

高效液相色谱中溶剂效应理论

原创：ZMJ 药事纵横 今天

摘要

高效液相色谱是有机分析，特别是药物分析的重要手段。而色谱峰峰形影响着化合物的定量和定性。在影响色谱峰峰形的诸多因素中，“溶剂效应”经常被忽视。本文是对高效液相色谱中“溶剂效应”的漫谈，水平有限，欢迎批评指正。

高效液相色谱已经广泛应用于有机分析，特别是药物分析工作中。分析工作者通常将更多精力集中在流动相和仪器方法的选择上，忽视了溶解样品所用溶剂的重要性。高效液相色谱进样之前，必须选择一种合适的溶剂溶解样品。如果溶剂选择不当则会产生“溶剂效应”，使分析工作者在定性和定量分析中产生误判，影响分析结果。因此，了解“溶剂效应”产生的原因及掌握避免“溶剂效应”的基本方法对分析工作者是十分必要的。

溶剂效应的概念

溶剂效应亦称“溶剂化作用”。指液相反应中，溶剂的物理和化学性质影响反应平衡和反应速度的效应。可能造成色谱峰展宽、分叉、保留时间漂移、峰面积变化，双峰等现象。与此同时，较早洗脱的峰出现前沿或分叉，较晚洗脱的峰峰形正常【1】。

溶剂效应产生的原因

样品进入高效液相色谱中，当溶剂与流动相存在差异时，一部分样品溶解进入了流动相，一部分还留在溶剂里，造成色谱保留的差异。造成这种差异的原因主要有以下几个方面：

（1）溶剂强度

在反相色谱系统中溶剂强度的顺序为水（最弱）<甲醇<乙腈<乙醇<四氢呋喃<丙醇<二氯甲烷（最强）。溶解样品的溶剂强度大于该样品出峰时流动相强度，样品溶剂可以看成流动相的一部分，一部分样品溶解于溶剂中会被迅速洗脱出色谱柱，而一部分样品溶解于流动相，被流动相洗脱出，这样会造成色谱峰的展宽或者分叉【2】。图1是溶剂强度对色谱峰形的影响。

图1 溶剂强度对色谱峰影响【2】

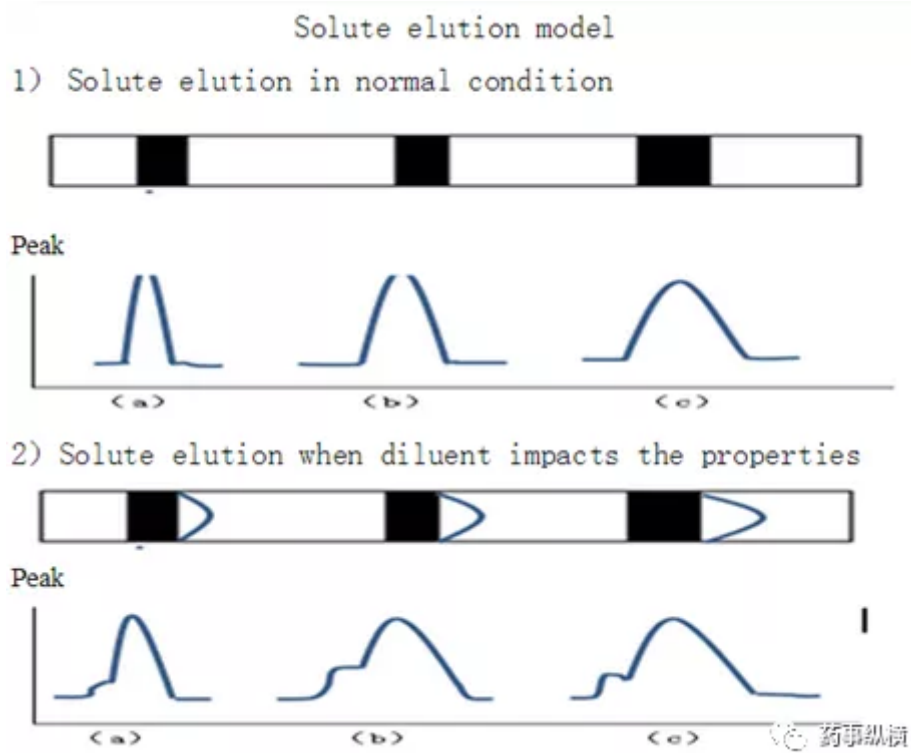
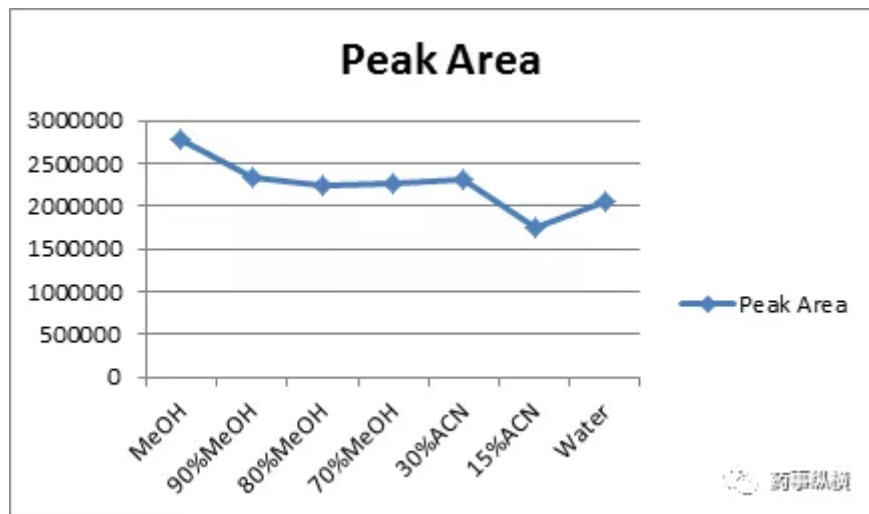
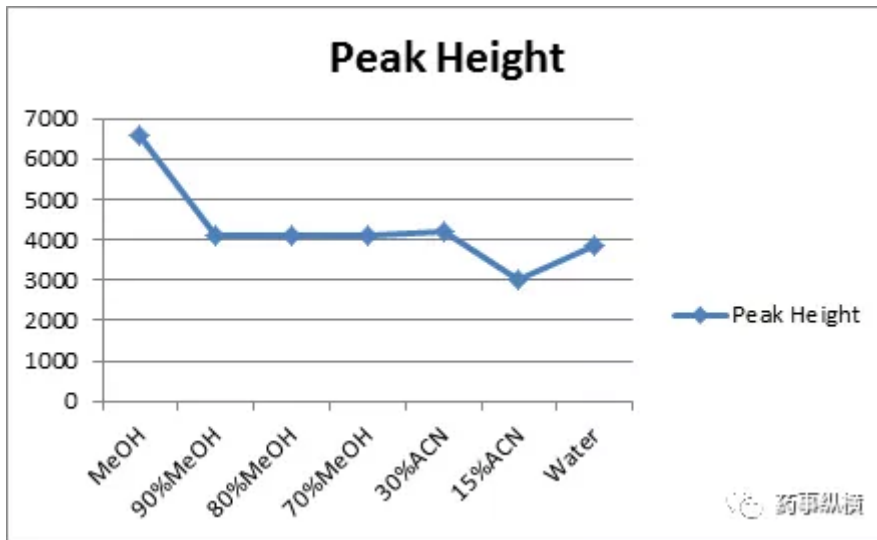


图2是笔者采用AgilentZORBAX TC-C18色谱柱以乙腈-水（30:70）为流动相，采用不同的溶剂对目标分析物进行处理制备同一浓度的溶液，考察目标分析物的峰面积及峰高。

图2 不同溶剂溶剂效应对比



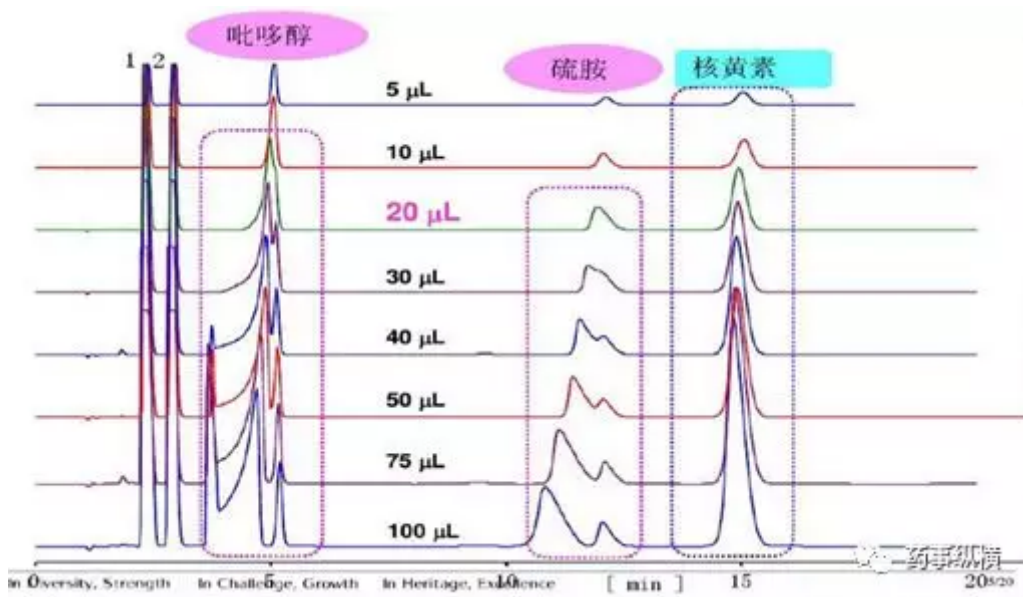


(2) 进样体积

进样体积造成的溶剂效应是一般与溶剂种类有关的。流动相作为溶剂时，增加进样体积后，目标分析物色谱峰不会发生迁移，保留时间基本稳定。使用强度大于该样品出峰时流动相强度的溶剂，增加进样体积后，目标分析物色谱峰会向前迁移，直至裂分，并且峰高变小峰宽变大。这是因为进样体积较小时，扩散至流动相的目标分析物占绝大多数，除了保留时间略微提前，峰形以及峰宽与流动相溶解时基本一致。体积增大到一定程度，扩散至流动相氛围的目标物与留在溶剂氛围的目标物在数量上相当时，色谱峰分叉明显。当样品体积进一步增大，绝大多数目标物进入色谱柱时是溶解在溶剂中的，目标分析物的色谱峰已经明显向前迁移了。

常规情况下，为了获得良好的峰形，推荐的进样量为 $10\mu\text{L}$ 。不过实际情况中经常会出现 $20\mu\text{L}$ 、 $30\mu\text{L}$ 、 $50\mu\text{L}$ 甚至 $100\mu\text{L}$ 的进样量，比如痕量物质的定量。所以如果不能减少至合适的进样体积，为了获得良好的响应和峰形，应尽量选择与流动相比比例相同或相近的溶剂。

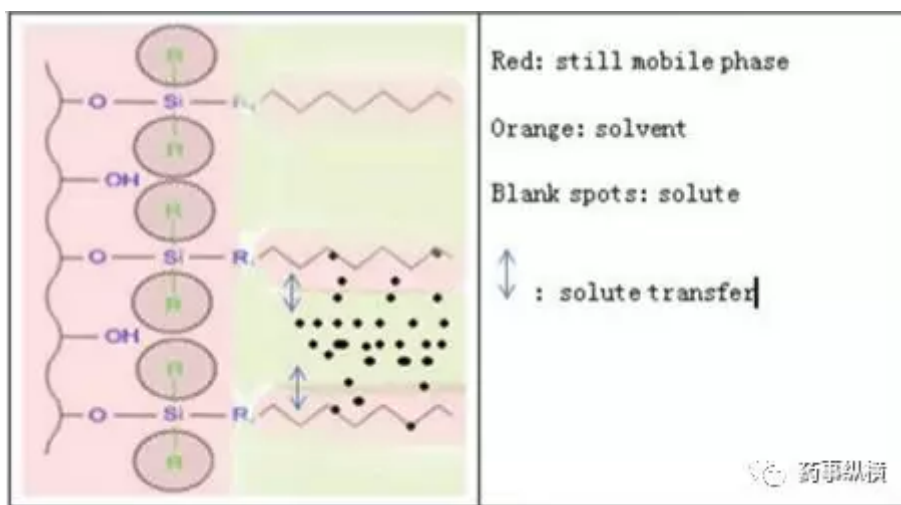
图3是某讲义引入的进样体积对峰形的影响。



(3) 溶剂与流动相的兼容性

有些样品采用流动相或者流动相中的有机相溶解难度较大，分析工作者会采用氯仿、乙酸乙酯、苯等溶剂，这些溶剂与流动相兼容性不佳，直接包裹溶质跳过色谱初期的保留过程，待溶剂的分配平衡建立起来后溶质过于展宽，甚至直接部分冲出色谱柱。【3】其实在色谱柱中的流动相只有50%是动态，其余50%在死体积、载体间隙处于静止状态。溶质被固定相吸附先通过50%的“静止区”，若溶剂及流动相不兼容，则影响溶质在溶剂与流动相之间的传递，从而影响被固定相吸附而导致峰形变差。

图4是色谱保留机理图^[5]



(4) 溶剂pH值

易于解离的化合物对流动相的pH值较敏感。该化合物处理解离状态下极性发生显著变化，导致固液分配系数发生较大变化。该影响经常表现为保留时间的漂移而不是多个峰或者峰分叉等峰形差现象。

导致溶剂效应除了上述原因一般还有溶剂紫外吸收、柱前管路、柱长、离子缔合、互变平衡等。再此就不做详细叙述。

溶剂效应的判断方法

当出现色谱峰异常时，比如色谱峰分叉，可采用全波长扫描查看分叉色谱峰紫外吸收情况进行判断。另外对样品溶液进行低样本量（如0.5 μ L），若峰形正态基本就可以断定为“溶剂效应”。

溶剂效应的消除方法

- 应该尽量使用流动相作为溶剂（梯度采用初始比例），可以极大减弱或消除溶剂对色谱行为的影响。溶剂中的有机相比比例略低于流动相有机相比比例时峰形更好。
- 当样品浓度响应较大，可以采用减少进样体积减弱溶剂的影响。但要酌情而定，比如在有关物质测定时，减少进样量常常会牺牲灵敏度。
- 当溶剂因标准或者待测成分性质不能改变时，可适当调整流动相比比例，使其强度尽量与溶剂接近，从而消除影响。
- 对于梯度洗脱而言，在不影响分离度的情况下，可以改用较粗内径的柱前管路。
- 适当的对溶剂进行转换（酸提、碱提、回流酯化或开环、衍生化等）。
- 适当的对溶剂进行净化（固相萃取、固相分离萃取、液液萃取、GPC净化等）
- 吸样后，针不回针座，悬停空中，计量泵吸-排-吸-排数次，使目标物完全扩散至流动相。此条是同行相关经验，并未经笔者验证。



溶剂要求

- 高纯度：不能与固定相发生反应，溶剂不纯会引起基线变差，产生“伪峰”。
- 溶剂应该与检测器匹配，溶剂在紫外光条件下应没有吸收或吸收很小。
- 溶剂对于待测样品具备足够的溶解能力。溶剂的极性要与待测样品相匹配，如果溶解度欠佳，样品会在柱头沉淀，不但影响纯化分离，且会使柱子恶化。
- 溶剂化学稳定性良好，不与样品发生聚合反应。
- 低粘度，沸点适中，减小溶质的传质阻力，降低柱压，利于提高柱效【4】。常用的低粘度溶剂有丙酮、乙醇、乙腈等；粘度过低的溶剂也不宜采用，如戊烷、乙醚等，易在色谱柱或检测器内形成气泡，影响分离。



结语

以上是根据个人研究经验结合相关资料总结的高效液相色谱使用中“溶剂效应”相关观点，由于阅历较浅，未尽全面。不足之处还请谅解！

参考文献

- 【1】 Lee H K , Hoffman N E . INJECTION SOLVENT EFFECT ON PEAK HEIGHT IN ION-EXCHANGE HPLC[J]. Journal of Chromatographic Science, 1992,30(10):415-421.
- 【2】 Hoffman N E , Chang J H Y . Injection Solvent Enhancement of Peak Height in Reversed-Phase Liquid Chromatography[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1991, 14(4):651-658.
- 【3】 谢孟峡, 杨力力. 酚类化合物的反相高效液相色谱研究 (I) [J]. 北京师范大学学报：自然科学版, 1991(2):211-216.

【4】 Castells C B , Castells R C . Peak distortion in reversed-phase liquid chromatography as a consequence of viscosity differences between sample solvent and mobile phase[J]. Journal of Chromatography A, 1998,805(1-2):55-61.

【5】 溶剂对反相液相色谱中峰形的影响忆峰