

Co-injection 用于 HPLC 分析中溶剂效应的去除应用

LC-185

摘要： Nexera LC-40 液相色谱仪，融合多种尖端技术，让 HPLC 分析进入智能化时代。本文就其中自动进样器 Co-injection 功能在消除进样分析时的溶剂效应进行介绍。

关键词： LC-40 Co-injection 溶剂效应

在液相分析实验中，溶剂的物理和化学性质影响反应平衡和反应速度的效应，称为溶剂效应。以反相色谱为例，当流动相为水 + 甲醇，样品溶剂为纯甲醇，且进样体积较大时，样品注入色谱系统后，两端靠近流动相的目标物逐渐扩散进入流动相，中心区域目标物仍溶在原溶剂中，目标物进入色谱柱后，流动相氛围中的目标物以正常速度被洗脱，溶剂氛围中的目标

物因强溶剂洗脱，移动速度快，样品在空间上开始分裂，即当样品溶剂洗脱强度明显强于流动相时，产生色谱峰前沿、拖尾、分裂、色谱柱柱效降低等现象，会影响定量结果。Nexera LC-40 液相色谱仪所提供的 Co-injection 进样功能可在液相分析实验中，消除样品溶剂效应，保证色谱分离效果，提供实验便利性和准确性。

■ 实验部分

1.1 仪器

超高效液相色谱仪 Nexera LC-40 系统。具体配置为：LC-40B X3 输液泵，SIL-40C X3 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，SCL-40 系统控制器，SPD-M40 光电二极管阵列检测器，LabSolutions Ver. 5.97 色谱工作站。



图 1 Nexera LC-40B X3 系统

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Inertsustain™ C18 (4.6 mm I.D. × 150 mm L., 5 μm)

流动相：A 相为超纯水，B 相为甲醇

流速：1.0mL/min

柱温：40°C

进样量：20 μL

波长：254 nm

洗脱程序：梯度洗脱，初始 B% 为 65。

表 1 梯度时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.01	Pumps	Pump B Conc.	65
12.00	Controller	Stop	

■ 结果与讨论

2.1 溶剂效应

对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯属于尼泊金复合酯，是一种广谱性高效食品防腐剂，应用范围广泛。由于尼泊金复合酯较难溶于水，所以通常是先将它们溶于有机溶剂中，然后分析。

在进行上述尼泊金复合酯实验时，发现四个化合物色谱峰发生明显峰前沿现象，拖尾因子均已小于 1.0，严重影响峰型，进而影响实验定量结果准确性，出现了色谱分析中典型的溶剂效应现象。

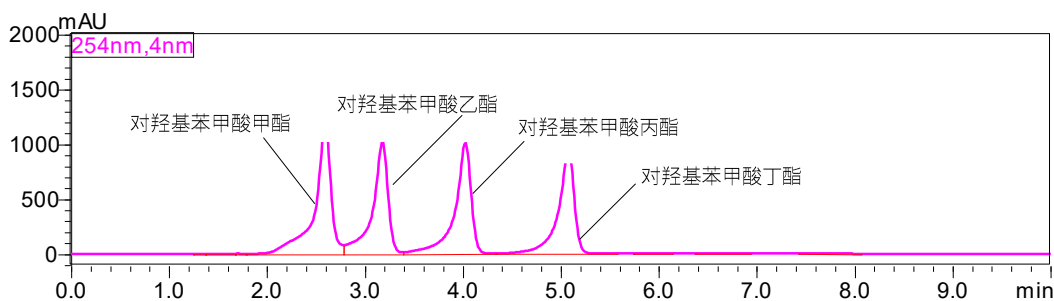


图 2 典型的溶剂效应色谱图

色谱分析中溶剂效应发生的原因，以反相色谱为例，一般认为是样品溶剂强度明显强于流动相强度时，而造成色谱峰前沿等展宽现象。溶剂效应消除的办法，有 1) 使用初始流动相比比例作为样品溶剂；2) 使用弱洗脱强度的溶剂稀释样品；3) 减少进样体积等手段。但相应存在一些问题，如在方法开发过程中，无法得到明确的初始流动相比比例；使用弱洗脱强度溶剂稀释样品，有时无法保证样品溶解性；减少进样量自然就降低灵敏度。面对以上问题，以下介绍一种使用自动进样器进样前自动稀释功能实现溶剂效应消除的方法，称为 Co-injection。

2.2 Co-injection

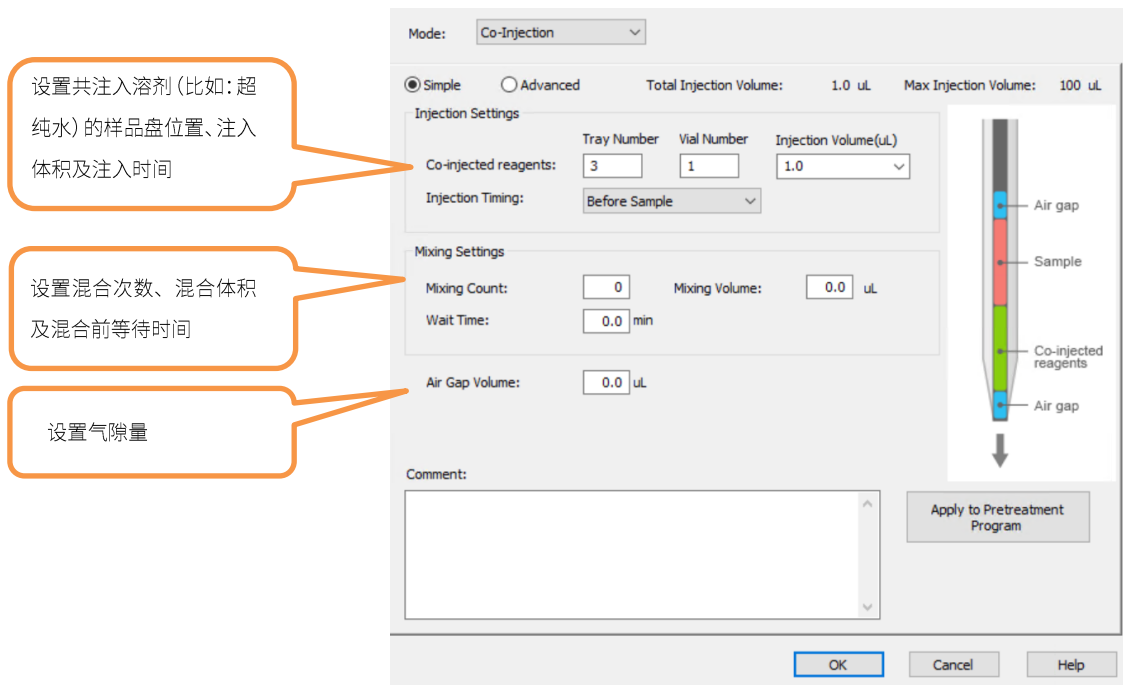


图 3 Co-Injection 功能示意图

针对上述四种对羟基苯甲酸酯类化合物分析中出现的溶剂效应现象，采用 Co-injection 功能进样分析。以下对 Co-Injection 功能中的共进样溶剂体积进行考察，探究其对溶剂效应的影响。

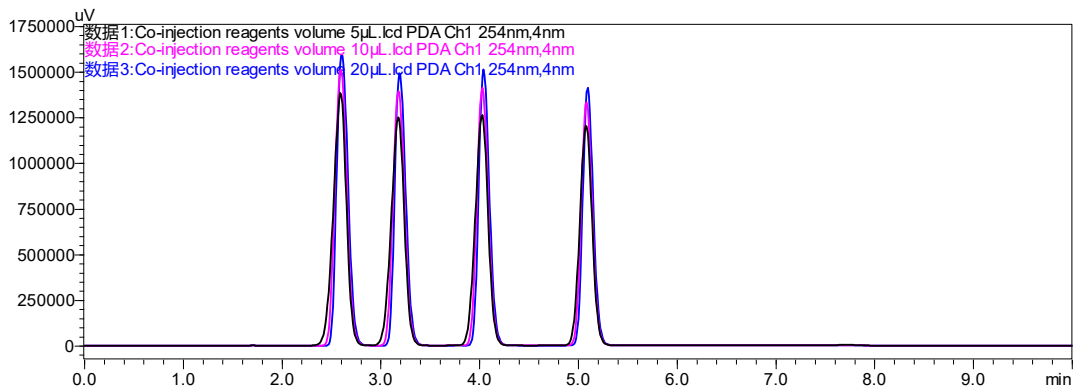


图 4. Co-injection 共进样溶剂体积优化色谱图

从表 2 可以看出，不同 Co-injection 溶剂体积对样品溶剂效应具有一定影响。保留时间和峰面积会随着 Co-injection 溶剂体积的变化而变化，但不显著，充分保证了样品的定性和定量能力；分离度随着 Co-injection 溶剂体积的增加而变大，表明样品色谱峰分离效果变好；拖尾因子也随着 Co-injection 溶剂体积的增加而变大，从图 5 中可以看出，Co-injection 模式下的色谱峰较之未进行 Co-injection 模式下的色谱峰，峰型尖锐、匀称，无峰前沿现象，明显消除溶剂效应。在此实验中，Co-injection 溶剂体积为 10 μ L 时，拖尾因子较接近于 1.0，表明色谱峰较匀称，接近正态分布，故选择 10 μ L 的 Co-injection 溶剂体积进行重复性实验。

表 2 不同共进样溶剂体积对分离结果的影响

对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯				对羟基苯甲酸甲酯				
RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.	RT	Area	Res.	Tail.	
5 μ L	2.60	12937942	N/A	0.91	3.18	11668417	2.23	0.93	4.03	11572538	3.26	0.96	5.08	10551416	4.17	0.99
10 μ L	2.60	12919572	N/A	1.06	3.18	11652615	2.46	1.07	4.03	11558558	3.63	1.08	5.08	10546697	4.62	1.09
20 μ L	2.61	12902212	N/A	1.17	3.19	11633100	2.61	1.17	4.04	11531310	3.87	1.15	5.09	10524937	4.87	1.13

注：RT 表示保留时间 (min)，Area 表示峰面积，Res. 表示分离度，Tail. 表示拖尾因子。

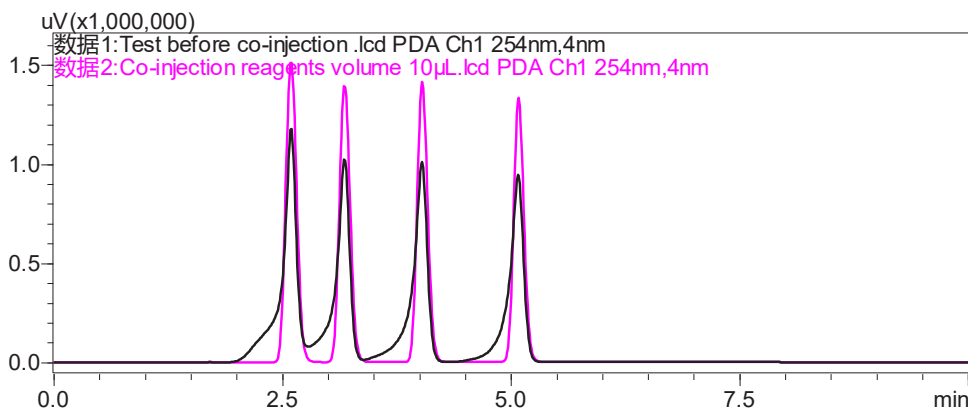


图 5 Co-injection 共进样前后色谱图对比图

2.3 重复性

在 Co-injection 共进样溶剂体积为 10 μ L 时的分析条件下进行重复测定 6 次，进行重复性考察。

从表 3 中可以看出，Co-injection 模式下 6 针连续进样条件下，各个化合物保留时间和峰面积的 RSD% 均小于 0.1%，表明 Nexera LC-40 液相色谱仪在 Co-injection 进样模式下，能够明显消除溶剂效应，且仪器稳定可靠、重复性良好。

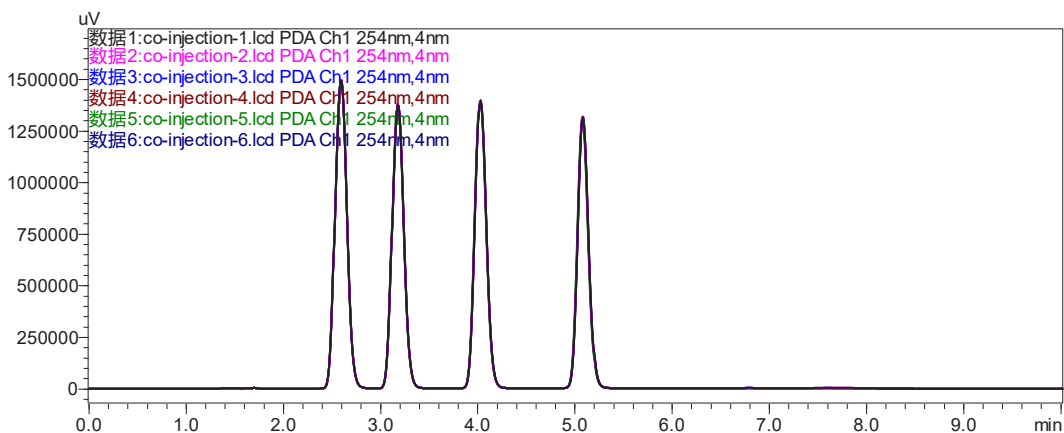


图 6 Co-injection 模式进样分析时保留时间和峰面积 (n=6) 重复性结果

表 3 重复性结果

	对羟基苯甲酸甲酯		对羟基苯甲酸乙酯		对羟基苯甲酸丙酯		对羟基苯甲酸丁酯	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area
Injection-1	2.597	12865808	3.182	11603398	4.032	11500452	5.086	10499547
Injection-2	2.597	12874155	3.182	11609120	4.031	11510229	5.085	10507809
Injection-3	2.597	12864378	3.183	11600888	4.032	11503641	5.086	10498763
Injection-4	2.596	12865977	3.182	11600413	4.031	11500034	5.085	10494479
Injection-5	2.596	12858989	3.18	11597275	4.028	11496792	5.081	10492201
Injection-6	2.596	12851041	3.181	11590686	4.030	11493240	5.083	10487131
Average	2.596	12863391	3.182	11600297	4.030	11,500731	5.084	10496655
RSD%	0.02	0.06	0.03	0.05	0.03	0.05	0.04	0.07

结论

针对 HPLC 分析中常见的溶剂效应现象，本实验以四种对羟基苯甲酸酯类化合物分析为例，在 Nexera LC-40 液相色谱仪上采用 Co-injection 进样功能，明显消除了溶剂效应。同时，重复性实验结果显示，连续 6 针进样分析，四种化合物的保留时间和峰面积 RSD% 均小于 0.1%，表明仪器稳定可靠、重复性良好。Nexera LC-40 液相色谱仪，融合多种尖端技术，为实验工作者提供了可靠的、智能的分析模式，并保障了数据可靠性、实验简便性。