80 °C – 90 °C。对于半挥发性化合物和低分子量化合物, 将蒸发温度设置为约 20 °C – 30 °C。为了优化 ELSD 方法, 可以选择中等蒸发温度并进行调节, 观察是否对峰强度有显著影响。<sup>2,3</sup>

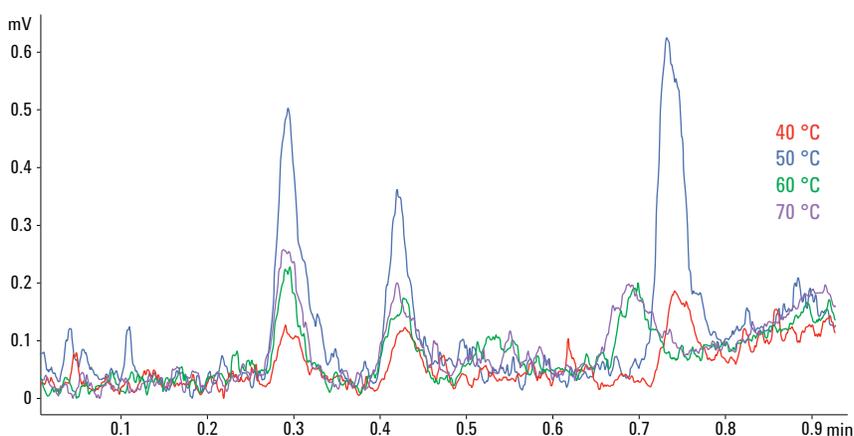


图 5. 不同蒸发温度下氨基酸混合液 (0.1 mM) 的重叠色谱图

表 3. 不同温度下各氨基酸的信号、噪音和信噪比

40 °C	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	1.83	0.06	3.14
	亮氨酸	1.83	0.06	3.24
	苯丙氨酸	2.50	0.06	4.45
50 °C	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	9.25	0.04	15.14
	亮氨酸	4.75	0.04	8.52
	苯丙氨酸	11.01	0.04	17.91
60 °C	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	4.75	0.04	8.77
	亮氨酸	4.01	0.04	7.35
	苯丙氨酸	3.25	0.04	6.20
70 °C	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	6.01	0.04	10.69
	亮氨酸	4.50	0.04	7.68
	苯丙氨酸	3.75	0.04	6.57

### 蒸发气体流速对 LOD 的影响

除了蒸发温度以外，可影响检测灵敏度的另一个重要参数是蒸发气体流速。若要提高检测灵敏度，除了调节温度以外还需要优化气体流速。在本实验中，蒸发温度恒定为 50 °C，气体流速分别为 1.0、1.3 和 1.6 SLM，以展现它对检测灵敏度的巨大影响。

图 6 中所示为浓度为 0.1 mM 的缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸重叠的三张色谱图。图 6 和表 4 说明蒸发气体流速从 1.6 SLM 降到 1.0 SLM 可以使信号强度加倍。如上述实验所示，50 °C 的中等蒸发温度和 1.0 SLM 的低蒸发气体流速对于这些化合物是最佳选择。

1290 Infinity ELSD 蒸发气体流速的调节主要依赖于流动相，而其蒸发温度设置要依据目标化合物的性质。这非常重要，也正是 1290 Infinity ELSD 有别于其它 ELSD 之处。用户应该了解蒸发气体流速和温度参数要紧密配合。

**提示：**ELSD 蒸发过程控制取决于蒸发气体流速。根据流动相性质设置气体流速。与有机溶剂相比，水性洗脱液需要更高的气体流速。通常，对于无论何种流动相组成，蒸发温度越高，气体流速设置就应该越低。与之相反，如果蒸发温度降低，作为补偿，气体流速应该提高。<sup>1</sup>

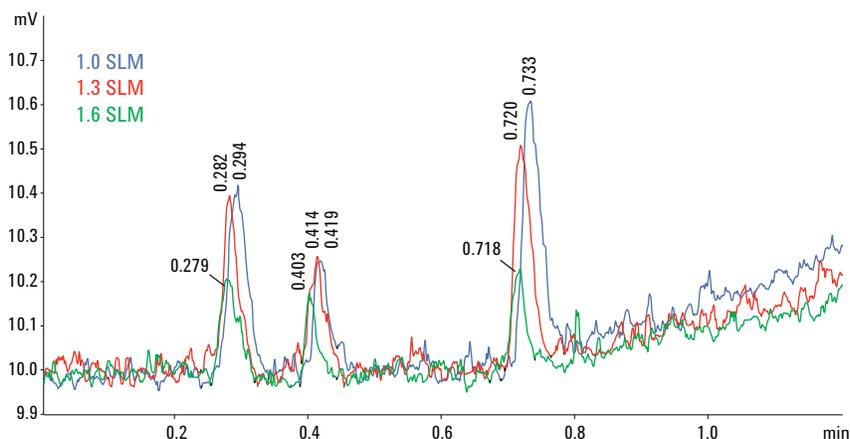


图 6. 三种氨基酸在不同气体流速下连续三次运行的重叠色谱图，展示了气体流速对检测灵敏度的影响

表 4. 不同蒸发气体流速对各氨基酸的信号、噪音和信噪比的影响

1.6 SLM	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	5.4	0.05	9.7
	亮氨酸	2.6	0.05	4.6
	苯丙氨酸	5.2	0.05	9.5
1.3 SLM	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	6.3	0.06	12.1
	亮氨酸	4.6	0.06	8.5
	苯丙氨酸	8.5	0.06	15.1
1.0 SLM	化合物	信号 (mV)	噪音 (mV)	S/N
	缬氨酸	9.25	0.04	15.14
	亮氨酸	4.75	0.04	8.52
	苯丙氨酸	11.01	0.04	17.91

## 平滑因子效应

平滑因子的功能是对输出数据进行数学平均，从而获得更平滑的响应并减少噪音。平滑因子应根据需要平均的数据点数目进行设置，可以将其视为数字时间常数。<sup>1</sup>

在本实验中，我们分析了 1 mM 等摩尔浓度的缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸混合液，采用 1 (0.1 s)、10 (1 s)、20 (2 s) 和 30 (3 s) 四种不同的平滑率，以及 40 Hz 的固定数据采集速率。

图 7 以及表 5 和 6 中所示为平滑因子对峰宽、分离度、峰高、峰面积和噪音的影响。在类似本实验的快速分析中，推荐使用小平滑因子，可以获得良好的峰形和准确的峰面积。缬氨酸和亮氨酸峰间的分离度在采用小平滑因子时更为理想。

使用较高平滑因子可以进一步降低噪音。

**提示：**对于大多数分析应用，通常会使用 10-30 (1-3 s) 的平滑因子。当然，如需得到最高的检测灵敏度，应降低平滑率以提升信号高度。对于峰宽很小 (< 3 s) 的快速分离，该建议非常有用，并且平滑因子对分离度也有影响。<sup>1</sup>对于需要最高检测灵敏度的分析应用，我们需要优化平滑因子，以实现最大的峰高和最小的噪音。

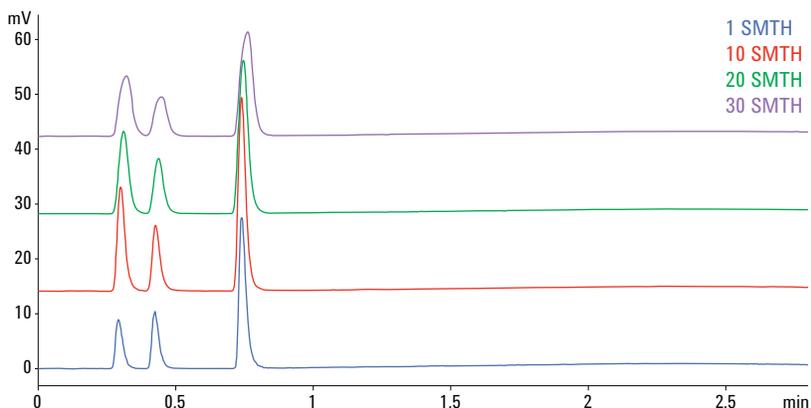


图 7. 四次运行的重叠色谱图，展示了不同平滑因子的影响

表 5. 平滑因子对缬氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸的峰宽和分离度的影响

峰宽 (5*sigma)				
平滑率	1	10	20	30
缬氨酸	0.067	0.073	0.086	0.098
亮氨酸	0.066	0.077	0.087	0.099
苯丙氨酸	0.070	0.071	0.085	0.098
分离度				
平滑率	1	10	20	30
缬氨酸/亮氨酸	2.72	2.29	1.91	1.44

表 6. 不同平滑因子条件下，三种氨基酸的峰高和峰面积结果比较

峰高 (mV)				
平滑率	1	10	20	30
缬氨酸	17.8	17.6	14.2	10.7
亮氨酸	11.1	11.3	10	6.9
苯丙氨酸	33.1	32.1	27.1	19.1
噪音	0.04	0.01	0.01	0.007
峰面积 (mV*s)				
平滑率	1	10	20	30
缬氨酸	33.5	35.8	36.5	34.1
亮氨酸	22.1	23.5	23.9	22.4
苯丙氨酸	61.7	63.1	65.7	61.2

## 结论

本技术概述旨在帮助您进行方法开发，以实现 Agilent 1290 Infinity ELSD 的最高性能。

借助 1290 Infinity ELSD 的独特设计，我们可以通过提高蒸发气体流速而非提高蒸发温度来去除 DMSO。由于高蒸发温度会导致某些化合物的检测灵敏度下降，可采用 30 °C 的蒸发温度和 2.5 SLM 的气体流速将 DMSO 完全去除。

一般来说，方法开发中首先要优化蒸发温度，因为它是获得最高检测灵敏度的最重要参数之一。其次，根据蒸发温度调节蒸发气体流速。通常，在高蒸发温度条件下仅需较低的气体流速即可实现最高的检测灵敏度。本技术概述通过对三种氨基酸的分析说明，在 50 °C 的蒸发温度和 1.0 SLM 的较低蒸发气体流速条件下，即可获得最高的检测灵敏度。

最后，我们必须选择合适的平滑因子。对于大多数分析应用，20 (2 s) 的平滑率即可满足要求。在快速分析应用中，需要获得更好的分离度或者更高的检测灵敏度时，应降低平滑因子。

## 参考文献

1. G. Cleaver, “Using the Agilent 1290 Infinity ELSD for High Throughput Screening of Samples Stored in DMSO” (使用 Agilent 1290 Infinity ELSD 对储存在 DMSO 中的样品进行高通量筛选), 安捷伦科技应用简报, 出版号 5991-2165EN, **2013**
2. Agilent 1200 Infinity 系列 ELSD 服务手册, 部件号 G4260 90001, **2012**
3. S. Ball, “使用带蒸发光散射检测技术的高效液相色谱法分析药物”, 安捷伦科技应用文集, 出版号 5990-9455CHCN, **2012**

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

本文中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2013  
中国印刷, 2013 年 6 月 1 日  
5991-2176CHCN



**Agilent Technologies**