

一篇长文让您完全理解液相色谱中的溶剂效应

原创：彩云 色谱与质谱 3天前

在色谱理论中，样品作为一个点被引入色谱系统中，不占有体积，属于理想状态。实际操作中，这是不可能实现的，通常的做法是把目标物或含目标物的基质溶解在溶剂里面，然后将其注入色谱系统。在液相色谱法中，进样体积处于0.1-100 μ l之间，绝大多数情形处于1-20 μ l之间(注：理想的进样体积视色谱柱柱床截面积或柱床体积而定)，甚至小于一颗露珠。然而这个体积相对于HPLC的流动相规模却是不容忽略的。今天，笔者以理论为指导以实测为依据，阐述一下样品溶剂对液相色谱分离的影响。

1.溶剂效应的成因

化学分析中，选择样品溶剂时，溶解性是首要的考虑因素，其次还应考虑挥发性、稳定性、毒性等因素。在液相色谱分析中，则还应考虑样品溶剂与分离模式的契合性。

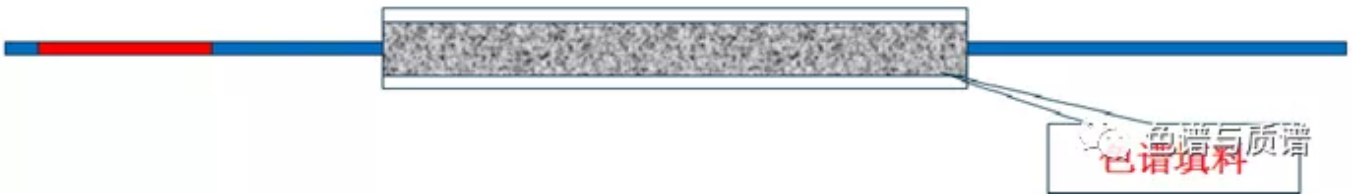
液相色谱法中，样品溶剂类型的选择通常有两种情形：其一，流动相溶解目标物，多见于一种或极性相近的几种目标物测定；其二，非流动相溶解目标物，比如天然提取物中未知物探索、极性差别较大的多种目标物分析、某些液体物质直接进样(比如酒类成分分析、水中污染物分析)等。

流动相或初始比例流动相溶解样品可以看作样品处理的理想状态，只要未发生体积过载(注：进样体积超过柱体积的1%时，即存在体积过载风险)或浓度过载，一般可以得到完美的结果。当样品溶剂与流动相的洗脱强度差别较大时，液相色谱的表现则会遭遇一些麻烦。样品溶剂与流动相不一致时又存在两种情形：其一，洗脱强度明显强于流动相；其二，明显弱于流动相。

下图为**等度模式**下，样品溶剂强于流动相时的色谱表现：

<p>反相模式：固定相呈非极性或弱极性，流动相为水+甲醇或乙腈，样品溶剂极性弱于流动相，比如纯乙腈或纯甲醇，进样体积较大。</p> <p>正相模式：固定相为强极性，流动相为中等极性或弱极性，样品溶剂极性强于流动相。进样体积较大。</p>	<p>蓝色:流动相 红色:溶剂中的样品 黄色:流动相中的样品</p> <p>色谱与质谱</p>
---	---

第一阶段：样品刚被注入系统。



第二阶段：进入色谱柱前，两端靠近流动相的目标物逐渐扩散进入流动相(注：黄色区域)，中心区域目标物仍溶在原溶剂中(注：红色区域)。样品在空间上尚未分裂。



第三阶段：进入色谱柱后，流动相氛围中的目标物以正常速度被洗脱(注：黄色区域)；溶剂氛围中的目标物(注：红色区域)，因强溶剂洗脱，移动速度快。样品在空间上开始分裂。



第四阶段：在一定时间内，溶剂氛围中的目标物移动始终快一些，前后两部分距离扩大。但移动快的目标物所处氛围逐渐被流动相稀释(注：因为溶剂和流动相均不保留)，其移动速度会逐渐降至正常流速。直到前面目标物的氛围完全被流动相替代，前后两部分的距离稳定下来。因而，样品溶剂与流动相洗脱强度差距越大，两部分目标物最终的距离拉的越大。



第五阶段：所有目标物在色谱柱中正常移动，但分裂已不可逆转。



第六阶段：经过检测器，同一目标物给出了两个色谱峰。其中进柱前即扩散进入流动相的那部分目标物组成了后面的色谱峰，它的保留时间与目标物的真实保留时间基本吻合。



简单概括，强洗脱溶剂不均衡地参与了目标物的洗脱，使色谱峰保留时间整体提前，而样品在柱前的不充分扩散导致了峰形扭曲。这种影响轻则导致峰展宽，严重时甚至导致峰裂分，给定性定量带来灾难。

2. 溶剂效应的影响因素

溶剂效应若想造成巨大灾难的一个前提条件是：样品溶剂的洗脱强度应明显强于流动相，否则，即使抵达柱头时目标物溶解在两种溶剂中，但由于洗脱强度接近，它们在随后的洗脱过程也不会拉开距离，也就不会裂分，甚至不会展宽。

样品抵达柱头的过程中，均存在样品向周围流动相扩散的过程，出于抑制柱外展宽的目的，分析者希望抑制这种扩散。如果目标物溶解在流动相或与流动相强度相近的溶剂中，抑制柱外扩散能提高柱效利于分离。二者洗脱强度差别大时，如不能让目标物完全扩散至流动相，溶剂效应很可能发生。

目标物扩散的驱动力包含三部分：依靠浓度差从样品溶剂向流动相传质、随样品溶剂向流动相扩散、层流。层流就是液体在管路中流动时，中心部分移动快、边缘移动慢，使柱状样品前部突出后部凹陷的现象，如下图。



分子在液体里的移动不活跃，依靠浓度差的传质速度较慢，慢的甚至可以忽略不计，除非能让样品半天后再进入色谱柱。尽管如此，增大管路内径可以增大接触面积，进而加快传质，而延长管路长度则能延长

传质时间。管路的内部是光滑而规则的圆柱形空腔，液体流动于其中通常会产生层流，这恰恰是目标物扩散至流动相的主要推动力。同样，管路内径越大层流越显著。**针后柱前的管路越粗越长越利于目标物扩散至流动相**。当然即使目标物在柱前完全扩散进入流动相，其所在的氛围的洗脱强度也因样品溶剂的参与而略强于流动相。

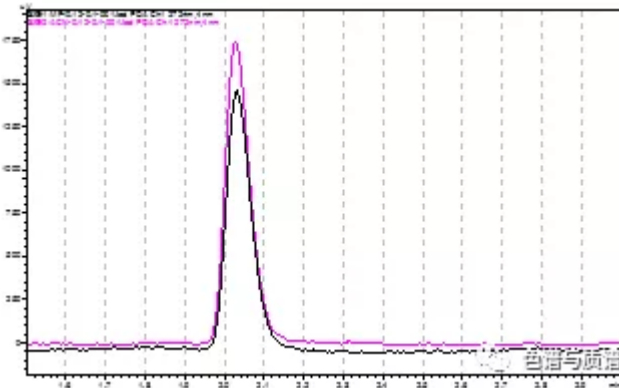
对于给定的方法和系统，较大的样品体积(注：此时“样品带”较长)不利于目标物完全扩散至流动相，溶剂效应更明显。而样品溶剂洗脱强度越强时，色谱峰的裂分会加剧。即使因样品体积小色谱峰没裂分，保留时间也会前移的明显。

2.1 进样体积的影响

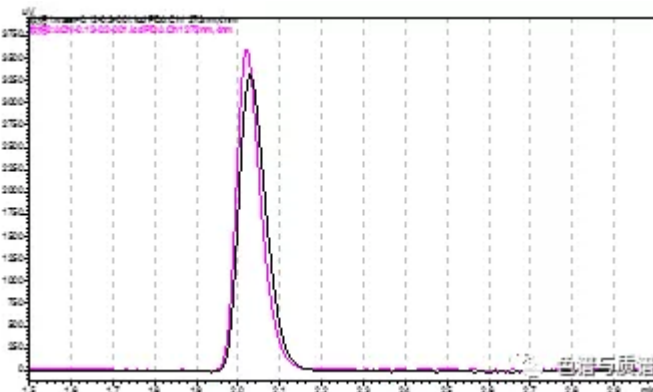
分析条件

流速:	0.45 ml/min
流动相:	15%乙腈水溶液
柱温:	40 °C
色谱柱:	C18, 3.0 mm ID. * 100 mm, 2.7 μm
样品:	10 mg/L caffeine溶液, 溶剂分别为纯水、流动相、纯乙腈。

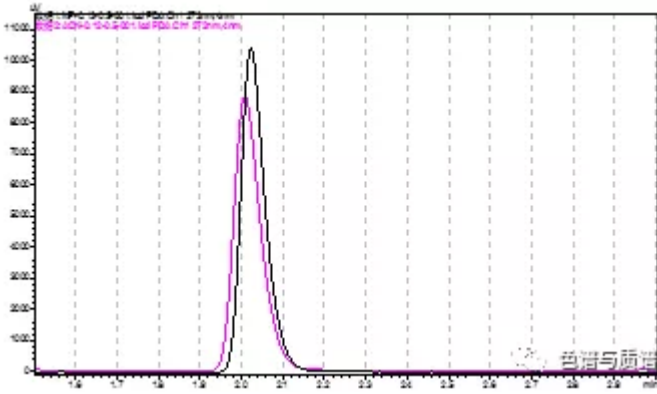
下面是分析结果。谱图中，黑色曲线为流动相溶解样品，粉色曲线为乙腈(反相色谱中的强洗脱溶剂)溶解样品，同一张图中，**caffeine**浓度和进样体积相同。



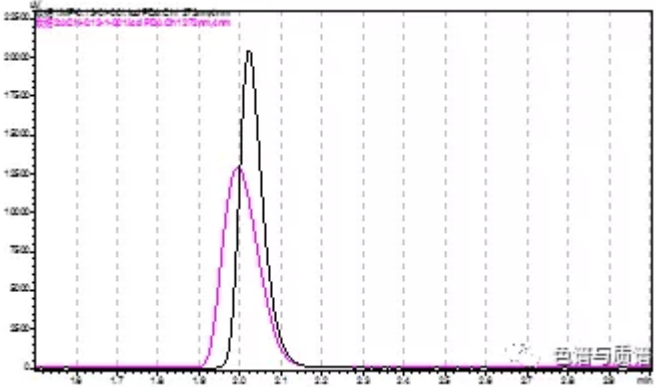
进样体积**0.1 μl**



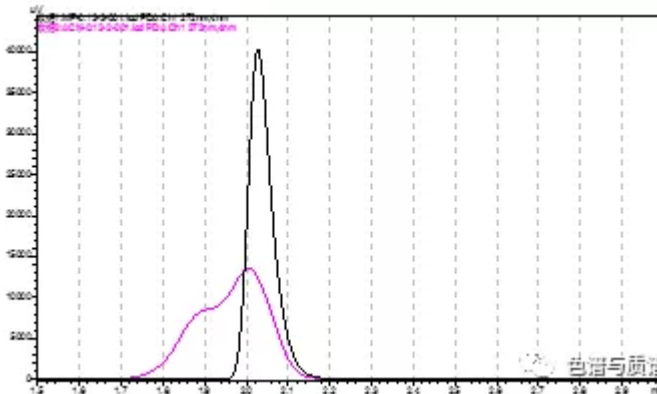
进样体积**0.2 μl**



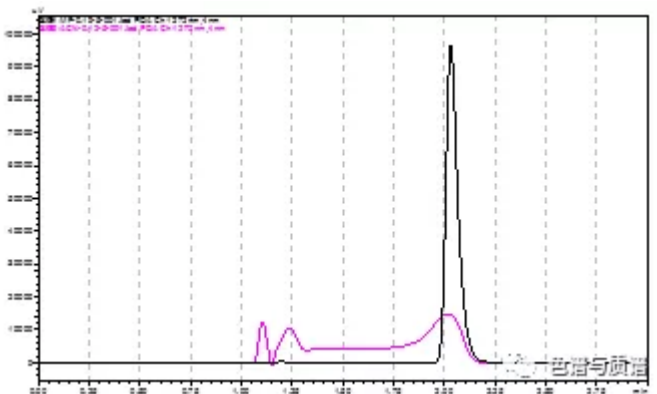
进样体积 0.5 µl



进样体积 1.0 µl



进样体积 2.0 µl



进样体积 5.0 µl

结果统计如下：

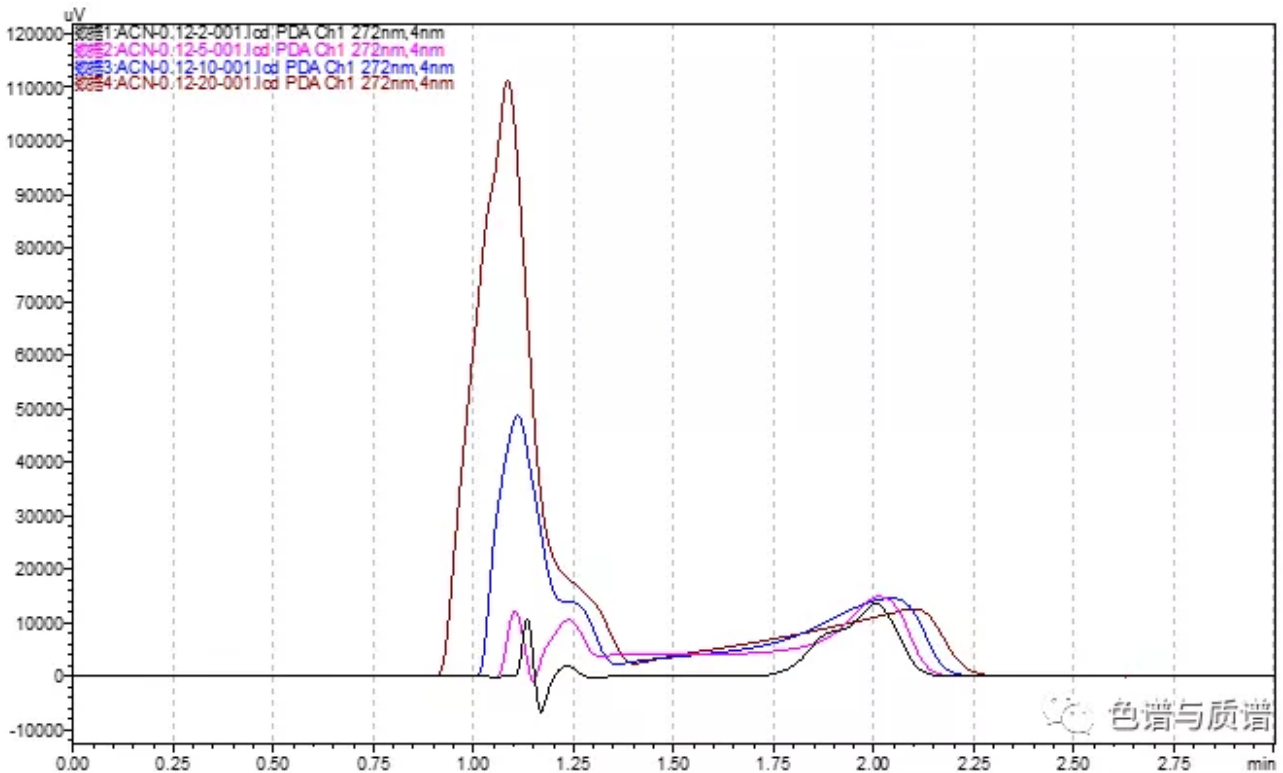
进样体积	0.1 µl	0.2 µl	0.5 µl	1.0 µl	2.0 µl	5.0 µl
MF	2.031 min	2.026 min	2.023 min	2.022 min	2.028 min	2.031 min
	0.069 min	0.065 min	0.062 min	0.061 min	0.062 min	0.062 min

ACN	2.028 min	2.020 min	2.009 min	1.994 min	N/A	N/A
	0.068 min	0.063 min	0.069 min	0.098 min	0.208	N/A

流动相溶解的样品，进样体积增加后，保留时间维持稳定，半高峰宽也基本稳定。而强洗脱溶剂溶解的样品保留时间则随进样体积增大而明显前移，直到裂分，而且峰宽也随之增大。

对于强洗脱溶剂溶解的样品：进样体积较小时，扩散至流动相的目标物占绝大多数，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。

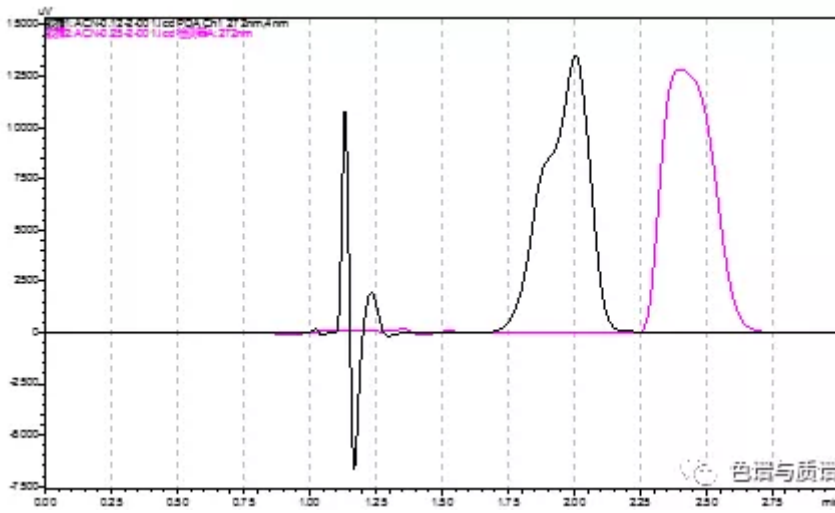
当样品体积进一步增大，绝大多数目标物进入色谱柱时是溶解在溶剂中的，前峰为主峰(如下图)。此时，可能会给分析者一种错觉:通过增大进样体积或者通过更细的管路解决了溶剂的效应。殊不知，色谱峰的保留时间已经明显提前了。**任何情况下，请牢记：假如不用流动相溶解一下样品，分析者甚至都不知道它真实的保留时间在哪里！**



2.2 柱前管路的影响

柱前管路内径越大、管路越长，越利于目标物向流动相扩散，而且使用更粗的管路比更长的管路有效(注：假设死体积相同)。虽然粗的管路加剧了等度条件下的柱外展宽，对柱效有危害，然而相较于峰分叉的危害而言，前者尚能接受。

如下图，黑色曲线使用了0.12mm. ID * 500 mm的管路（柱前），粉色曲线使用了0.25mm ID. * 500 mm的管路（柱前），样品溶剂均为乙腈，进样体积均为2 μ l。使用细内径管路的系统中峰开始分叉，而粗内径管路尚能维持可接受的峰形，尽管后者存在峰展宽的情况。



所以，在某些系统下溶剂效应更明显，这不是仪器不好，恰恰是这个系统对管路控制的太好了，才会让溶剂效应导致的峰形变形更明显！

2.3 其他影响因素

增大洗脱体积，比如延长柱长，或降低流动相洗脱强度增加目标物的保留因子，可以抑制溶剂效应。而且，色谱柱延长以后，柱前管路导致的柱效下降能得到弥补。这种做法相当于不变更色谱柱规格的前提下，减小进样体积。

2.4 特殊说明

在梯度洗脱模式下，溶剂效应不明显，如果真的存在，也只是影响出峰较早的色谱峰。这是因为梯度洗脱下，初始比例流动相无法洗脱目标物，而且强洗脱溶剂也无法让其快速移动，它们会富集在柱头，等流动相洗脱强度提高到一定程度，化合物才会逐渐被洗脱。

对于某些保留弱的化合物，它的洗脱强度与初始比例流动相越接近，就越容易受溶剂效应影响。因而，为了照顾出峰较早的目标物，即使使用了梯度洗脱，也不要采用强洗脱溶剂来溶解(假如低洗脱强度溶剂能完全溶解所有目标物)。(此处无图，建议读者尝试，或者大多数读者早就遇到过了。)

3. 溶剂效应的危害

- (1) 导致柱效下降，危害分离；
- (2) 危害峰形，危害定量，甚至危害定性；比如，在LCMS中，扫描前体离子时，遇到这种情况，甚至不知道哪个峰才是目标物；
- (3) 当标样和样品的溶剂不一致时，保留时间不吻合，同样危害定性；比如酒类成分分析，标样溶于纯水，样品是过滤的酒，后者的溶剂就是乙醇水，它的保留时间必定早于纯水溶解的标样；再比如水中污染物分析，目标物溶于有机相得到标样，而样品是过滤后的天然水；
- (4) 强洗脱的溶剂在基质中提取出的杂质遇流动相会析出，堵塞针座、柱前管路或色谱柱。

4. 解决办法

如何识别溶剂效应？

反相色谱中，溶剂极性弱于流动相；正相色谱中，溶剂极性强于流动相。这两种情况均有出现溶剂效应的风险。溶剂效应中的峰裂分有两个特点，裂分峰在正常色谱峰的前面，而且出峰越早的化合物裂分越明

显，出峰晚的化合物甚至不会受影响。色谱柱损坏(如筛板堵塞)导致的峰裂分，分叉峰出现在正常峰的右边，而且这种影响会波及所有化合物。

下面是笔者给出的一些建议：

- (1) 不影响目标物溶解性的情况下，尽量用流动相、初始比例流动相或洗脱强度尽量低的液体作为样品溶剂；
- (2) 在不影响目标物溶解的情况下，用弱洗脱强度的溶剂稀释样品，比如反相色谱法下，向有机溶剂中加水；
- (3) 为了满足多种目标物的提取或溶解度，必需使用强洗脱溶剂时，比如天然产物分析，在不影响灵敏度的情况下降低进样体积；
- (4) 如果不想减少进样体积也不想更改溶剂，可将初始流动相洗脱强度设置的较高，使初始流动相的洗脱强度与溶剂接近，然而这种方法可能会危害化合物的分离；
- (5) 在不影响分离的情况下，柱前改用较粗内径管路；(注意：假如是等度洗脱，此方法会降低柱效；假如是梯度洗脱，基本不影响柱效)。
- (6) 使用进样器预混合功能。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。(注意：假如是等度洗脱，此方法会降低柱效；假如是梯度洗脱，基本不影响柱效)。

5. 低洗脱强度溶剂的影响

在主流文献中，一般认为低洗脱强度溶剂通常不影响化合物的色谱表现，事实也是如此。然而，在一些极端情况下，微小的影响也能被发现。

等度模式时，低洗脱强度溶剂的色谱表现如下：

蓝色：流动相；绿色：溶剂溶解的样品；黄色：流动相溶解的样品。

第一阶段：样品刚被注入系统。



第二阶段：进入色谱柱前，边缘处样品逐渐扩散进入流动相(黄色)，中心处样品仍溶在原溶剂中(绿色)。样品在空间上未分裂。



第三阶段

前端被流动相溶解的目标物进入色谱柱，以正常洗脱速度移动，紧跟着低强度溶剂溶解的目标物(绿色)也将进入色谱柱。



当低强度溶剂中的目标物(绿色)进入色谱柱时，此部分目标物将基本不能向前移动，因为低强度溶剂无法洗脱它，后者被富集在柱头(区域宽度被压缩，类似梯度洗脱时的初始比例流动相)。而低强度溶剂则会持续向前移动，能追赶上最前面的那部分目标物，在较小的时间段内会稍稍降低最前面那部分目标物的移动速度。前面那部分目标物中心点与中间那部分目标物中心点的最大时间差小于等于样品体积/流速。



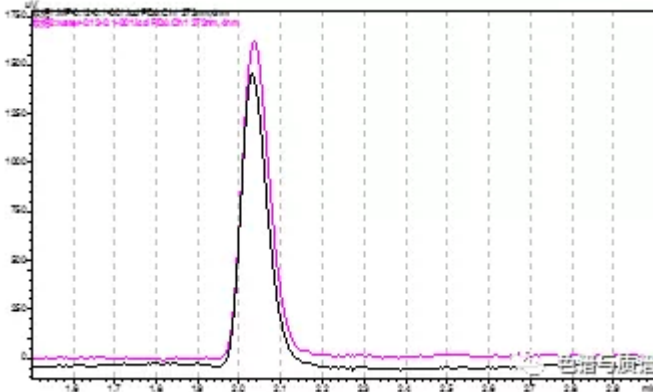
随后，后面溶于流动相的目标物也进入色谱柱，该部分与柱头富集的目标物(下图左边的椭圆形谱带)一起被流动相带着以正常速度移动，(注：该部分以较宽椭圆形显示是为了表明这部分目标物占大多数，并不意味着它的区域宽度较宽，相反它的宽度比正常色谱峰更窄)。需要注意的是中、后部分合并的那个谱带的保留时间要略晚于正常的保留时间，进样体积越大，保留时间延后越明显。



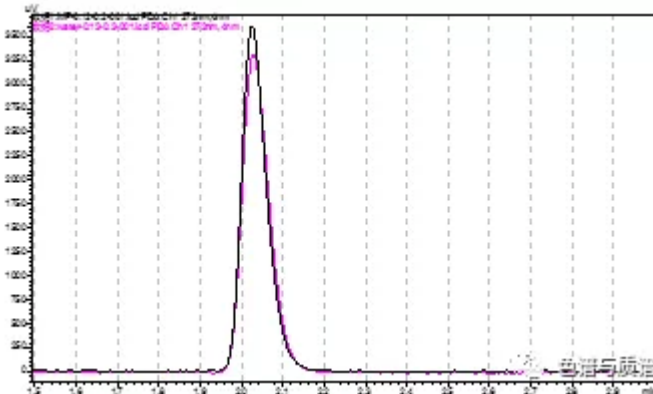
与强洗脱溶剂溶解的情形相比，低洗脱强度时，基本不会发生峰的裂分。尤其重要的是，如上图所示，由中后两部分组成的峰始终是主峰，并能保持较好的峰形。即使发生了前与中后部分的峰裂分，我们仍能找到主峰。

以低强度溶剂不能洗脱目标物为前提，可以大胆预测：当进样体积极小时，进色谱柱前，目标物全部扩散至流动相，峰形完全正常(这与采用强洗脱溶剂时类似)。当进样体积极大时，进色谱柱前，扩散至流动相的目标物占比较低，前部分目标物占比更小，主峰明显，前面会有较小的裂分峰。只有当进样体积不大不小的时候，才会出现明显的裂分峰。综合来看，低洗脱强度溶剂时对色谱峰的危害小于强洗脱溶剂。

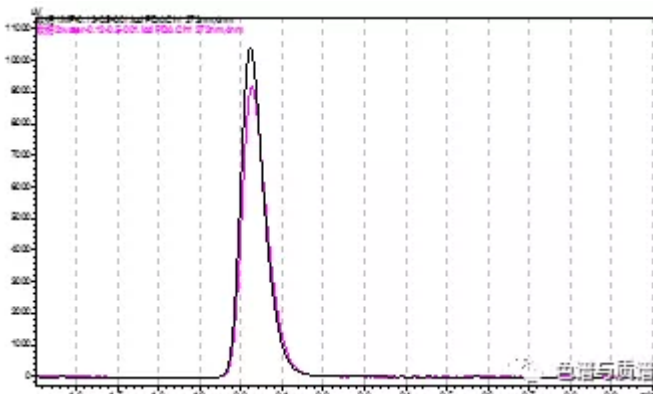
对比了溶于流动相和纯水(低强度)的caffeine，与前面分析条件相同。



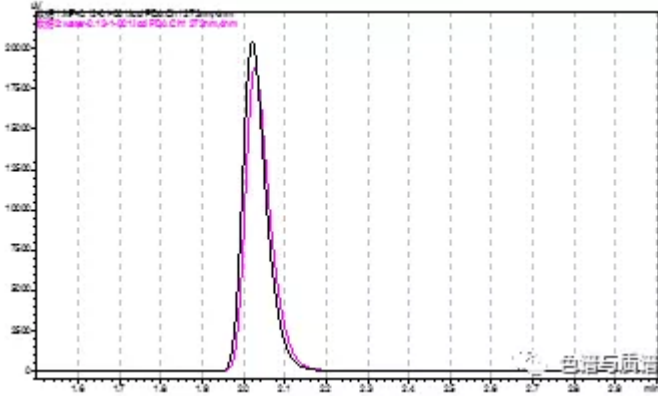
进样体积 $0.1 \mu\text{l}$



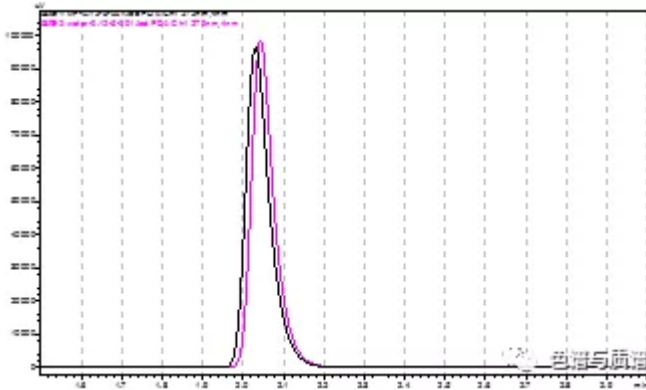
进样体积 $0.2 \mu\text{l}$



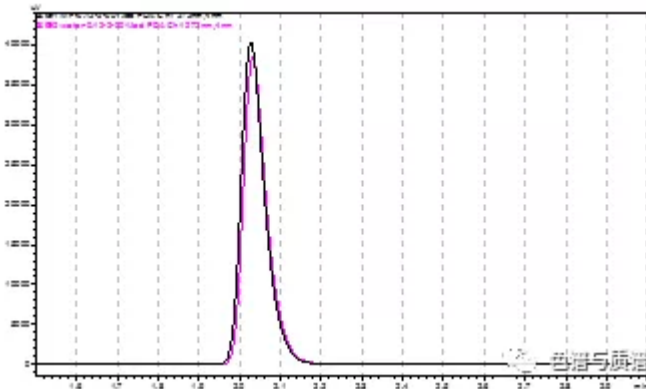
进样体积 0.5 μ l



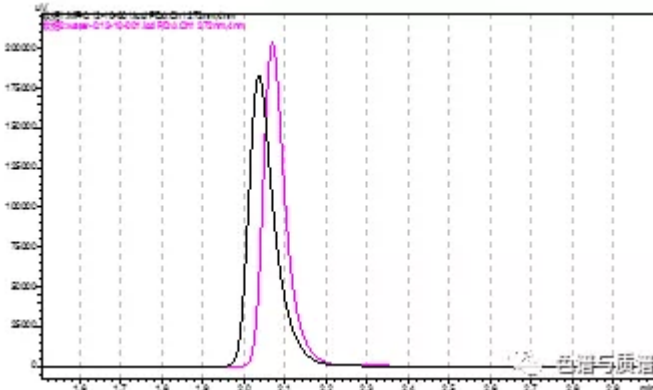
进样体积 1.0 μ l



进样体积 2.0 μ l



进样体积 5.0 μ l



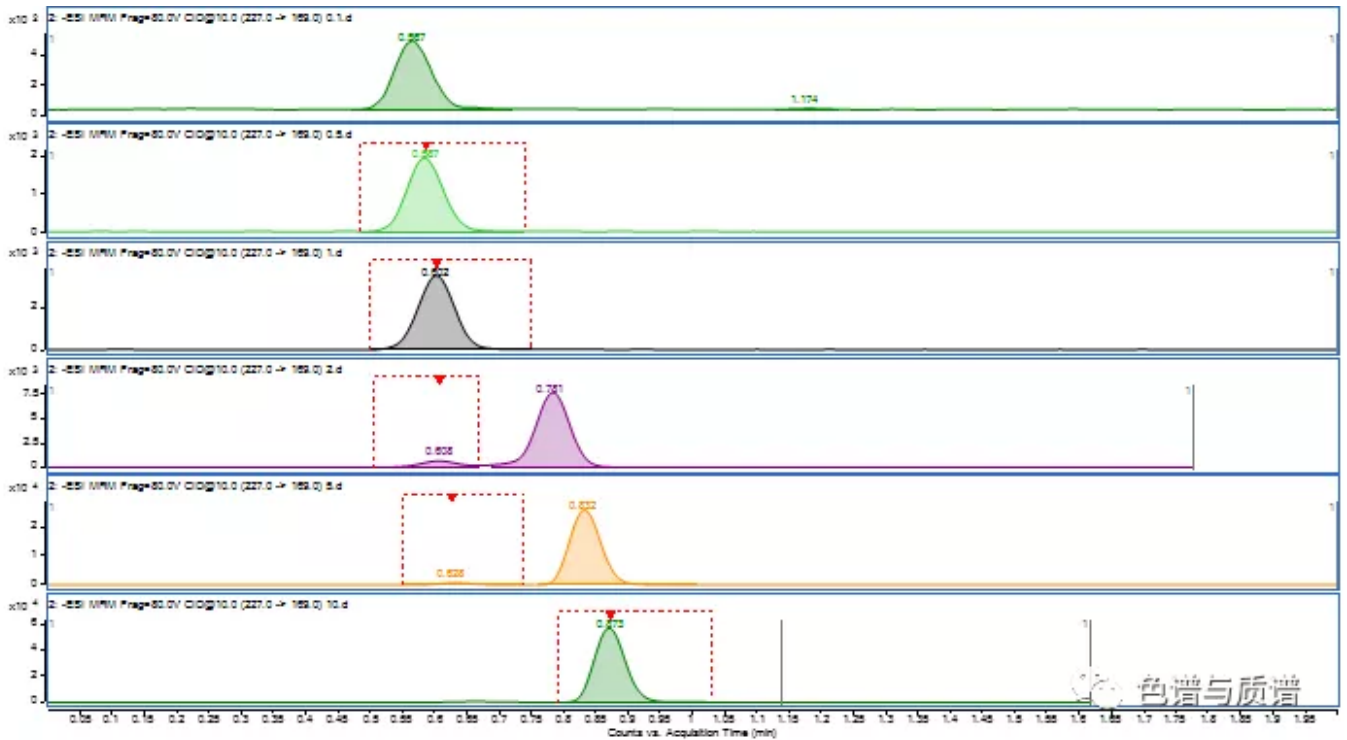
进样体积 10.0 μ l

进样体积	0.1 μ l	0.2 μ l	0.5 μ l	1.0 μ l	2.0 μ l	5.0 μ l	10.0 μ l
------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------

MF	2.031 min	2.026 min	2.023 min	2.022 min	2.028 min	2.031 min	2.036 min
	0.069 min	0.065 min	0.062 min	0.061 min	0.062 min	0.062 min	0.065 min
Water	2.035 min	2.029 min	2.027 min	2.029 min	2.032 min	2.044 min	2.069 min
	0.073 min	0.071 min	0.066 min	0.063 min	0.061 min	0.058 min	0.056 min

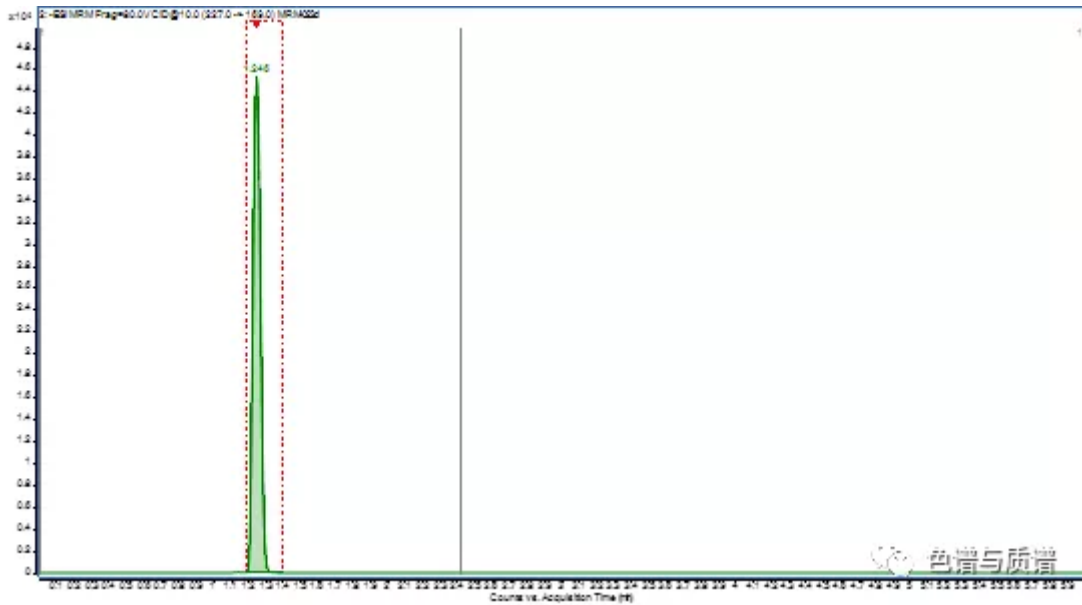
通过caffeine测试数据可以看出，流动相溶解的样品，进样体积增加后，保留时间维持稳定，半高峰宽也基本稳定。而弱洗脱溶剂溶解的样品保留时间则随进样体积增大有延后趋势，未观察到峰裂分。

下面是某水中污染物的LCMS测试情况，分析条件为，流动相：水(含极少的氨水)：乙腈 = 80：20；流速：0.3ml/min；色谱柱：2.1 mm. ID, 50 mm, 1.8 μ m, C18；样品溶剂：纯水。进样体积：由上至下依次为0.1 μ l、0.5 μ l、1.0 μ l、2.0 μ l、5.0 μ l、10 μ l。



由上图可以看出，进样体积为0.1 μ l、0.5 μ l、1.0 μ l的分析中，色谱峰未发现裂分，但保留时间随进样体积增大而延后。进样体积为1.0 μ l、5.0 μ l、10 μ l的分析中，色谱峰裂分出一小一大两个峰，其中前面的小峰靠近真实保留时间(将0.1 μ l的进样看作真实保留时间)，随进样体积增大，主峰保留时间进一步延后。这与前面关于低强度溶剂效应的机理一致。

分析者出于提高灵敏度的目的，进样10 μ l，这对于2.1mm. ID, 50 mm,的色谱柱明显体积过载了。为了得到良好峰形，将洗脱条件改为梯度洗脱，初始流动相为纯水(与样品溶剂一致，也就是纯水)。问题得到完美解决(如下图)。



6, 总结

(1) 强洗脱溶剂造成的溶剂效应主要是保留时间提前，峰裂分时，裂分峰在左。低洗脱强度溶剂造成的溶剂效应主要是保留时间延后，但延后幅度较小，即使发生裂分，前后两峰均能保持良好峰形。

(2) 改用流动相溶解样品或减小进样体积可以消除溶剂效应；低强度溶剂稀释样品或梯度洗脱也是抑制溶剂效应的好办法；柱前改用粗内径管路或进样前进行预混合可以将目标物扩散至流动相中，能够挽救峰形，如果是梯度洗脱，这甚至不影响柱效。但假如是等度洗脱，这会增大目标物的柱前展宽，危害柱效，所以这两个办法是最后的选择。