

蒸发光散射检测器的清洗方法

常建军, 袁凤琴*, 杨志刚, 王 佳, 李 照, 张利俊, 徐向峰, 宋晓东

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司中心实验室, 呼和浩特 011500)

摘 要: **目的** 建立一种蒸发光散射检测器的清洗方法。**方法** 在高温氮气流的作用下, 利用高浓度的盐酸溶液去除蒸发光散射检测器蒸发管内壁的奶垢; 依次用丙酮、乙腈、甲醇、水溶液清洗之后, 高温氮气流的作用下继续烘烤; 清洗结束后, 对蒸发光散射检测器进行面积归一化。**结果** 乳糖在 0~4 mg/mL 范围内, 浓度与峰面积采用幂函数方程绘制标准曲线, 相关系数大于 0.99, 检出限为 190 mg/100 g; 样品的加标平均回收率为 96.45%~103.16%, 相对标准偏差为 3.88%~5.18%; 对清洗前后的蒸发光散射检测器进行 10 次重复性测试, 相对标准偏差为 0.66%, 清洗后检测信号增大 2 倍, 仪器噪音减少 4 倍。**结论** 本方法适用于蒸发光散射检测器的彻底清洗, 可以减少更换蒸发管的次数。

关键词: 蒸发光散射检测器; 蒸发管; 清洗

Cleaning method of evaporative light scattering detector

CHANG Jian-Jun, YUAN Feng-Qin*, YANG Zhi-Gang, WANG Jia, LI Zhao, ZHANG LI-Jun,
XU Xiang-Feng, SONG Xiao-Dong

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To establish a cleaning method for evaporative light scattering detector. **Method** The high-concentration hydrochloric acid solution was used to remove the scale of the inner wall of the evaporation tube of the evaporative light scattering detector under the action of a high-temperature nitrogen stream. After washing with acetone, acetonitrile, methanol, and aqueous solution in sequence, the evaporation tube of the evaporative light scattering detector was continued to be baked under the action of high-temperature nitrogen gas. After the cleaning was completed, the area of the evaporative light scattering detector was normalized. **Result** When lactose was in the range of 0~4 mg/mL, the concentration curve and the peak area were plotted by the power function equation. The correlation coefficient was greater than 0.99, and the limit of detection was 190 mg/100 g. The average recoveries of the sample were 96.45%~103.16%, and the relative standard deviations were 3.88%~5.18%. The evaporative light scattering detector before and after cleaning was carried out for 10 times, the relative standard deviation was 0.66%, the detection signal was increased by 2 times after cleaning, and the instrument noise was reduced by 4 times. **Conclusion** The method is suitable for thorough cleaning of the evaporative light scattering detector and able to reduce the replacement time of the evaporation tube.

KEY WORDS: evaporative light scattering detector; evaporation tube; cleaning

基金项目: 2018 年国家重点研发计划重点专项(2018YFC1604202)

Fund: Supported by Key Special Projects of the National Key R&D Program in 2018 (2018YFC1604202)

*通讯作者: 袁凤琴, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。E-mail: yuanfengqin@mengniu.cn

*Corresponding author: YUAN Feng-Qin, Senior Engineer, Central Laboratory of Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Shengle Economic Park, Helingeer County, Hohhot 011500, China. E-mail: yuanfengqin@mengniu.cn

1 引言

蒸发光散射检测器 (evaporating light scattering detector, ELSD) 通常用于高效液相色谱系统, 分析所有挥发性低于流动相的化合物^[1]。ELSD 的应用范围包括碳水化合物、脂类、未衍生的脂肪酸和氨基酸、聚合物、表面活性剂、营养滋补品及组合分子库等^[2,3]。

蒸发光散射检测器是一种通用质量型检测器^[4-8], 其原理为通过通入高压的氮气或者是惰性气体(有时也用空气), 将流动相雾化, 形成微小液滴, 液滴通过蒸发管加热, 此时溶解在流动相中不易挥发的样品即形成颗粒物, 这些颗粒物在气体的推动下进入光散射池, 造成光束散射。散射光的强度和样品颗粒的数量成正比, 从而可测定样品组分含量^[9]。

蒸发光散射检测器的工作过程主要是分为雾化、蒸发、检测 3 个阶段, 其雾化器通常采用文丘里雾化器。文丘里雾化器有 2 种工作模式, 即分流模式和不分流模式, 在不分流模式中全部柱流出物都进入直的蒸发管进行蒸发, 而且为使流动相快速蒸发常常需要较高的操作温度, 所以不分流模式适合于检测不挥发的样品, 并且必须使用挥发性流动相进行分析; 在分流模式中, 柱流出物会通过一个弯管或者雾化室, 在此管中通过撞击使大的颗粒沉积下来流入废气管, 使产生的粒子尺寸分布变窄, 剩余的小颗粒进入螺旋状的蒸发管, 可以使用较低的蒸发温度, 该法适合于检测半挥发性样品, 可以使用高含水流动相进行分析^[10-12]; 其蒸发阶段是由雾化器形成的小液滴在载气的带动下进入蒸发管, 在设置的蒸发温度下溶剂逐步挥发, 产生了微粒或纯溶质的液滴。根据不同的流动相及组、组分挥发性以及流动相流速, 可设置适当的蒸发管温度来实现目标物分析。

蒸发光散射检测器的 2 种工作模式对蒸发管的设计和要求是不同的。在不分流工作模式中, 蒸发管是直的且相对比较短, 要使溶剂完全蒸发必须采用相当高的温度, 载气的导热性能要好, 甚至在雾化阶段也需要预加热。但不分流工作模式产生的样品组分峰窄, 灵敏度高且维护方便。在分流工作模式中, 采用的是螺旋状的曲长蒸发管, 样品在蒸发管中存留的时间长, 可以有效地蒸发大多数低挥发性的溶剂如水溶液。雾状的溶质颗粒从蒸发管出来后在载气的带动下进入光散射池穿过光束, 光束被溶质颗粒散射, 散射光强度被光电倍增管或光电二极管转换成相应大小的电信号, 这是蒸发光散射检测器的检测过程。蒸发光散射检测器的光源发出的光由准直透镜汇聚于光散射池中间, 使检测信号响应最大化^[13]。透过光散射池的光由光阱吸收, 避免了反射光对检测器产生干扰。此外, 为避免颗粒在光散射池内分散和沉积在内壁上, 有些检测器在蒸

发管的出口还有一个文丘里管^[14], 通入的气体与雾化载气是相互独立的, 目的是包裹住颗粒并且让颗粒处于光散射池的中间, 此处光束强度大。这些措施都能改善检测器的灵敏度, 也保持光散射池内表面的清洁^[15]。

目前, 使用较多的为分流模式的蒸发光散射检测器, 柱流出物质通过弯管或者雾化室, 在此管中通过撞击使大的颗粒物沉积下来, 一部分附着在弯管的内壁, 一部分溶解在流动性中排出仪器; 小颗粒进入螺旋状的蒸发管。经过长时间的使用, 弯管的内壁和螺旋状的蒸发管会附着很多颗粒物, 因此检测器的灵敏度和噪音都会增加。本研究建立了蒸发光散射检测器弯管的内壁和螺旋状的蒸发管的清洗方法, 以期避免蒸发光散射检测器弯管和螺旋状的蒸发管内壁因杂质多而无法使用的问题。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

1525 高效液相色谱仪-带蒸发光散射检测器(美国 Waters 公司); UG 80 氨基柱(日本资生堂公司); XP205DR 万分之一天平(瑞士 Mettler 公司); MS 3 BASIC 旋涡混合仪(德国 IKA 公司); Neofuge 15R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); 1 mL 移液器(美国 Thermo 公司); 200 μ L 移液器(德国 Transferpette 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

盐酸、亚铁氰化钾、乙酸锌(优级纯、天津福晨化学试剂厂); 甲醇、乙腈、丙酮(色谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司); 实验室用水为去离子水(一级水); 乳糖(CAS 号: 63-42-3 纯度 99%, 德国 Dr Ehrenstorfer GmbH 公司);

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制:

亚铁氰化钾($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)溶液(92 g/L): 用水溶解 106 g 亚铁氰化钾并稀释到 1000.0 mL;

醋酸锌($C_4H_8O_4Zn \cdot 2H_2O$)溶液(183 g/L): 用水溶解 219 g 二水合醋酸锌和 30 mL 醋酸, 并稀释到 1000.0 mL;

乳糖标准储备溶液(10 mg/mL): 准确称取经过(96 \pm 2) $^{\circ}C$ 干燥 2 h 乳糖 0.1 g, 加水定容至 10.00 mL, 置于 4 $^{\circ}C$ 密封可贮藏一个月;

盐酸溶液(10.6 mol/L): 准确量取 88 mL 盐酸, 用水定容到 100.0 mL。

2.2.2 蒸发光散射检测器的清洗程序

1) 利用盐酸溶液来清洗蒸发管的内壁: 10.6 mol/mL 的盐酸清洗蒸发管内壁, 将蒸发管内壁的奶垢清洗干净之后, 蒸发管的温度升高到 100 $^{\circ}C$, 在加热模式下, 动力级别为 100% 的时候, 氮气压力: 70 psi, 烘烤 2 h, 然后利用氮气流吹出盐酸及残留的奶垢;

2) 用丙酮清洗 2 h, 蒸发光散射检测器设定参数为:

流速: 1.0 mL/min; 氮气压力: 60 psi; 蒸发管温度 100 °C; 加热模式: 动力级别 100%; 增益 100 的条件下进行清洗, 丙酮主要是去除流动相中的杂质;

3) 用乙腈清洗 2 h, 蒸发光散射检测器的设定参数同第 2 步, 乙腈主要是去除检测样品带入的杂质;

4) 用甲醇清洗 2 h, 蒸发光散射检测器的设定参数同第 2 步, 甲醇也是为了去除检测样品带入的杂质;

5) 设定蒸发光散射检测器的参数同第 2 步, 用水清洗 2 h; 然后停泵, 继续保持其它条件不变烘烤检测器 48 h;

6) 自动优化检测器参数: 第 1 步: 点击检测器控制面板上的 Diag 进入操作界面, 选择 serive 功能, 输入检测器密码, 进入优化检测器参数操作流程; 第 2 步: 点击 normalize lamp 进入, 点击确认之后, 检测器参数优化成功, 测定正常值范围为 2~10 之间。在进行检测器参数优化时, 必须开启检测器的灯。

2.2.3 检测乳糖的色谱参考条件

色谱柱: CAPCELL PAK NH₂ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)或性能相当者; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 10 μL; 流动相: 乙腈: 水=85:15(V:V);

蒸发光散射检测器设定参数: 蒸发管温度: 80 °C; 氮气流量: 40 psi; 增益: 100; 柱温: 40 °C; 喷雾器模式: 加热; 动力级别: 70%。

2.2.4 乳糖样品前处理

准确称取样品 2.00 g (精确至 0.01 g) 试样于 15.0 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 的铁氰化钾溶液, 加入 0.5 mL 乙酸锌溶液, 旋涡混合均匀, 用水定容到 10.00 mL, 超声 30 min, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 过 0.22 μm 水系滤膜过滤, 使用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)进行分析。

3 结果与分析

3.1 标准曲线、检出限

3.1.1 标准曲线、检出限

用水配制含有乳糖为 0、0.5、0.1、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 mg/mL 的标准工作液、采用 2.2.3 色谱条件利用高效液相色谱仪进行检测, 以标准物质的浓度为横坐标, 对应峰面积为纵坐标采用幂函数方程绘制标准曲线, 得到回归方程及其相关系数, 并根据信噪比 $S/N=3$, 计算乳糖的最低检测浓度, 通过乳糖的计算公式, 得到检测器清洗后乳糖的最低检出限, 结果见表 1。

表 1 乳糖工作曲线、相关系数和检出限
Table 1 Calibration curves, correlation coefficients and detection limit of lactose

组分	回归方程	相关系数(r^2)	检出限/(mg/100 g)
乳糖	$Y=6543932.8608X^{1.0802}$	0.9992	190

3.1.2 蒸发光散射检测器清洗前后乳糖检出限对比

从表 2 可以看出, 清洗后的蒸发光散射检测器检测乳糖的检出限明显低于清洗前的, 说明清洗后的蒸发光散射检测器检出限明显增加。

表 2 检测器清洗前后乳糖检出限对比
Table 2 Comparison of lactose detection limits before and after detector cleaning

检测器清洗前后	回归方程	相关系数(r^2)	检出限/(mg/100 g)
清洗前	$Y=5753331.4567X^{1.1059}$	0.9661	450
清洗后	$Y=6543932.8608X^{1.0802}$	0.9992	190

3.2 乳糖含量回收率及精密度的测定

3.2.1 乳糖含量回收率及精密度的测定

分别向零乳糖的牛奶中添加 3 个水平的标准溶液, 每个加标水平取 7 个平行样, 考察清洗后的检测器检测乳糖的回收率和精密度, 结果如表 3 所示。由表 3 可以看出, 乳糖的平均回收率为 96.45%~103.16%, 相对标准偏差为 3.88%~5.18%, 表明该方法具有较好的准确度和精密度, 满足乳糖检测的要求。

表 3 样品中乳糖检测回收率($n=7$)
Table 3 Detection recovery of lactose ($n=7$)

化合物	添加水平/(mg/100g)	样品	平均回收率/%	相对标准偏差/%
	200		103.16	5.18
乳糖	400	牛奶	96.45	4.12
	600		98.73	3.88

3.2.2 蒸发光散射检测器清洗前后的精密度测定

在确定整台高效液相色谱仪除蒸发光散射检测器以外, 全部正常的情况下; 测定乳糖含量高的样品, 清洗前后对同一样品同一时间连续进样 10 次, 得到的结果如表 4 所示。从上述数据可以看出, 检测器清洗后, 对同一样品仪器连续进样 10 次, 峰面积的重复性好, 相对误差小, 满足乳糖检测的要求。

表 4 精密度测定($n=10$)
Table 4 Precision measurement ($n=10$)

次数	清洗前(峰面积)	样品相对标准偏差/%	清洗前(峰面积)	相对标准偏差/%
1	5241945		5342185	
2	3638902		5217569	
3	3931869		5309548	
4	4513723		5288562	
5	4492450	14.72	5319085	0.66

续表 4

次数	清洗前 (峰面积)	样品相对 标准偏差/%	清洗前 (峰面积)	相对 标准偏差/%
6	5093284		5278957	
7	5513648		5300345	
8	3745129		5256754	
9	4867834		5268955	
10	5322473		5299760	

3.3 实验乳糖 1.0 mg/mL 的标准工作在检测清洗前后的响应信号

图 1 中乳糖的响应信号大约为 120 LSU, 图 2 中乳糖的响应信号大概为 400 LSU, 同一浓度的样品响应信号强度, 大概增加 2 倍以上。

3.4 蒸发光散射检测器清洗前后噪音的比较

图 3 中体现的噪音大概为 20, 图 4 中体现的噪音大概小于 5, 清洗后的仪器噪音明显小于清洗前的仪器噪音。

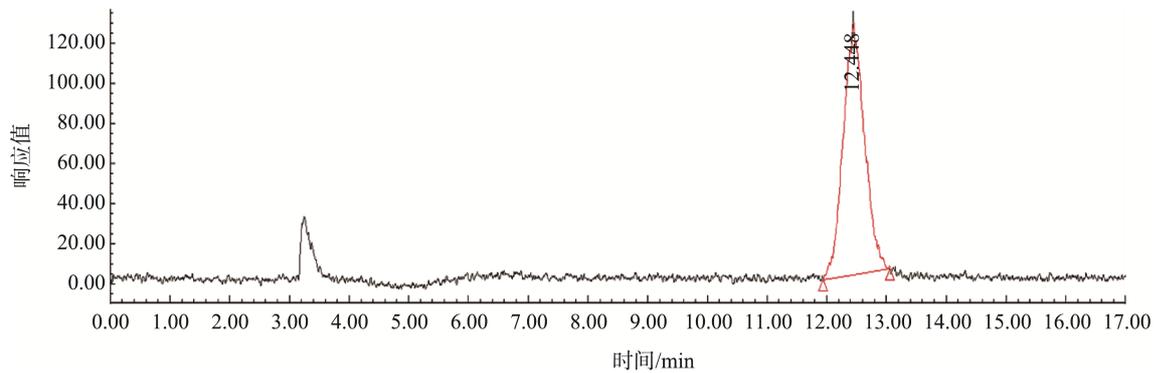


图 1 清洗前的响应信号
Fig.1 Response signal before cleaning

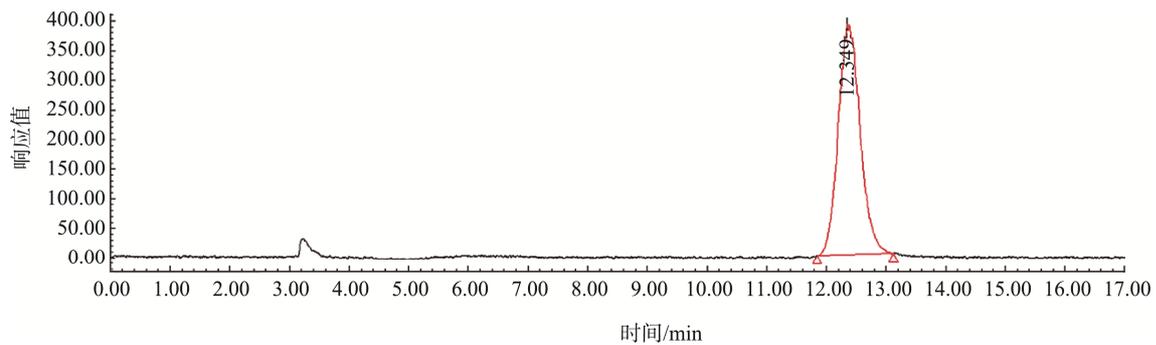


图 2 清洗后的响应信号
Fig.2 Response signal after cleaning

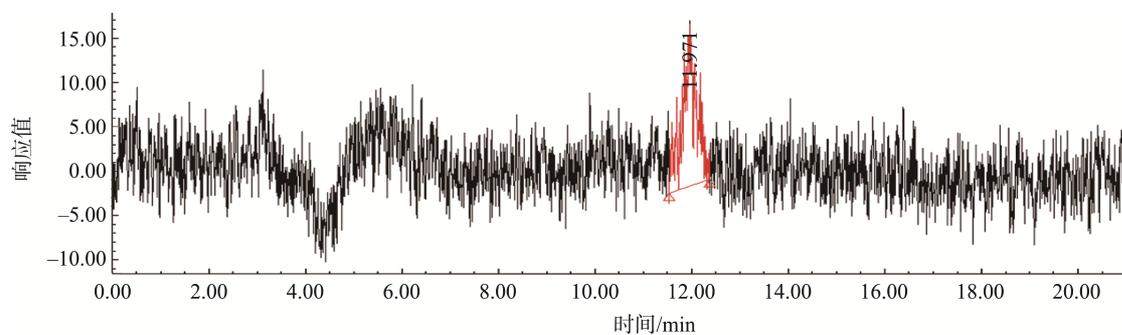


图 3 清洗前的噪音
Fig.3 Noise before cleaning

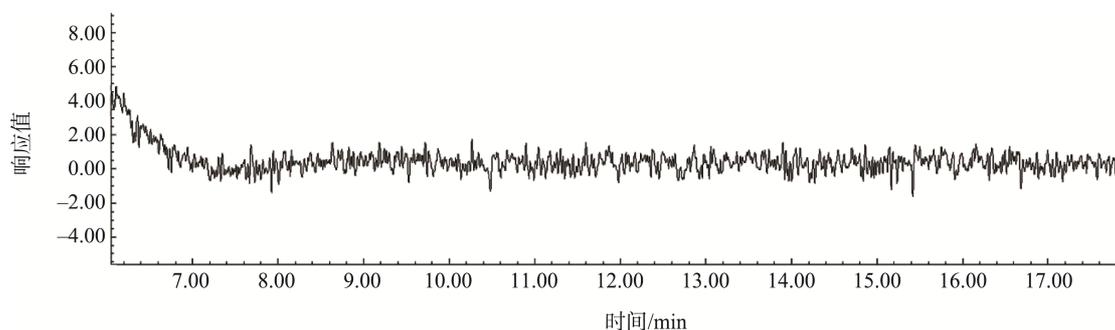


图 4 清洗后的噪音
Fig.4 Noise after cleaning

4 结 论

采用盐酸、丙酮、甲醇、乙腈、水按照一定的条件对蒸发光散射检测器进行清洗, 利用清洗后的检测器对乳糖的回收率、检出限、精密度进行清洗效果验证; 乳糖的平均回收率为 96.45%~103.16%, 相对标准偏差为 3.88%~5.18%, 检出限为 190 mg/100 g, 明显优于蒸发光散射检测器清洗前检测乳糖的检出限; 通过验证清洗后检测器重复进样的精密度、响应信号以及噪音的测试, 满足检测要求。

参考文献

- [1] 于宝珠, 陈立亚, 赵慧芳. 蒸发光散射检测器在药物分析中的应用[J]. 中国药事, 2005, 19(7): 440-444.
Yu BZ, Chen LY, Zhao HF. Application of evaporative light scattering detector in drug analysis [J]. Chin Pharm Aff, 2005, 19(7): 440-444.
- [2] 张辰, 王南林, 魏继日, 等. DDL31 型蒸发光散射检测器的使用和维修[J]. 医疗卫生装备, 2011, 32(3): 126-127.
Zhang C, Wang NL, Wei JR, *et al.* Use and maintenance of DDL31 evaporative light scattering detector [J]. Med Equip, 2011, 32(3): 126-127.
- [3] 鄢丹, 张毅, 韩玉梅, 等. HPLC—ELSD 法测定疏血通注射液中 17 种未衍生氨基酸含量[J]. 药物分析杂志, 2007, (4): 558-560.
Yan D, Zhang Y, Han YM, *et al.* Determination of 17 kinds of underivatized amino acids in Shuxuetong injection by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal, 2007, (4): 558-560.
- [4] 邓海根, 曹雨震. 高效液相色谱仪的通用型质量检测器——蒸发光散射检测器(ELSD)[J]. 药物分析杂志, 1994, (3): 61-63.
Deng HG, Cao YZ. Universal quality detector for high performance liquid chromatographs-evaporative light scattering detector (ELSD) [J]. Chin J Pharm Anal, 1994, (3): 61-63.
- [5] 肖锋, 万明. 蒸发光散射检测器测定黄芪甲苷的参数优化[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(8): 72-73.
Xiao F, Wan M. Optimization of parameters for determination of astragaloside by evaporative light scattering detector [J]. Hubei J Tradit Chin Med, 2014, 36(8): 72-73.
- [6] 王琳, 石刚, 孙琴, 等. 蒸发光散射检测器在药物分析中的应用[J]. 西南医科大学学报, 2003, 26(6): 547-549.
Wang L, Shi G, Sun Q, *et al.* Application of evaporative light scattering detector in drug analysis [J]. J Southwest Med Univ, 2003, 26(6): 547-549.
- [7] 陈琴鸣. 蒸发光散射检测器在糖类分析中的应用[C]// 中国药学会全国多糖类药物研究与应用研讨会, 2008.
Chen QM. Application of evaporative light scattering detector in sugar analysis[C]// National Pharmaceutical Research and Application Seminar on Polysaccharide Drugs, 2008.
- [8] 刘兆峰. 岛津蒸发光散射检测器使用探讨[J]. 医疗装备, 2012, 25(5): 13-14.
Liu ZF. Discussion on the use of Shimadzu evaporative light scattering detector [J]. Med Equip, 2012, 25(5): 13-14.
- [9] 车贵甫. 液相色谱仪蒸发光散射检测器原理解析[J]. 河南科技, 2015, (19): 134-135.
Che GP. Analysis of the principle of liquid chromatography evaporative light scattering detector [J]. Henan Sci Technol, 2015, (19): 134-135.
- [10] 佚名. 基于文丘里效应的环保风力涡轮发电装置, CN 204436694 U[P]. 2015.
ANONYMOUS.. Environmentally-friendly wind turbine. generator based on Venturi effect, CN 204436694 U [P]. 2015.
- [11] 林有余. 文丘里效应在电动高压清洗机上的应用[J]. 电动工具, 2015, (3): 7-12.
Lin YY. Application of Venturi effect in electric high pressure cleaner [J]. Electr Tool, 2015, (3): 7-12.
- [12] 王巧娥. 蒸发光散射检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2006, 6(25): 126-132.
Wang QE. Research progress in evaporative light scattering detection technology [J]. J Instrum Anal, 2006, 6(25): 126-132.
- [13] 周文莉. 微流蒸发光散射检测器的优化及其与毛细管液相分离体系联用及在药物分析中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
Zhou WL. Optimization of microfluidic evaporative light scattering detector and its application in combination with capillary liquid phase separation system and its application in drug analysis [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2015.
- [14] 李毅, 钟华, 周淑芳, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定天

年颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国药房, 2006, 17(18): 1414-1415.

LI Y, Zhong H, Zhou SF, *et al.* Determination of astragaloside IV in Tiannian granules by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector [J]. Chin Pharm Aff, 2006, 17(18): 1414-1415.

- [15] 何海红. 高效液相色谱用蒸发光散射检测器检定方法研究[J]. 化学分析计量, 2010, 2(19): 78-80.

He HH. Study on calibration method of evaporative light scattering detector for high performance liquid chromatography [J]. Meter Chem Anal, 2010, 2(19): 78-80.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

常建军, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品监测安全。

E-mail: changjianjun@mengniu.cn



袁凤琴, 分析员, 高级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。

E-mail: yuanfengqin@mengniu.cn

“功能性食品微生物”专题征稿函

随着经济的发展和人们生活水平的不断提高, 人们对食品的要求已从单纯的温饱转向了“功能、营养和健康”的新要求; 膳食结构和组成是影响健康和疾病发生的重要因素, 在人们多年以来追求中医、西医或中西医结合预防和治疗疾病模式外, 渐渐转“医补”为“食疗”, 期望利用食品的功能性达到促进健康和干预疾病的目的。因此, 以功能性食品微生物为核心的功能性食品如益生菌、乳酸菌、微生物源 PUFA、红曲等已逐渐深入人心, 这也推动了功能性食品微生物资源开发与应用的发展。在 21 世纪生物技术大发展的时代背景下, 利用食品微生物的特定功能性质, 开发系列健康的功能食品成为重要的发展趋势。目前, 以功能性微生物为核心的技术与产品已广泛用于食品、保健品、医药和饲料行业, 应用前景十分广阔。

功能性食品微生物是一类通过菌体细胞或代谢产物能够赋予食品具有特定功能性质、或者显著改进和优化食品制造工艺的微生物。鉴于此, 本刊特别策划了“功能性食品微生物”专题, 由江南大学食品学院的 **田丰伟教授** 担任专题主编, 围绕 **(1) 功能性食品微生物的资源发掘、高效筛选、分离鉴定, (2) 功能性食品微生物的生物性质、功能机理与作用机制, (3) 基于功能性食品微生物的食品生物加工与制造的基础和应用研究, (4) 功能性食品微生物的评价与优化方面** 或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2019 年 **12 月份出版**。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编 **吴永宁研究员** 及专题主编 **田丰伟教授** 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 **2019 年 11 月 1 日** 前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与与支持!

投稿方式: (请注明功能性食品微生物专题)

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoods@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部