

文献综述

蒸发光散射检测技术

魏 泱, 丁明玉

(清华大学化学系, 北京 100084)

摘要 对高效液相色谱中的蒸发光散射检测技术进行了综述。重点介绍了蒸发光散射检测器的仪器构造、工作原理、影响检测的因素、检测理论及其在类酯、表面活性剂和药物成分等物质检测方面的应用。

关键词 蒸发光散射检测器, 工作原理, 检测理论, 类酯, 表面活性剂, 药物

中图分类号 :O657 文献标识码 :A 文章编号 :1000-871X(2000)05-0398-04

1 概述

目前, 高效液相色谱(HPLC)日益普及, 所分析的样品范围也越来越广。检测器作为 HPLC 仪的重要组成部分, 其发展在某种意义上决定着 HPLC 技术的进步。灵敏度高、性能稳定的通用型检测器的缺乏, 在一定程度上制约了 HPLC 的应用^[1]。

紫外检测器(UVD)因其高灵敏度和稳定性, 在 HPLC 中应用最广泛。但它所能检测的物质必须具有吸收紫外光的生色团, 而相应的流动相在检测波长下则应当是无紫外吸收的。这一特性大大限制了其能检测的物质范围和一些良好溶剂的使用。示差折光检测器(RID)是一种通用的检测器, 它基于色谱柱流出物光折射率的变化来连续测定样品浓度。但它对工作环境要求很苛刻, 要求恒温、恒流速, 且无法采用梯度洗脱, 其检测灵敏度也不够高。

蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering de-

tector, ELSD)的出现, 在一定程度上弥补了 HPLC 传统检测器的不足, 特别是对无紫外或紫外末端吸收的大分子有机化合物的检测, 显示出极大的优越性。本文综述了 ELSD 的工作原理、检测过程中的理论研究及其在类酯、表面活性剂和药物成分等物质检测方面的应用。

2 仪器构造和工作原理

1966 年, Ford 等^[2]第一次介绍了 ELSD, 当时它的名字叫蒸发分析器(evaporative analyzer)。ELSD 在发展过程中还曾有过以下一些不同的名字: 散射测浊器(nephelometer)、质量检测器(mass detector)、光散射检测器(light scattering detector)^[3]。目前主要有 4 种商品化的 ELSD, 即 Sedex55/65, Eurosep, PL-ELS 和 Alltech 500。其中 Sedex55/65 和 Eurosep 的结构差不多, PL-ELS 和 Alltech 500 都是由 Varesx MK-III ELSD 发展而来, 其结构见图^[4]。

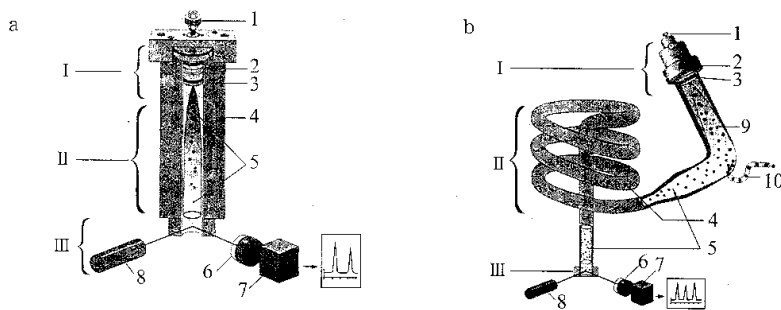


图 1 两种类型的 ELSD

Fig. 1 The two kinds of ELSD

a. 类型 A (type A); b. 类型 B (type B)。I. 雾化过程 (nebulization process); II. 蒸发过程 (evaporation process); III. 检测过程 (detection process)。1. 柱流出物 (column effluent); 2. 氮气 (nitrogen gas); 3. 雾化器 (nebulizer); 4. 加热漂移管 (heated drift tube); 5. 样品滴 (sample droplets); 6. 光检测器 (photodetector); 7. 放大器 (amplifier); 8. 激光源 (laser light source); 9. 雾化管 (nebulization chamber); 10. 废气排出 (waste outlet)。

收稿日期: 1999-11-16; 修回日期: 2000-03-21

作者简介: 魏 泱 (1975-) 男, 硕士研究生。

通讯联系人: 丁明玉, 电话: (010) 62781687, E-mail: dmingy@chem.tsinghua.edu.cn

总体上讲,4种商品化的ELSD都由三部分组成,即雾化器、加热漂移管和光散射池。雾化器与分析柱出口直接相连,柱洗脱液进入雾化器针管,在针的末端,洗脱液和充入的气体(通常为氮气)混合形成均匀的微小液滴,可通过调节气体和流动相的流速来调节雾化器产生的液滴的大小。漂移管的作用在于使气溶胶中的易挥发组分挥发,流动相中的不挥发成分经过漂移管进入光散射池。在光散射池中,样品颗粒散射光源发出的光经检测器检测产生电信号。ELSD采用的光源除Alltech 500使用670 nm激光二极管外,其余的使用卤素灯。检测器为光电倍增管或硅晶体光电二极管,其发展趋势是硅晶体光电二极管逐步取代光电倍增管。ELSD的构造决定了其检测过程分为3个阶段:Ⅰ.用惰性气体把色谱柱流出物雾化;Ⅱ.在漂移管中把流动相蒸发;Ⅲ.测定留下来的样品颗粒的光散射。4种ELSD的检测模式有两种,其区别在于:类型A的操作是让全部柱流出物都进入直的漂移管,让流动相在其中蒸发;类型B的操作是让柱流出物通过一个弯管,在此管中大的颗粒沉积下来流入废气管,其余的小颗粒进入螺旋状的蒸发管(见图1)。最近,Alltech公司提供了一种名为低温适配器(lower temperature adaptor)的可移动部件,可以很容易地将类型A的ELSD转化为类型B的ELSD。

Wilcox^[5]考察了这两种类型的ELSD,认为类型A的ELSD把所有的气溶胶都送到漂移管中,为了有利于蒸发,常常使用较高的操作温度,因此它适合于检测不挥发的样品,使用流速为1.0 mL/min(或更低流速)的挥发性流动相进行分析;类型B的ELSD将大颗粒气溶胶撞在弯曲管壁上除去,使气溶胶粒度分布变窄,在较低的温度下易于蒸发,适合于检测半挥发性样品,以流速为1.5 mL/min(或更高流速)的高含水流动相进行分析。

3 影响检测的因素及检测过程的理论研究

尽管ELSD有两种检测模式,但其检测原理是相同的。Charlesworth^[6]奠定了ELSD检测的理论基础。以后的研究者如:Stolyho等^[7,8], Mourey和Oppenheimer^[9,10], Righizza等^[11~13]都是在其研究基础上进一步发展该理论的。他们对于ELSD检测理论的研究由Mengerink等^[14]系统地总结如下:

(1)雾化 色谱柱流出物进入雾化器后,与充入的气体混合形成液滴,液滴的平均直径 D_0 可以用Nakiyama和Tanasawa提出的公式计算:

$$D_0 = 0.585 \times \frac{\sqrt{\sigma}}{\Delta\mu\sqrt{\rho}} + 212 \left(\frac{\eta}{\sqrt{\sigma\rho}} \right)^{0.45} \left(1000 \times \frac{F_L}{F_g} \right)^{1.5} \quad (1)$$

其中: D_0 为表面积平均直径(μm); σ 为洗脱液的表面张力(N/m); $\Delta\mu$ 为液体和气体之间的线速差(m/s); η 为柱流出物的粘度($\text{Pa}\cdot\text{s}$); ρ 为柱流出物的体积质量(kg/m^3); F_L/F_g 为柱流出物与气体的流速比。

最初的液滴直径分布为高斯分布或非对称的正态分布。

(2)液滴进入到加热的漂移管后至少有3个现象发生:易挥发的部分蒸发;一些颗粒落到漂移管的管壁上;一些颗粒凝结在一起。

Charlesworth提出了计算柱流出物蒸发时间的公

$$t_d = \frac{2\Delta H_v \rho D_0^2}{M\kappa_f \Delta T} \quad (2)$$

其中: t_d 为完全挥发的时间; $\Delta H_v/M$ 为摩尔挥发度(该值与达到133.322 Pa蒸气压力时的温度成正比); ΔT 为雾化气体与液体表面的温度差; κ_f 为液滴周围气体薄层的热导率。

当温度上升到一定程度,被分析物(a)亦会同流动相(m)一道挥发,因此最佳的温度为 $t_{dm} < t_d < t_{da}$ 。但为了减少颗粒在漂移管管壁上的沉淀, t_d 的选择最好是比 t_{da} 略高一点。 F_L/F_g 增大则会使颗粒间更易凝结。

(3)在可以忽略漂移管管壁上的沉淀或颗粒凝结在一起而改变平均直径的情况下,进入光散射池的气溶胶中的颗粒的直径 d 与被分析物在洗脱液中的浓度 c 成正比:

$$d \propto D_0 \left(\frac{c}{\rho_a} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (3)$$

其中: ρ_a 为被分析物的体积质量。

对于轴心式的雾化器,当被分析物的质量浓度为1 mg/L时,被分析物颗粒的大小处在米氏散射区域。根据米氏理论,散射光强度 I 可表示为:

$$I = kn d^2 \left(\frac{d}{\lambda} \right)^y \quad (4)$$

其中: k 为常数; n 是散射区域中颗粒的数目; λ 为检测波长;随着 d/λ 的增加, y 值从4.0(瑞利散射区域)减小到-2.2。当 λ 和 n 为常数,散射光强度以 d^q ($q < 6$)指数增加,因此从式(3)可看出,散射光强度以 c^q ($q > 2$)指数增加。

(4)校正曲线和检测限 当被分析物在洗脱液中的浓度较低时,被分析物浓度值的对数与响应值

的对数的校正曲线大致呈线性关系。检测限可以通过公式(5)算出:

$$m_{LOD} = \left(\frac{2xN}{H} \right)^{\frac{1}{x}} m_a \quad (5)$$

其中: m_{LOD} 为检测限(g); m_a 为注入的被分析物的质量(g); N/H 为噪声与峰高之比; x 为校正曲线的斜率。

Meeren等^[15]建立了一个计算机模拟的ELSD检测机理模型,其基本理论也是建立在米氏理论的基础上。他们把影响ELSD响应的因素分成4组:载气气压、雾化器的设计、流动相的组成和流速都将影响雾化过程,被分析物的浓度和体积质量等决定了进入光散射池的气溶胶中的颗粒的直径;被分析物的折射指数、光源发出的光的强度和波长、光电倍增管的位置等将影响到散射光强度;光电倍增管的灵敏度和入射光的强度决定了检测的效率,反映为实验者所观测到的峰面积。

冯埃生等^[16]和Trathnigg等^[17]考察了影响ELSD检测性能的基本因素,他们发现漂移管温度对基线水平和噪声的影响没有明显的规律性。温度过低则流动相得不到充分挥发,使基线水平较高;温度过高则可能带来更大的噪声。气体流速增大,使响应值减小,故最佳气体流速是在可以接受的噪声的基础上所产生的最大检测响应值的最低气体流速。流动相中可加入低于10 mmol/L的挥发盐来调节所需的酸度。他们在实验中也发现,被分析物的峰面积和峰高的自然对数分别与其浓度的自然对数有较好的线性关系。

还有不少实验者在用ELSD检测各种物质时,不同程度地研究了影响ELSD检测性能的基本因素,但其研究都不够系统,且未提出相应的理论。

4 ELSD在HPLC中的应用研究

ELSD在对类酯^[18~23]、表面活性剂^[24~27]、糖^[28,29]、氨基酸^[30,31]、季铵盐^[32,33]、高聚物^[34~36]、甾体化合物^[37~39]等物质的检测,以及药物分析方面^[40~45]发挥着重要的作用。

归纳起来,这些物质往往具有如下的特点:1)物质本身不含生色团或吸光系数不大,使用UVD检测时灵敏度很低;2)物质组分复杂,组分间极性差异较大,分离需要进行梯度洗脱,故RID几乎不适用,而短波长UVD在梯度洗脱时常会发生基线漂移。使用ELSD检测,可以克服这些困难。对于不含生色团的物质,ELSD可以不经衍生,直接进行检测,从而避

免了衍生带来的误差;ELSD在检测过程中,将流动相完全挥发,因此在梯度洗脱时,基线平稳。对不同物质,ELSD响应因子的变化比其他检测器(如紫外检测器)要小得多,在因缺乏标准品而无法作校正曲线的情况下,利用ELSD可以近似地提供不纯物的定量测定。HPLC/ELSD的色谱条件与LC/MS是一致的,在脱机情况下,使用HPLC/ELSD不仅可以为LC/MS摸索色谱条件,节省昂贵的LC/MS系统的操作成本,而且可以方便地用LC/MS来分析检测出的不纯物,进行结构鉴定。

5 结论

在以上的研究中,实验者都要对ELSD进行条件优化,即通过调节载气流速和漂移管的温度,使信噪比达到最大。ELSD的响应不依赖于物质的光学性质,能检测挥发性低于流动相的样品。其检测灵敏度高,检测限已可达ng级;检测过程中,基线稳定,能进行梯度洗脱。许多实验都表明,ELSD的响应值(Y)与被测物浓度(X)的关系曲线比较复杂。在较高浓度范围内,大致呈线性;而在低浓度范围内,则大致呈指数关系,即 $Y = aX^b$,其中的 b 值往往为 $1 \sim 2$ 与ELSD的检测理论相符合);另有少数实验表明,响应值与被测物浓度为二次函数关系,即 $Y = aX + bX^2$ 。

ELSD的检测理论表明,ELSD的响应与被分析物的理化性质有一定关系,但这种关系并不大。某些实验也证明了这一点。从这个意义上讲,ELSD不能被称为真正的质量检测器。由于被测物往往为同一类物质,其性质比较类似,因此许多实验者报道ELSD的响应不依赖于被分析物的理化性质,这一点与检测理论并不矛盾。

参考文献:

- [1] Brown P R. Anal Chem, 1990, 62(19): 995A-1 008A
- [2] Ford D L, Kennard W. J Oil Colour Chem Assoc, 1966, 49: 299-313
- [3] Barth H G, Barber W E, Lochmüller C H, et al. Anal Chem, 1986, 58(5): 221R-250R
- [4] Hus B H, Orton E, Tang S Y, et al. J Chromatogr B, 1999, 725: 103-112
- [5] Wilcox M J, Nordhaus R S. Am Lab News Edition, 1998, August: 30-34
- [6] Charlesworth J M. Anal Chem, 1978, 50(11): 1414-1420
- [7] Stolyhwo A, Colin H, Guiochon G. J Chromatogr, 1983, 265: 1-18
- [8] Stolyhwo A, Colin H, Martin M, et al. J Chromatogr, 1984, 288: 253-275

- [9] Mourey T H ,Oppenheimer L E. Anal Chem ,1984 ,56 : 2 427-2 434
- [10] Oppenheimer L E ,Mourey T H. J Chromatogr ,1985 ,323 : 297-304
- [11] Righezza M ,Guiochon G. J Liquid Chromatogr ,1988 ,11 (9&10) :1 967-2 004
- [12] Guiochon G ,Moysan A ,Holley C. J Liquid Chromatogr , 1988 ,11(12) 2 547-2 570
- [13] Righezza M ,Guiochon G. J Liquid Chromatogr ,1988 ,11 (13) 2 709-2 729
- [14] Mengerink Y ,Man H C J D ,Wal S V D. J Chromatogr , 1991 ,552 593-604
- [15] Meeren P V D ,Vanderdeelen J ,Baert L. Anal Chem , 1992 ,64 :1 056-1 062
- [16] FENG Ai-sheng ,ZOU Han-fa ,WANG Hai-lin , et al(冯埃生 ,邵汉法 ,汪海林 等). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志) ,1996 ,16(6) : 414-417
- [17] Trathnigg B ,Kollroser M. J Chromatogr A ,1997 ,768 223-238
- [18] Stolyhwo A ,Colin H ,Guiochon G. Anal Chem ,1985 ,57 : 342-1 354
- [19] Christie W W. J Chromatogr ,1988 ,436 510-513
- [20] Lutzke B S ,Braugler J M. J Lipid Research ,1990 ,31 : 2 127-2 130
- [21] Marcato B ,Cecchin G. J Chromatogr A ,1996 ,730 83-90
- [22] Gunnarsson T ,Karlsson A ,Hansson P ,et al. J Chromatogr B ,1998 ,705 243-249
- [23] Chang C D ,Harris D J. J Liq Chrom & Rel Technol , 1998 ,21(8) :1 119-1 136
- [24] Bear G R. J Chromatogr ,1988 ,459 91-107
- [25] Mengerink Y ,Man H C J D ,Wal S V D. J Chromatogr , 1991 ,552 593-604
- [26] Kibbey T C G ,Yavaraski T P ,Hayes K F. J Chromatogr A ,1996 ,752 :155-165
- [27] Miskiewicz W ,Szymanowski J. J Liq Chrom & Rel Technol ,1996 ,19(7) :1 013-1 032
- [28] Macrae R ,Dick J. J Chromatogr ,1981 ,210 :138-145
- [29] Clement A ,Yong D ,Brecht C. J Liq Chromatogr ,1992 ,15 (5) 805-817
- [30] Bongiovanni R. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志) ,1994 ,14(5) 62-63
- [31] Peterson J A ,Lorenz L J ,Risley D S ,et al. J Liq Chrom & Rel Technol ,1999 ,22(7) :1 009-1 025
- [32] Daniels C R. J Chromatographic Science ,1992 ,30 497-499
- [33] Toomey A B ,Dalrymple D M ,Jasperse J L ,et al. J Liq Chrom & Rel Technol ,1997 ,20(7) :1 037-1 047
- [34] Rissler K ,Fuchslueger U. J Liq Chromatogr ,1994 ,17 (13) 2 791-2 808
- [35] Rissler K ,Fuchslueger U ,Gerther H J. J Liq Chromatogr , 1994 ,17(14&15) 3 109-3 132
- [36] Rissler K. J Chromatogr A ,1997 ,786 85-98
- [37] Kermasha S ,Kubow S ,Goetghebeur M. J Chromatogr A , 1994 ,685 229-235
- [38] FENG Ai-sheng ,ZOU Han-fa ,ZHANG Bing ,et al(冯埃生 ,邵汉法 ,张冰 等). Chinese Journal of Chromatography(色谱) ,1997 ,15(2) :102-104
- [39] FENG Ai-sheng ,ZOU Han-fa ,LI Rui-jiang ,et al(冯埃生 ,邵汉法 ,李瑞江 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学) ,1997 ,3 258-262
- [40] Asmus P A ,Landis J B. J Chromatogr ,1984 ,316 461-472
- [41] Peterson J A ,Risley D S. J Liq Chromatogr ,1995 ,18(2) : 331-338
- [42] Park M K ,Park J H ,Han S B ,et al. J Chromatogr A , 1996 ,736 77-81
- [43] TIAN Nan-hui ,DONG Su-ying ,SHI Shu-guang , et al(田南卉 ,董素英 ,史曙光 等). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志) ,1997 ,17(2) : 129-130
- [44] TIAN Nan-hui ,WANG Jie ,LI Jin-zhong ,et al(田南卉 ,王劭 ,历进忠 等). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志) ,1997 ,17(4) 282-283
- [45] TANG Jun ,LU Jing(汤俊鲁 静). Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志) ,1999 ,19 (4) 241-243

The Evaporative Light-Scattering Detection Technology

WEI Yang , DING Ming-yu

(Department of Chemistry , Tsinghua University , Beijing 100084 ,China)

Abstract :The theory principles of operation and theoretical investigation of evaporative light-scattering detector(ELSD) are reviewed with 45 references. The applications of ELSD in HPLC on lipids ,surfactants ,pharmaceutical compounds and others are introduced.

Key words : evaporative light-scattering detector ; operation principle ; theoretic investigation ; lipid ; surfactant ; pharmaceutical compound