

梯度洗脱

朱彭龄

(兰州大学 化学系, 甘肃 兰州 730000)

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2010)01-0056-04

柱液相色谱有等度(isocratic)和梯度(gradient)2种洗脱方式.等度洗脱时,流动相的组成在色谱分离过程中保持不变;梯度洗脱是控制流动相的组成,使其在色谱分离过程中发生连续的变化.现在,很多HPLC实验室的仪器都有梯度洗脱的功能,为了充分利用仪器的这种功能,本文将讨论以下3个问题:一是为什么要使用梯度洗脱;二是如何对梯度洗脱程序进行优化;三是使用梯度洗脱时常见的问题.

1 为什么要使用梯度洗脱

一个复杂的试样,所含组分的保留性质可能强弱不一,有很宽的变化范围.在此情况下,若以低强度的流动相进行等度洗脱,弱保留组分的容量因子 k 能处于2~5合适的范围内,在较短的时间以较大的分辨率彼此分离;然而,强保留组分有较大的 k 值,保留时间长,峰变宽,甚至不易被检测.若用高强度的流动相等度洗脱,弱保留组分 k 值过小,不能获得满意的分离.这样的问题可以用梯度洗脱来解决.洗脱从较弱的溶剂开始,致使弱保留溶质之间有足够的分辨率.流动相的强度在色谱过程中逐渐增加,于是强保留溶质也同样以合理的保留时间从色谱柱上洗脱下来,并被检测.这是通常使用梯度洗脱的原因.

当以反相色谱分离多肽、蛋白质时,这些高分子量物质的容量因子 k 以很大的斜率随流动相组成发生变化.这意味着,溶质保留时间对流动相组成的变化十分敏感,用等度洗脱不能得到重现性的结果.因此,必须采用梯度洗脱分离这些高分子量物质.

如果试样中含有能牢固地保留在固定相上的杂

质,以等度洗脱分离,这些杂质就滞留在色谱柱上,使柱效率降低,或者干扰随后的色谱分离.梯度洗脱可以在梯度程序结束之前用高强度流动相从柱上清除这些杂质,使色谱柱处于同样的状态开始下一次进样.因此,梯度洗脱即有利于色谱柱的保护又提高了色谱分析的重现性.此外,借助梯度洗脱清洗色谱柱的功能,有时可以省去对试样的预处理.

2 如何对梯度洗脱程序进行优化

梯度洗脱最一般的形式是流动相组成随时间呈线性的变化,即所谓的线性梯度.以下将基于反相色谱,主要讨论线性梯度,介绍该梯度方法的建立和实践.在讨论中,弱溶剂水相称作A,强溶剂有机相称作B.

当色谱体系选定后,2个相邻峰的分辨率主要由容量因子来决定.在等度洗脱情况下,简单地通过改变溶剂强度(A和B的比例)调节容量因子 k ,对分离条件进行优化.在梯度洗脱时,和等度洗脱容量因子 k 相当的是梯度容量因子 k^* ,其定义为:溶质沿色谱柱迁移至柱长1/2时的瞬时容量因子.

在线性梯度洗脱进行反相分离时, k^* 与梯度条件参数有如下关系:

$$k^* = \frac{t_g F}{V_m (\%B) S} \quad (1)$$

其中 t_g 梯度时间(min); F 流速(mL/min); V_m 柱滞留体积(mL); $\%B$ 流动相中B的体积百分数, $\%B$ 为线性梯度过程中 $\%B$ 的变化,等于梯度起始和终止点 $\%B$ 之差; S 是常数,与溶质分子量大小有关,分子量小于500小分子的 S 值在3~5之

收稿日期:2009-12-16; 修订日期:2010-01-18

作者简介:朱彭龄(1939-),男,教授,博士生导师,研究领域,液相色谱. E-mail: zhupl@lzu.edu.cn

间. % B 随时间变化的速率叫做梯度陡度:

$$\text{梯度陡度} = \frac{\%B}{t_g} \quad (2)$$

在这些参数中, S 为溶质分子所决定, V_m 是色谱柱的参数, F 通常在 $1 \sim 2 \text{ mL/min}$ 范围附近. 因此, 改变陡度, 即改变 %B 或 t_g , 是调节 k^* 最方便的途径. 陡度在梯度洗脱中的作用类似于等度洗脱中的流动相强度.

从上述关于梯度容量因子的讨论, 可以得到以下推论, 为优化梯度程序提供参考:

(1) k^* 随陡度的减小而增加. 当 k^* 增大时, 通常得到与等度洗脱 k 值增加类似的结果, 即: 分辨率提高和分析时间增长.

(2) 保持 %B 不变, 增长梯度时间 t_g 有利于分辨率的提高.

(3) %B 与 t_g 同时变化, 而陡度却保持恒定时间, 分辨率不发生明显的变化.

(4) 提高梯度起始点的溶剂强度 (%B 减小), 同时减小 t_g 使陡度保持不变, 其结果是分辨率基本不变, 但缩短了色谱分离时间.

(5) 因为溶质之间 S 值存在有差异, 由陡度引起 k^* 变化的同时也可能发生峰之间相对位置 (选择性) 的变化.

优化梯度程序目的是在尽可能短的时间内使相邻峰之间达到基线分离. 优化可以借助优化软件 (例如 DryLab, LC Resources, USA) 来完成. 如果没有优化软件, 采用尝试法同样能优化梯度程序, 步骤如下:

(1) 首先进行初步实验. 在选用的色谱柱 ($15 \times 0.46 \text{ cm}$ 或 $25 \times 0.46 \text{ cm}$)、流量 ($1 \sim 2 \text{ mL/min}$) 条件下, $5\% \sim 80\% \text{ B}$ 的范围内 (当水相是纯水不含缓冲剂时, 可在 $5\% \sim 100\% \text{ B}$ 范围内变化), 大约 50 min 的时间内进行梯度洗脱, 得到初步实验的色谱图 (图 1).

根据获得的色谱图, 同时调整 %B 和 t_g 保持陡度不变, 以减少色谱图中的空白部分. 在图 1 中给出的例子中, 大约在 30 min 之后, 再没有色谱峰出现. 将 %B 调整为 $5\% \sim 60\% \text{ B}$, 同时 t_g 减少为 30 min , 消除色谱图的空白部分, 使梯度洗脱时间缩短 40% . 当空白部分出现在某个时间之前时, 可提高溶剂 B 的起始浓度, 同时按比例减少 t_g , 保持陡度不变.

(2) 用上一步选定的流动相变化范围 %B, 将梯度时间缩短为 $1/3$, 完成另一次梯度洗脱初步

实验. 由于陡度的增加, k^* 、洗脱时间和分辨率都相应减小. 对比 2 个不同陡度条件下得到的谱图, 首先观察有哪些色谱峰对不能达到基线分离; 其次观察不同的陡度是否对这些色谱峰的分辨率产生影响; 最后在达到基线分离的前提下, 是否可以借助加大陡度进一步减少梯度洗脱的时间.

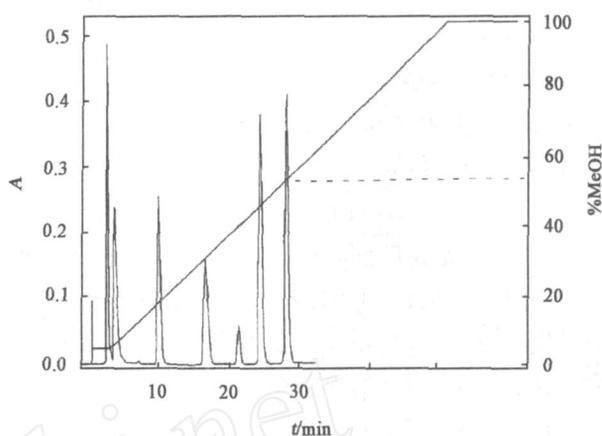


图 1 从 5% 至 100% B 梯度洗脱得到的色谱图

Fig 1 Chromatogram obtained with $5\% \sim 100\% \text{ B}$ in 50 min linear gradient elution

(3) 在试样比较简单的情况下, 根据从上一步得到的提示, 可能通过尝试改变 t_g 或 %B, 就能够达到在尽可能短的时间内相邻的色谱峰以足够高的分辨率 ($R_s > 1.5$) 实现色谱分离.

(4) 分析复杂试样时, 仅仅一次改变 t_g 或 %B, 可能还难以使所有相邻峰都达到基线分离. 在改变梯度陡度时, 提高了一个色谱峰对分辨率的同时, 却可能降低了另一色谱峰对的分辨率. 这时可以改变梯度的形状, 在一个梯度程序中由几个不同陡度的部分所组成, 每个陡度是对在该梯度部分出现的色谱峰优化的结果. 从 2 个初步实验得到的启示, 按出峰顺序依次调整局部梯度的陡度 (通过改变 t_g 或 %B), 优化的结果代表对所有色谱峰分离条件的一个折衷选择.

图 2 是 2, 4 - 二硝基氟苯 - 氨基酸衍生物 (DNFB - AA) 的色谱分离, 出峰顺序为: 精、丝、天冬、谷、苏、甘、丙、脯、组、蛋、缬、色、苯丙、异亮 + 亮、赖、酪. 优化过程按上述步骤进行, 经优化的梯度程序由 4 个不同陡度的部分所组成. 请注意, 在梯度程序的开始, B 溶剂的起始浓度和梯度的陡度都低, 溶质峰的分布很分散, 否则苏氨酸和甘氨酸与相邻的峰就不能实现基线分离.

3 梯度洗脱中常见的问题

3.1 平衡时间

梯度洗脱运行结束,流动相就返回到梯度开始时的组成.如果在这时刻立即开始下一个梯度洗脱,有 2 个原因使色谱柱入口处流动相组成的变化呈现滞后:滞后体积的存在(滞后体积是从流动相混合点至色谱柱进口处的体积).即使不考虑滞后体积,流动相和固定相之间的平衡也不能瞬时达到.因此,在 2 次梯度洗脱之间必须设置平衡时间,置换前次梯度运行残留在系统中的流动相. 15×0.46 cm 色谱柱(或 25×0.46 cm 色谱柱)和 $1 \sim 2$ mL/min 流量的情况下,平衡时间一般为 $5 \sim 10$ min,使平衡时间内通过系统的流动相体积大于滞后体积.下一次的梯度运行开始时,尽管固定相和流动相之间尚未完全达到平衡,只要每次运行的起始状态相同,色谱峰保留时间的 RSD 可保持在 0.5% 以内.为了使第一次梯度洗脱也处于相同的初始状态,可在第一次进样之前运行空白梯度(运行梯度程序,但不进样).

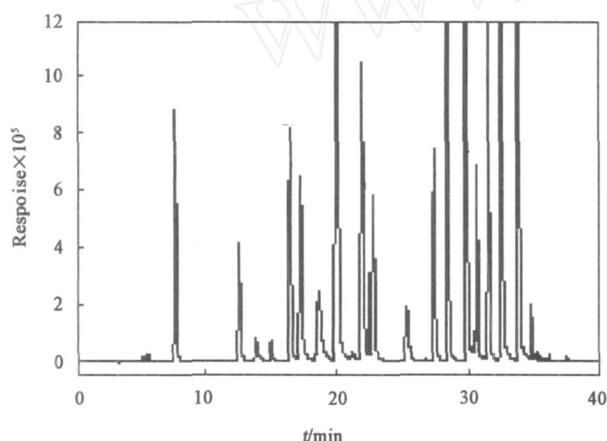


图 2 DNFB-AA 梯度洗脱色谱分离

Fig 2 Gradient separation of DNFB-AA

色谱条件:分析柱, Kromasil C_{18} , $5 \mu\text{m}$, 250×4.6 mm; 流动相: A, 36 mmol/L TEAP (pH 2.75) / B, 乙腈; 流速: 1 mL/min; 梯度: 22/40/65/90/90 B% at 0/20/30/35/40 min; 平衡时间: 10 min; 检测器: UV, 360 nm; 温度: 35°C; 进样体积: 20 μL .

Column: Kromasil C_{18} , $5 \mu\text{m}$, 250×4.6 mm; mobile phase: A, 36 mmol/L TEAP (pH 2.75) / B, ACN; flow rate: 1 mL/min; gradient: 22/40/65/90/90 B% at 0/20/30/35/40 min; equilibrium time: 10 min; detection: UV, 360 nm; temperature: 35°C; injection volume: 20 μL .

对于带有自动进样器的色谱系统,通过适当的设置梯度洗脱、系统平衡、进样等一系列步骤均可自动完成.如果是手动进样,在平衡时间后准时进样,仍然可以达到和自动进样时相同的精密密度.

3.2 空白梯度

与等度洗脱的情况不同,空白梯度得到的色谱图有基线漂移和杂质峰的问题.基线漂移是由 A 和 B 溶剂折射率和光吸收性质的差异所引起,是普遍存在的;杂质峰是来自溶剂.在梯度开始时,由于流动相的强度低,溶剂中的一些杂质保留在色谱柱上.在梯度过程中,流动相强度逐渐增加,这些杂质就被洗脱下来.若杂质峰与待测组分峰重叠,则产生干扰.

使用 UV 检测器时,如果分析物在长波长有较高的吸光度,可以在长波长下进行检测以减小基线漂移.用离子对色谱反相分离蛋白质时,在水(溶剂 A)和乙腈(溶剂 B)中都加入 0.1% 三氟乙酸,使溶剂 A 和 B 的光学性质接近,控制基线漂移.用手工积分测量峰面积,也可以减少基线漂移的影响.

为了克服杂质峰的干扰,可以试用不同的色谱柱.不同品牌的 C_8 或 C_{18} 反相柱有不同的选择性,可能使杂质峰和分析物峰的相对位置发生变化.有时甚至可以在氰基柱上进行反相分离,使选择性的变化更为显著.在反相梯度洗脱中,市售的 HPLC 级有机溶剂纯度较高,杂质主要来自水相,包括溶剂水和添加剂.水相和有机相混合前,可以用反相固相萃取柱离线处理,或者用一个装有反相填料 5×0.46 cm 色谱柱和六通阀在线净化^[1],除去水相的杂质.

3.3 脱气

高压梯度系统的混合器入口与两个输液泵的出口相连,在高压下实现溶剂 A 和 B 的混合,对于水相脱气的要求并不严格.经过抽真空过滤的水相不再需要进一步脱气.

3.4 流动相预混合

梯度洗脱时流动相组成可在 0% ~ 100% B 的范围内变化.一个在线混合 HPLC 体系,流速和流动相混合出现问题都可以引起保留时间的变化.当梯度从很低的 %B 开始或梯度陡度较小时,输液泵的精度对梯度的重现性就有较大的影响.例如,以 1 mL/min 的流速梯度洗脱由 2% B 起始,此时泵 B 的输流量仅为 20 L/min,在如此低的流量下很难保持高的重现性.克服这类问题一个简单的办法是预混合流动相^[2].其结果是每个输液泵都在足够高的流

量下工作,并且增大了梯度陡度.

以一个分析分子量大约为 1 000 Da 合成肽的试样为例. 经优化后,洗脱条件为: 0.1% 三氟乙酸水溶液为溶剂 A, 0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液为溶剂 B, 在 1.5 mL/min 的流速下, 30 min 内 19% ~ 24% B 的线性梯度. 因为梯度陡度只有 5% B / 30 min, 在此情况下, 连续进样时保留时间的重现性不能达到低于 0.25 min. 如果预混合溶剂, 以 10/90 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸水溶液为溶剂 A, 30/70 乙腈 / 0.1% 三氟乙酸水溶液为溶剂 B, 则相当的梯度约为在 30 min 内 44% ~ 65% B 的变化. 由于梯度陡度的增加, 梯度较少受仪器硬件的制约, 保证了保留时间的重现性.

3.5 梯度洗脱方法的复制

应用已经建立的梯度分离方法, 得到了不同的色谱分离结果, 其原因可能是使用了不同品牌的色谱柱, 色谱分离条件不相同, 或者使用了不同厂家和型号的仪器. 这里只讨论色谱仪滞后体积 VD 对梯度分离结果的影响.

为了使建立的方法能用于带有不同滞后体积 VD 的 HPLC 系统, 一个普遍适用的解决办法是所谓的“最大滞后体积法”^[3]. 假设现仍在使用的色谱仪最大滞后体积是 4.5 mL, 用来建立方法所使用仪器的 VD 是 0.5 mL^[4], 则在梯度程序的开始保持一个 4.0 mL 的等度洗脱部分, 使有效的 VD 成为 4.5

mL. 设置等度洗脱的意图要反映在分析方法的文件中. 在方法复制时, 分析人员可根据当时使用仪器 VD 的实际情况, 调整等度洗脱部分的体积, 消除 VD 差异所产生的影响.

在不知道滞后体积情况下使用已有的梯度洗脱方法, 可能在梯度的初始部分给出不同的分离结果. 为了在当前使用的仪器上完成复制, 首先用尝试法, 通过改变 t_r 或 % B, 调整梯度程序的起始部分, 使分离结果的初始部分和被复制的分析方法一致. 下一步仍然通过改变 t_r 或 % B, 保持程序其余部分的陡度不变, 使整个梯度分离给出和原方法一致的结果.

参考文献:

- [1] Zhu P L, Snyder L R, Dolan J W. Improved baselines in gradient elution. *J Chromatogr A*, 1995, 718: 429 - 435.
- [2] Marchand D H, Zhu P L, Dolan J W. LC troubleshooting. *LC · GC*, 1996, 14: 1 028 - 1 033.
- [3] Snyder L R, Dolan J W. *High - performance gradient elution*. Hoboken New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2007: 165.
- [4] 朱彭龄. 高效液相色谱仪性能的检验. *分析测试技术与仪器*, 2009, 15(3): 197 - 198.