

## 梯度液相色谱保留时间公式在梯形梯度洗脱研究中的应用

孙小丽<sup>1</sup>, 郝卫强<sup>2\*</sup>, 王俊德<sup>3</sup>, 狄斌<sup>4</sup>, 陈强<sup>2</sup>,  
庄韦<sup>2</sup>, 俞强<sup>1</sup>, 张培培<sup>1</sup>

(1. 常州大学材料科学与工程学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州南京大学高新技术研究院, 江苏 常州 213164;  
3. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 4. 中国药科大学药物分析教研室, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 根据前期得到的梯度液相色谱保留时间计算公式,在不指定溶剂强度模型形式的前提下,探讨了梯形梯度洗脱的一些特点。对于溶质在梯形梯度坡度上流出时的情形,推导得到溶质流出色谱柱所对应的流动相组成( $\varphi_R$ )随梯度斜率( $B$ )变化的表达式。该公式表明,在该情形中 $\varphi_R$ 将会随着 $B$ 值的增加而增加。对于溶质在梯形梯度最后一个等度区间流出时的情形,如果初始和终止流动相组成保持不变而仅有梯度的斜率发生变化时,从理论上证明了溶质保留时间( $t_R$ )与梯度斜率的倒数( $1/B$ )之间呈线性关系。实验中以C18色谱柱为固定相,甲醇-水为流动相,联苯为样品,测定了不同流动相组成以及梯形梯度条件下的保留时间,所得到的实验值与理论值吻合,从而验证了理论方法的正确性。

**关键词:** 液相色谱; 梯度洗脱; 梯形梯度; 保留值

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)08-0753-05

## Application of general retention time formula for gradient liquid chromatography in the studies of ladder-like gradient elution

SUN Xiaoli<sup>1</sup>, HAO Weiqiang<sup>2\*</sup>, WANG Junde<sup>3</sup>, DI Bin<sup>4</sup>, CHEN Qiang<sup>2</sup>,  
ZHUANG Wei<sup>2</sup>, YU Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Peipei<sup>1</sup>

(1. School of Materials Science and Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China;  
2. Changzhou High-Tech Research Institute of Nanjing University, Changzhou 213164, China;  
3. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;  
4. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** By not explicitly specifying the type of solvent strength model, the features of ladder-like gradient elution were studied based on the general retention time formula that was derived in our previous work. For the case where the solute is eluted at the slope of the ladder-like gradient, we derived the expression that connects the mobile phase composition ( $\varphi_R$ ), at which the solute is eluted from the column, with the gradient slope ( $B$ ). It was shown that  $\varphi_R$  will increase with the increase of  $B$  in this case. For the case where the solute is eluted at the last isocratic segment of the ladder-like gradient, it was proven that the retention time ( $t_R$ ) will correlate linearly with the reciprocal of the gradient slope ( $1/B$ ) when the initial and final mobile phase compositions are set to be constant. In experiments, by taking biphenyl as the sample, the values of retention time in isocratic and gradient elution were measured on a C18 column by using a mixture of methanol and water as the mobile phase. The experimental values were found to be well consistent with the theoretical values that were calculated from the expressions. These expressions will be helpful to understand the features of the ladder-like gradient in practice.

**Key words:** liquid chromatography; gradient elution; ladder-like gradient; retention factor

\* 通讯联系人. E-mail: hao\_w\_q@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金项目(21005009, 81173022); 常州市应用基础研究计划(CJ20115002).

收稿日期: 2013-01-08

梯度洗脱是液相色谱的一种基本操作模式,在复杂样品如中药和蛋白等的分离中有着非常广泛的应用<sup>[1-5]</sup>。在梯度洗脱中,流动相的洗脱强度将会随着流动相组成的改变而发生变化,这就使得溶质的保留因子( $k$ )是流动相组成(表示为强洗脱溶剂在流动相中的体积分数, $\varphi$ )的函数。在许多反相液相色谱的实验中, $k$ 与 $\varphi$ 的关系符合线性溶剂强度(linear solvent strength, LSS)模型<sup>[6,7]</sup>,即

$$\ln k = \ln k_0 - S\varphi \quad (1)$$

其中  $k_0$  是溶质在 100% 弱洗脱溶剂中的保留因子,  $S$  是与溶剂洗脱强度相关的参数。而在另一些色谱模式如离子交换液相色谱中,  $\ln k-\varphi$  曲线则会表现出非线性的特点<sup>[8,9]</sup>。与等度洗脱相比,梯度洗脱分离机理往往会更为复杂<sup>[10]</sup>。

梯形梯度是梯度洗脱的一种重要操作模式,其梯度曲线见图 1,其中  $t$  为时间, $\Phi(t)$  为在输液系统中设定的流动相组成随时间变化的梯度程序。当  $t_{P,1}=0$  时,梯形梯度可转化为单线性梯度;而当  $t_{P,1}=t_{P,2}$  时,梯形梯度则转化为单阶梯梯度。由此可见,单线性和单阶梯梯度均可看作梯形梯度的特例,这就使得梯形梯度在梯度液相色谱的研究中有着重要的理论与应用价值。在前期的工作中,作者基于理想色谱模型推导得到适合任意形式的溶剂强度模型以及梯度曲线形状的保留时间计算公式<sup>[11-13]</sup>。本文则是在该工作的基础上,在不指定溶剂强度模型数学形式的前提下,对梯形梯度洗脱的特点展开研究,从而为其在实践中的应用从理论上提供指导。

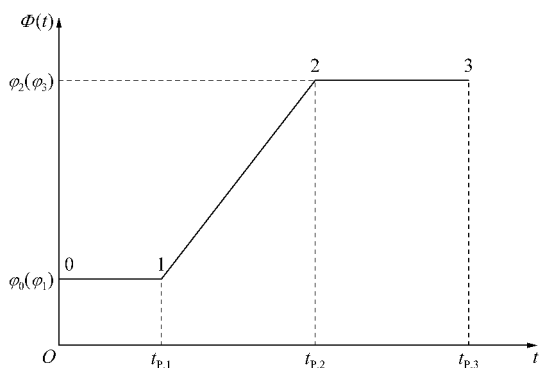


图 1 梯形梯度  
Fig. 1 Ladder-like gradient

## 1 理论部分

### 1.1 溶质在梯形梯度坡度上流出时的情形

在前期的工作中,我们得到适用于任意形式的溶剂强度模型和梯度曲线形状的梯度液相色谱保留

时间公式<sup>[11]</sup>

$$\frac{t_D}{k(\varphi_0)} + \int_0^{t_R - t_0 - t_D} \frac{d\xi}{k[\Phi(\xi)]} = t_0 \quad (2)$$

其中  $t_D$  为梯度延迟时间,即流动相通过连接混合器和色谱柱的管线到达色谱柱入口端所需要的时间<sup>[14]</sup>;  $t_0$  为死时间; $\varphi_0$  为初始流动相组成; $k(\varphi)$  为流动相组成为  $\varphi$  时的保留因子; $\xi$  为积分变量。

在梯形梯度(图 1)中,流动相组成随时间变化的表达式为

$$\Phi(t) = \begin{cases} \varphi_0 & t \leq t_{P,1} \\ \varphi_0 + B(t - t_{P,1}) & t_{P,1} < t \leq t_{P,2} \\ \varphi_2 & t > t_{P,2} \end{cases} \quad (3)$$

其中  $B$  为梯度的斜率。当溶质在坡度上流出时(即  $t_R - t_0 - t_D \in (t_{P,1}, t_{P,2})$ ), (2)式可写为

$$\frac{t_D}{k(\varphi_0)} + \int_0^{t_{P,1}} \frac{d\xi}{k(\varphi_0)} + \int_{t_{P,1}}^{t_R - t_0 - t_D} \frac{d[\Phi(\xi) - \varphi_0]/B + t_{P,1}}{k[\Phi(\xi)]} = t_0 \quad (4)$$

上式经化简可得

$$\frac{t_D + t_{P,1}}{k(\varphi_0)} + \frac{1}{B} \int_{\varphi_0}^{\varphi_R} \frac{d\varphi}{k(\varphi)} = t_0 \quad (5)$$

其中  $\varphi$  为积分变量; $\varphi_R$  为溶质流出色谱柱所对应的流动相组成,即

$$\varphi_R = \varphi_0 + B(t_R - t_0 - t_D - t_{P,1}) \quad (6)$$

定义函数

$$F(\varphi_R, B) = \frac{t_D + t_{P,1}}{k(\varphi_0)} + \frac{1}{B} \int_{\varphi_0}^{\varphi_R} \frac{d\varphi}{k(\varphi)} - t_0 = 0 \quad (7)$$

应用隐函数求导法则<sup>[15]</sup>并根据(5)式可得

$$\frac{d\varphi_R}{dB} = - \frac{\partial F / \partial B}{\partial F / \partial \varphi_R} = \frac{\int_{\varphi_0}^{\varphi_R} \frac{d\varphi}{k(\varphi)} / B^2}{1 / [Bk(\varphi_R)]} = \frac{[t_0 - \frac{t_D + t_{P,1}}{k(\varphi_0)}] / B}{1 / [Bk(\varphi_R)]} = k(\varphi_R) [t_0 - \frac{t_D + t_{P,1}}{k(\varphi_0)}] \quad (8a)$$

或者

$$\frac{d\varphi_R}{dB} = \frac{k(\varphi_R)}{k(\varphi_0)} [t_0 k(\varphi_0) - (t_D + t_{P,1})] = \frac{k(\varphi_R)}{k(\varphi_0)} [t_{R0} - (t_D + t_{P,1} + t_0)] \quad (8b)$$

其中  $t_{R0}$  为溶质在初始流动相组成( $\varphi_0$ )中的保留时间。(8)式揭示了当溶质在梯形梯度坡度上流出时所对应的流动相组成( $\varphi_R$ )与梯度斜率之间的关系。

1.2 溶质在梯形梯度最后一个等度区间内流出时的情形

在该情形中,  $t_R - t_0 - t_D > t_{P,2}$ , (2)式可写为

$$\frac{t_D}{k(\varphi_0)} + \int_0^{t_{P,1}} \frac{d\xi}{k(\varphi_0)} + \int_{t_{P,1}}^{t_{P,2}} \frac{d[(\Phi(\xi) - \varphi_0)/B + t_{P,1}]}{k[\Phi(\xi)]} + \int_{t_{P,2}}^{t_R - t_0 - t_D} \frac{d\xi}{k(\varphi_2)} = t_0 \quad (9)$$

经化简可得

$$\frac{t_D + t_{P,1}}{k(\varphi_0)} + \frac{1}{B} \int_{\varphi_0}^{\varphi_2} \frac{d\varphi}{k(\varphi)} + \frac{t_R - t_0 - t_D - t_{P,2}}{k(\varphi_2)} = t_0 \quad (10)$$

根据图 1 有

$$t_{P,2} = t_{P,1} + \frac{\varphi_2 - \varphi_0}{B} \quad (11)$$

将(11)式代入(10)式,经过整理可得

$$t_R = \frac{a}{B} + b \quad (12)$$

其中

$$a = \varphi_2 - \varphi_0 - k(\varphi_2) \int_{\varphi_0}^{\varphi_2} \frac{d\varphi}{k(\varphi)} \quad (13)$$

$$b = (t_D + t_{P,1}) \left[ 1 - \frac{k(\varphi_2)}{k(\varphi_0)} \right] + t_0 [1 + k(\varphi_2)] \quad (14)$$

当  $\varphi_0$  和  $\varphi_2$  保持不变而仅改变梯度的斜率时,由(13)和(14)式可知斜率  $a$  和截距  $b$  均为常数。因此,在该情形中由(12)式可知保留时间将与梯度斜率的倒数呈线性关系。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

日本岛津(Shimadzu) Prominence 液相色谱系统,包括两个 LC-20AT 输液泵,一个 SIL-20A 自动进样器,一个 SPD-20A 紫外检测器,一个 CTO-20AC 柱温箱,以及 LabSolutions 色谱工作站等。

联苯(纯度 99%)和尿嘧啶(纯度 99%)均购自常州润友商贸公司。Ultimate XB C18 色谱柱购自月旭材料科技(上海)有限公司。甲醇为色谱纯。实验用水为超纯水。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB C18 柱, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm。流动相: 甲醇和水的混合液。柱温为 35 °C; 流速为 1.0 mL/min; 波长为 254 nm; 进样量为 5 μL。

### 2.3 实验步骤

样品溶液的配制: 取尿嘧啶和联苯适量, 用 60% 甲醇水溶液配成质量浓度均为 20 mg/L 的溶液。

死时间的测定<sup>[16]</sup>: 以甲醇为流动相, 测定尿嘧啶在色谱柱上的保留时间。然后用一个二通管替换色谱柱, 测定尿嘧啶在通过进样阀到检测器之间管路所经历的时间( $t_{tub}$ )。从尿嘧啶的保留时间中扣除  $t_{tub}$  即得  $t_0$ , 实验值为 1.649 min。

梯度延迟时间的测定<sup>[17]</sup>: 用二通管替换色谱柱。将水置于 A 贮液瓶中, 甲醇置于 B 贮液瓶中, 检测波长设为 205 nm。以 100% A 瓶溶剂为初始流动相, 在 2 min 时迅速将 B 瓶溶剂的比例提高至 40%, 通过色谱工作站记录流出曲线, 并做一级微商, 取其顶点所对应的时间减去  $t_{tub} + 2$  即得  $t_D$ , 实验值为 2.972 min。

保留时间的测定: 以联苯为测试样品, 测定其在不同比例的流动相组成以及梯度条件下的保留时间, 扣除  $t_{tub}$  即得  $t_R$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 (8)式所揭示的梯形梯度洗脱的特点

通过实验对(8)式的正确性进行了验证。首先, 在等度洗脱的模式下, 测定了联苯的保留因子与流动相组成之间的关系, 实验结果见图 2。从图 2 可见,  $\ln k$  与  $\varphi$  之间呈现良好的线性关系, 因此在本文的色谱体系中联苯的保留行为符合 LSS 模型。然后, 在表 1 所示的梯形梯度条件下测定了联苯的保留时间, 由(6)式计算得到  $\varphi_R$  值, 并根据每一组梯度实验得到的  $\varphi_R$  和  $B$  值的差异计算得到  $\Delta\varphi_R/\Delta B$  值。将该实验值与通过(8a)式计算得到的理论值( $d\varphi_R/dB$ )进行比较, 发现二者基本吻合, 从而验证了(8)式的正确性。需要指出, (8)式同样也适用于

表 1 联苯在梯形梯度坡度上流出时的梯度条件及实验数据

Table 1 Gradient conditions and experimental data for biphenyl eluted at the slope of the ladder-like gradient

No.	Gradient profile <sup>a</sup>	$B$	$t_R/\text{min}$	$\varphi_R^b$	$\Delta\varphi_R/\Delta B^c$	$d\varphi_R/dB^d$	RE/% <sup>e</sup>
1	0 min, 0.60; 5 min, 0.60; 20 min, 0.90; 25 min, 0.90	0.020	18.477	0.777	4.066	3.938	3.25
	0 min, 0.60; 5 min, 0.60; 17 min, 0.90; 25 min, 0.90	0.025	17.519	0.797			
2	0 min, 0.50; 10 min, 0.50; 30 min, 0.90; 40 min, 0.90	0.020	28.636	0.780	5.225	5.083	2.79
	0 min, 0.50; 10 min, 0.50; 32 min, 0.90; 40 min, 0.90	0.018	29.515	0.771			

a. see Fig. 1. b. calculated by Eq. (6). c. calculated from experimental data. d. calculated by Eq. (8a) where  $k(\varphi_R)$  is calculated from the  $\ln k-\varphi$  plot at the average of the  $\varphi_R$  values. e. relative error between  $\Delta\varphi_R/\Delta B$  and  $d\varphi_R/dB$ .

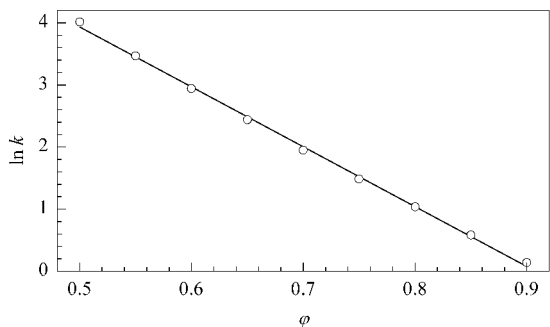


图 2 联苯的  $\ln k-\varphi$  曲线

Fig. 2 Plot of  $\ln k$  vs  $\varphi$  for biphenyl

Symbols: open circle, experimental value; solid line, the linear fit to data. The regression equation for the fit is  $\ln k = 8.753 - 9.637\varphi$ ,  $r = 0.999$ .

非线性溶剂强度模型,因此有着较宽的应用范围。

从(8b)式可知,当溶质在梯形梯度的坡度上流出时,方程等号的右边将始终大于零,即有  $t_{R0} > t_D + t_{P,1} + t_0$ 。这是因为,图1中点  $(t_{P,1}, \varphi_0)$  所对应的

流动相组成到达色谱柱末端的时间为  $t_D + t_{P,1} + t_0$ 。如果  $t_{R0} < t_D + t_{P,1} + t_0$ ,这就意味着溶质将始终处于初始流动相之中,即溶质将会在梯形梯度的第一个等度区间内流出色谱柱,显然这与溶质在坡度上流出的前提条件不符合。因此,(8)式等号的右边将始终大于零。这一结果表明,当增加梯形梯度的斜率时,溶质流出色谱柱所对应的流动相组成也将随之增加。该结论也与表 1 所得到的实验结果相吻合。

### 3.2 (12)式所揭示的梯形梯度洗脱的特点

由(12)式可知,如果溶质在梯形梯度的最后一个等度区间内流出色谱柱,同时  $\varphi_0$  和  $\varphi_2$  不变而仅有梯度的斜率发生变化时,溶质的保留时间将与梯度斜率的倒数呈线性关系。为了验证这一结论,实验中设计了两组梯形梯度条件,见表 2。将实验测得的保留时间( $t_R$ )对梯度斜率的倒数( $1/B$ )进行线性回归,得到的相关系数( $r$ )均接近于 1,这一结果验证了(12)式的正确性。

表 2 联苯在梯形梯度最后一个等度区间流出时的梯度条件及实验数据  
Table 2 Gradient conditions and experimental data for biphenyl eluted at the last isocratic segment of the ladder-like gradient

No.	Gradient profile	1/B	$t_R$ /min	Regression equation
1	0 min, 0.60; 1 min, 0.70; 25 min, 0.70	10	15.584	$t_R = 0.0338/B + 15.235$ , $r = 0.999$
	0 min, 0.60; 2 min, 0.70; 25 min, 0.70	20	15.927	
	0 min, 0.60; 3 min, 0.70; 25 min, 0.70	30	16.220	
	0 min, 0.60; 5 min, 0.70; 25 min, 0.70	50	16.910	
	0 min, 0.60; 7 min, 0.70; 25 min, 0.70	70	17.618	
2	0 min, 0.60; 1 min, 0.60; 2 min, 0.70; 25 min, 0.70	10	16.086	$t_R = 0.0349/B + 15.726$ , $r = 0.999$
	0 min, 0.60; 1 min, 0.50; 3 min, 0.70; 25 min, 0.70	20	16.424	
	0 min, 0.60; 1 min, 0.50; 4 min, 0.70; 25 min, 0.70	30	16.759	
	0 min, 0.60; 1 min, 0.50; 6 min, 0.70; 25 min, 0.70	50	17.462	
	0 min, 0.60; 1 min, 0.50; 8 min, 0.70; 25 min, 0.70	70	18.176	

从(14)式可知,回归方程的截距将与梯形梯度第一个等度区间的终点时间( $t_{P,1}$ )、梯度延迟时间( $t_D$ )、死时间( $t_0$ )以及溶质在初始和终止流动相中的保留因子( $k(\varphi_0)$ 和  $k(\varphi_2)$ )相关。将(14)式转化可得

$$t_D = \frac{b - t_0[1 + k(\varphi_2)]}{1 - k(\varphi_2)/k(\varphi_0)} - t_{P,1} \quad (15)$$

将表 2 中的 2 组  $t_{P,1}$ 、 $b$  值以及实验测得的  $t_0$ 、 $k(\varphi_0)$ 和  $k(\varphi_2)$ 值分别代入(15)式,计算得到的  $t_D$  值分别为 3.183 和 2.973 min,这与实验测得的 2.972 min 接近,从而进一步验证了(12)式的正确性。

## 4 结论

在不指定溶剂强度模型形式的前提下,探讨了梯形梯度洗脱的一些特点。对于溶质在梯形梯度坡度上流出时的情形,推导得到的(8)式表明溶质流出

色谱柱所对应的流动相组成将会随着梯度斜率的增加而增加。而对于溶质在梯形梯度最后一个等度区间内流出时的情形,推导得到的(12)式表明,如果初始和终止流动相组成保持不变而仅有梯度的斜率发生变化时,溶质的保留时间将与梯度斜率的倒数呈线性关系。实验中以联苯为样品,C18 柱为固定相,甲醇-水为流动相,测定了不同梯形梯度条件下的保留时间,所得到的实验值与理论值相吻合,从而验证了上述方程的正确性。由于推导过程中没有指定溶剂强度模型的数学形式,这些结果将同样适用于非线性溶剂强度模型时的情形(即  $\ln k-\varphi$  曲线为非线性)。在一些实验中,样品在乙腈/水(或缓冲溶液)等流动相体系中会表现出非线性溶剂强度的特点。对于这类情形本文得到的公式将同样适用。这将有助于帮助人们深入认识梯形梯度洗脱的一些特点,从而更好地将其应用于实践之中。

## 参考文献:

- [1] Gritti F, Guiochon G. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(33): 6124
- [2] Chen X, Kong L, Su X, et al. *J Chromatogr A*, 2005, 1089(1/2): 87
- [3] Ma Y, Zhang W J, Wei J Y, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (马岩, 张万军, 卫军营, 等. 色谱), 2011, 29(3): 205
- [4] Wiczling P, Kaliszan R. *Anal Chem*, 2010, 82(9): 3692
- [5] Schellinger A P, Stoll D R, Carr P W. *J Chromatogr A*, 2005, 1064(2): 143
- [6] Snyder L R, Dolan J W, Gant J R. *J Chromatogr*, 1979, 165(1): 3
- [7] Fitzpatrick F, Edam R, Schoenmakers P. *J Chromatogr A*, 2003, 988(1): 53
- [8] Gallant S R, Vunnum S, Cramer S M. *AIChE J*, 1996, 42(9): 2511
- [9] Natarajan V, Ghose S, Cramer S M. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 78(4): 365
- [10] Lu P Z, Dai C Z, Zhang X M. *Fundamentals of Chromatographic Theory*. 2nd ed. Beijing: Science Press (卢佩章, 戴朝政, 张祥民. 色谱理论基础. 2 版. 北京: 科学出版社), 1997
- [11] Hao W, Zhang X, Hou K. *Anal Chem*, 2006, 78(22): 7828
- [12] Hao W, Zhang X, Hu F. *Anal Chem*, 2007, 79(6): 2507
- [13] Hao W Q, Di B, Yang Y B, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (郝卫强, 狄斌, 杨永兵, 等. 色谱), 2010, 28(6): 541
- [14] Nikitas P, Pappa-Louisi A. *Anal Chem*, 2005, 77(17): 5670
- [15] Department of Mathematics of Tongji University. *Advanced Mathematics*. 3rd ed. Shanghai: High Education Press (同济大学数学教研室. 高等数学. 3 版. 上海: 高等教育出版社), 1993
- [16] Stanley B J, Savage T L, Geraghty J J. *Anal Chem*, 1998, 70(8): 1610
- [17] Nikitas P, Pappa-Louisi A, Agrafiotou P. *J Chromatogr A*, 2006, 1120(1/2): 299