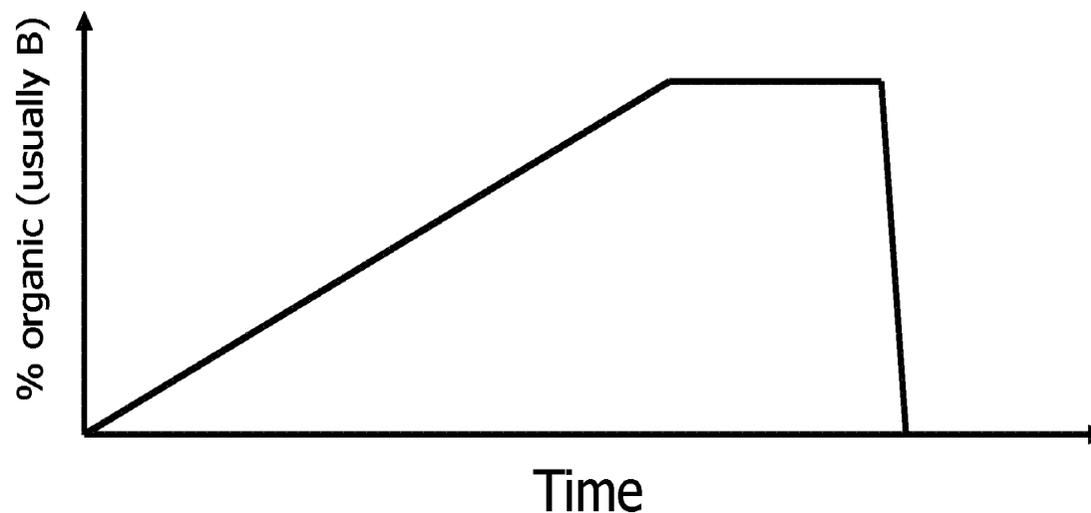


液相色谱基础

梯度洗脱

- 梯度的定义
- 梯度系统
 - “高压混合”HPLC系统
 - “低压混合”HPLC系统
- 梯度延迟或死体积
- 流动相的选择
- 最佳的色谱条件
- 梯度洗脱常见的问题

- 流动相的组成或流速随洗脱时间的变化而变化
 - 起始为弱洗脱能力的溶剂，随着时间的推移逐步变为洗脱能力较强的溶剂
 - 惯例
 - A通常是洗脱能力较弱的溶剂或者流动相
 - B通常是洗脱能力较强的溶剂或者流动相



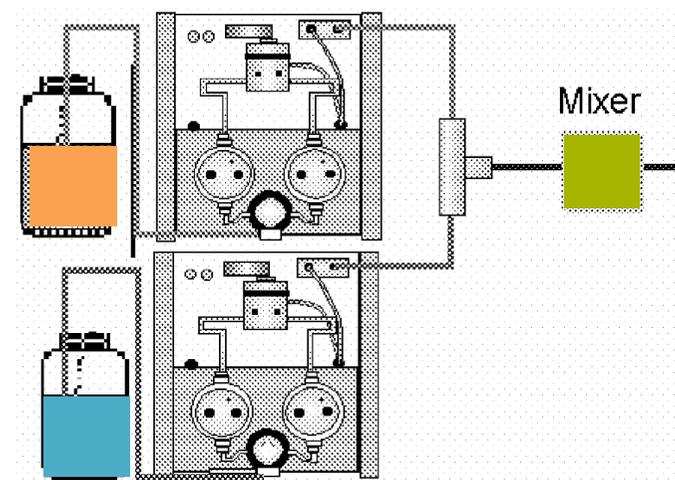
为什么要进行梯度洗脱?

- 样品在色谱柱上有宽范围的保留
- 能够增加峰容量，更好的对复杂包含多种物质的组分进行强有力的分离
- 使峰形变窄
- 单位时间内的分离能力增加，有效的缩短分析时间

- “高压”系统
 - 溶剂混合处在泵的高压一侧，即混合点处于泵头之后
- “低压”系统
 - 溶剂混合处在泵的低压一侧，即混合点处于泵头之前

“高压混合”

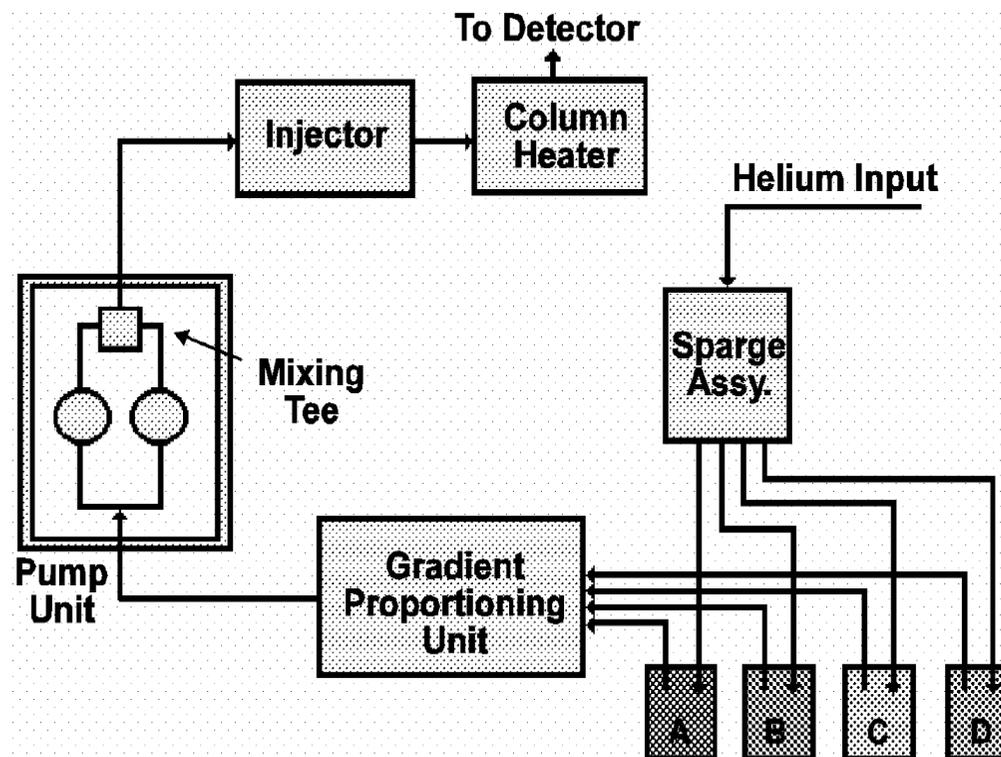
- 优点
 - 系统体积小
 - 没有严格的在线脱气机要求
- 缺点
 - 一个泵只能控制一路溶剂
 - 最多仅允许三路溶剂（通常二路）



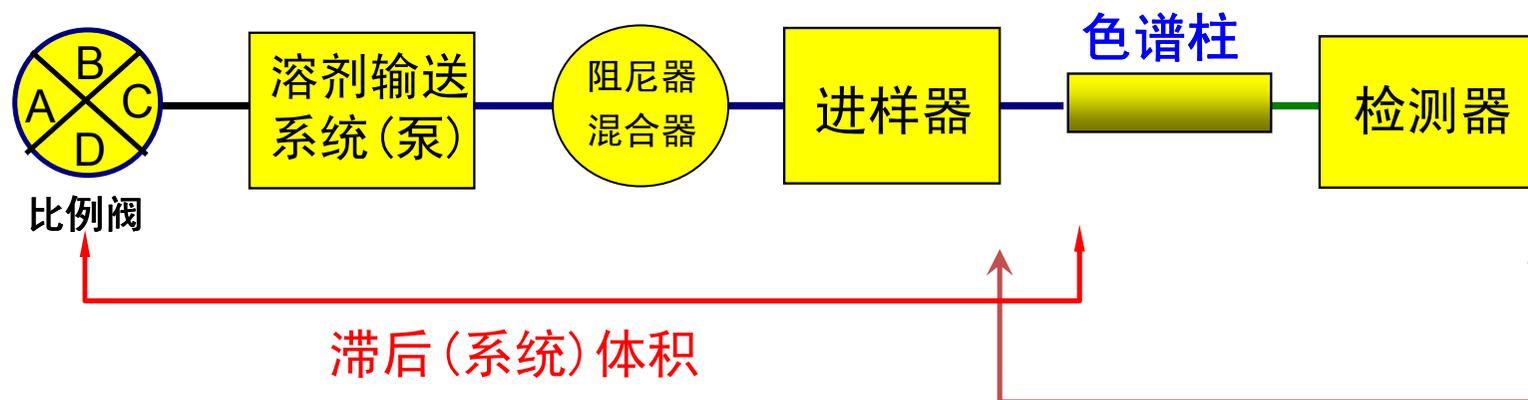
二元梯度系统，在高压侧混合

“低压”混合

- 优点
 - 只需一个泵头
 - 同时使用多种溶剂（通常不超过四种）
- 缺点
 - 较大的系统体积
 - 需要在线脱气



梯度滞后体积与死体积

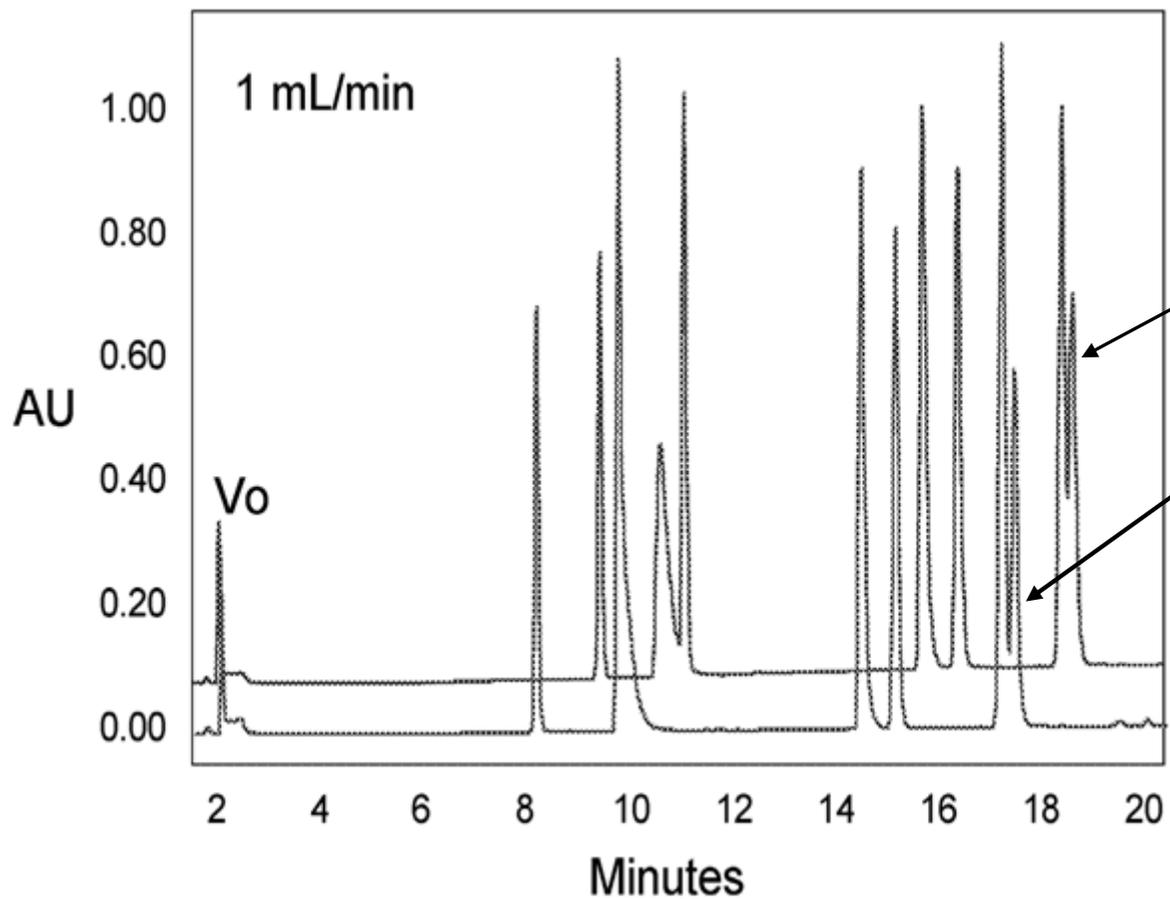


注意：滞后体积包括进样器、阻尼器、混合器及其管路

死体积/谱带展宽体积
(无色谱柱时)

新系统 < 1ml (Waters 2695 < 650ul)
较早的系统一般都是几个ml

梯度方法转化实例

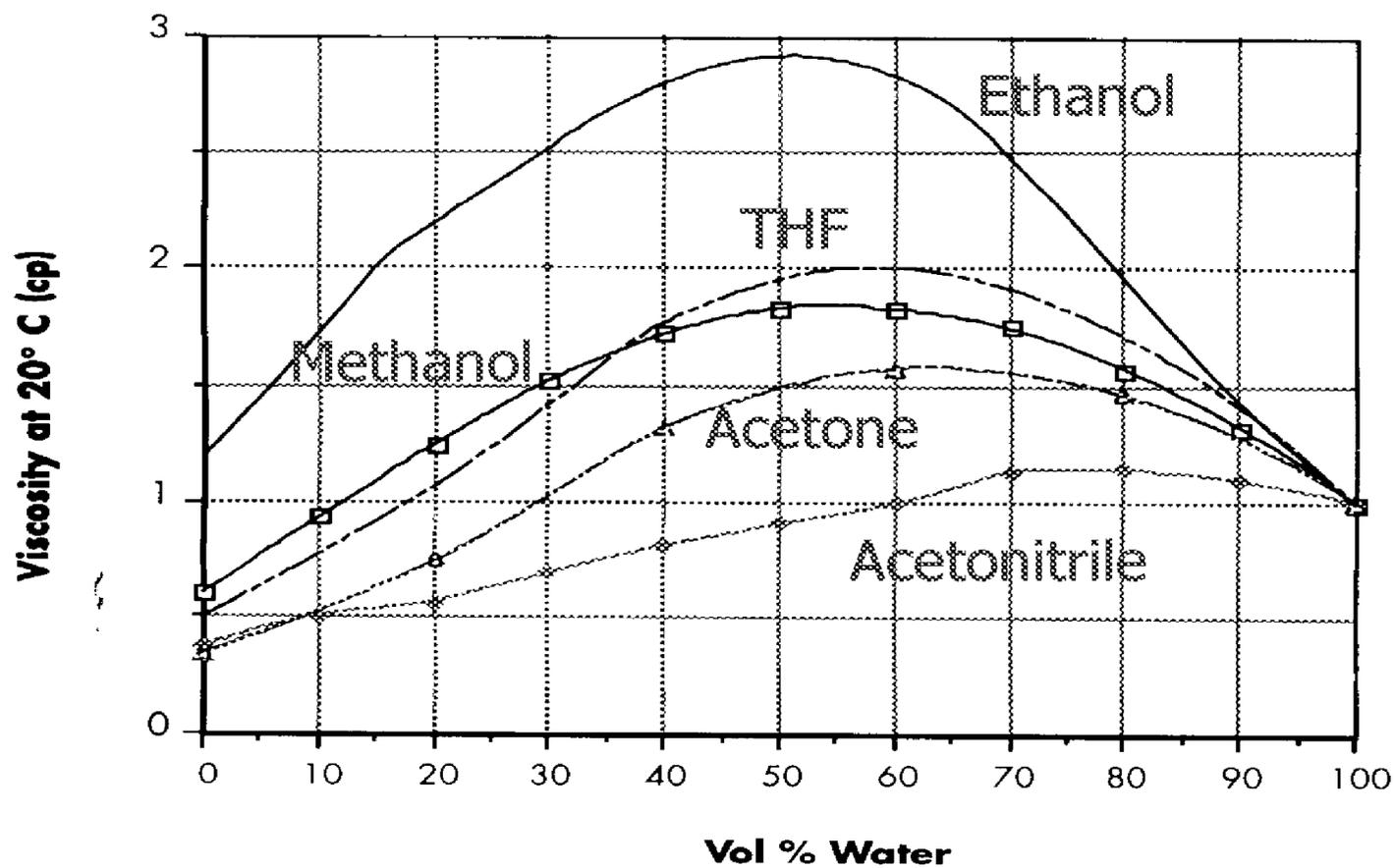


滞后体积不同，保留时间改变，分离度改变

- 当梯度方法从一个色谱系统上转化到另外一个色谱系统上时，滞后体积的不同能够改变保留时间和分离度
- 需要对不同系统的滞后体积进行确定
- 当进行梯度方法开发时，要考虑不同系统的滞后体积的不同，这样才能更加容易的在不同系统上进行梯度方法的转换

- **A**（弱洗脱溶剂）溶剂的洗脱能力应该尽量的小，这样才能够使最快洗脱的物质有一个很合理的保留（ $K > 1$ ）
- **B**（强洗脱溶剂）溶剂的洗脱能力应该非常的强，这样才能够使最晚出峰的物质有一个合理的保留（ $K < 20$ ）
- **A**和**B**应该能够非常好的混合
- **A**和**B**应该尽可能的没有粘滞性

水与有机溶剂混合时的粘度



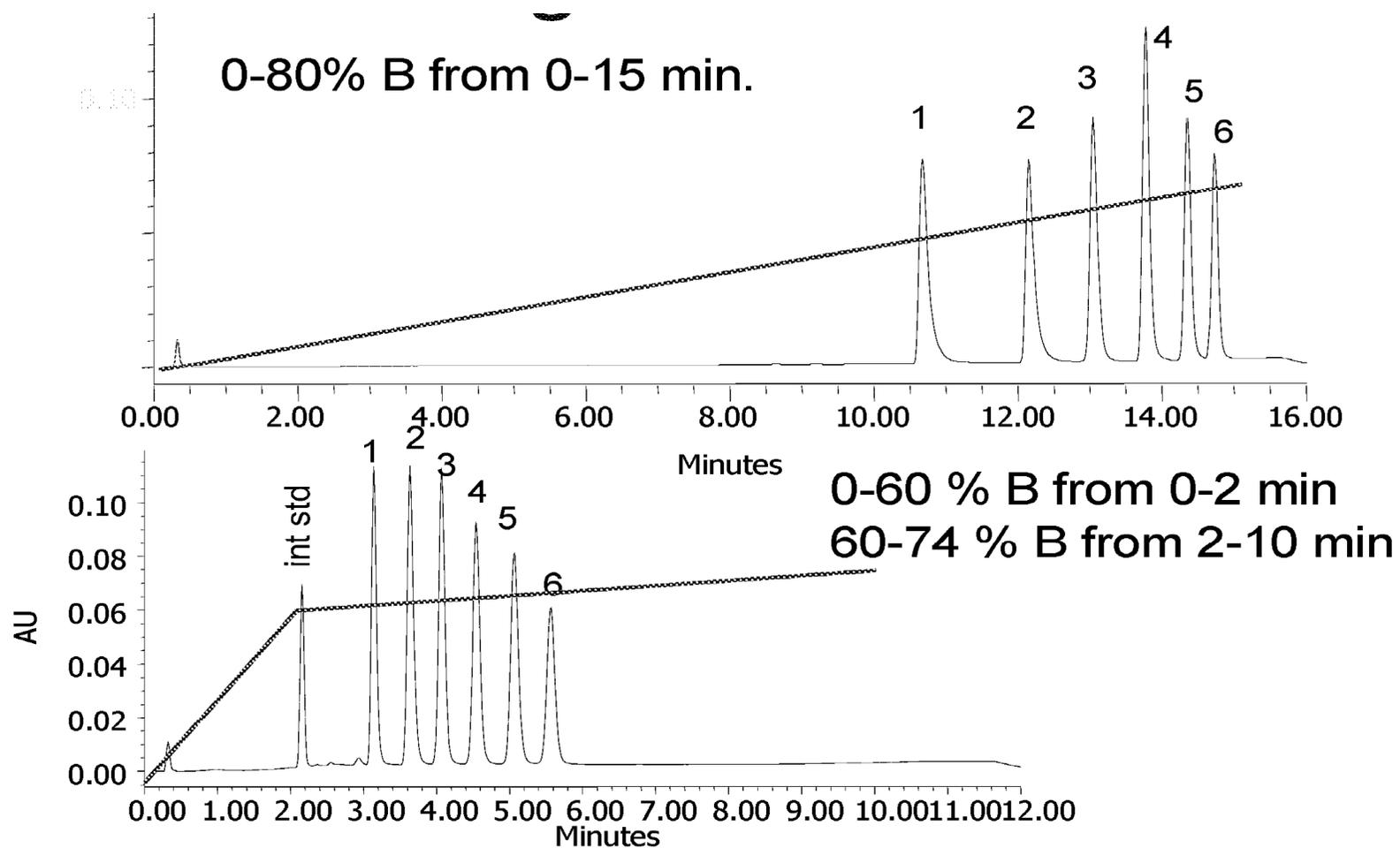
- 平衡时间
- 流动相的兼容性
- 要求高纯度的流动相（包括水）以及各种添加剂
- 通常需要进行空白梯度实验
- 当估算色谱分析时间时，需要回到起始比例重新平衡色谱柱
- 重现性

- 起始比例
- 结束比例
- 梯度分析时间
- 总运行时间
- 曲线类型
- 梯度类型（二元，三元，四元）
- 流速

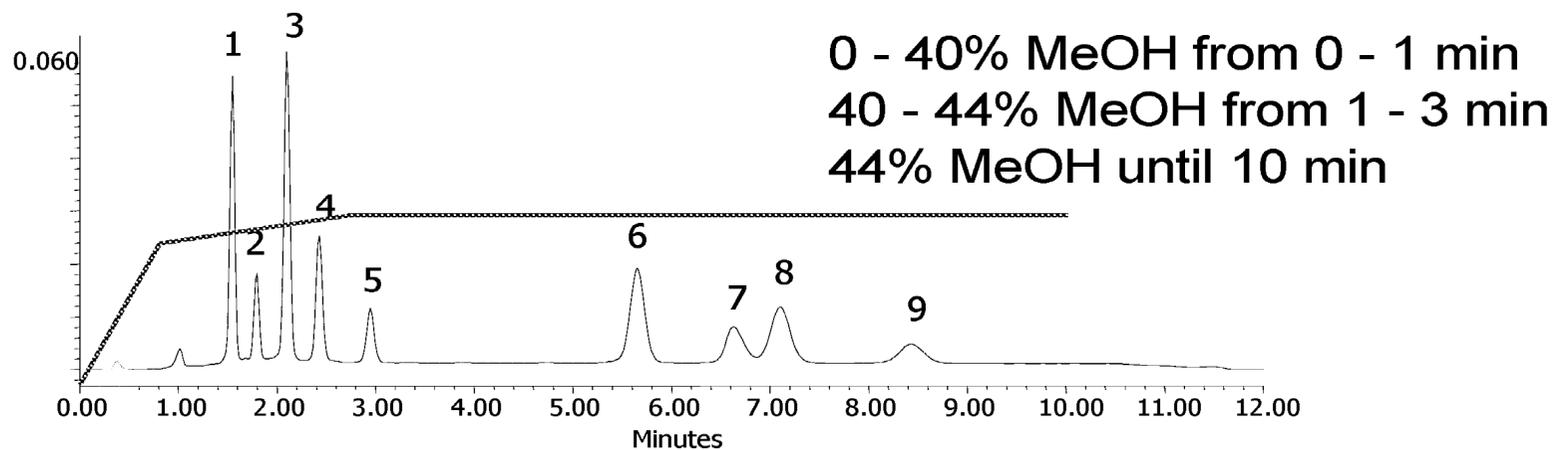
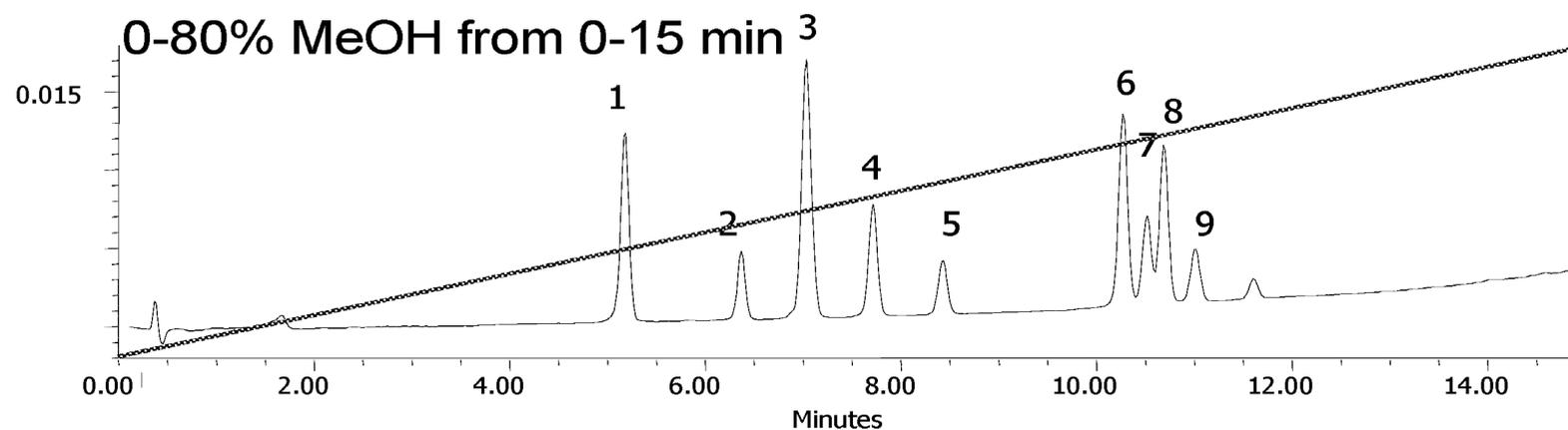
常规的梯度起始比例

- 在15到25分钟内，B流动相从10变到100%
- 流速为1-2ml/min
- 选择合适的起始比例（B%）和结束比例，梯度时间，流速

■ 增加B的起始比例



- 增加B的起始比例并且进行梯度分割



梯度洗脱的问题

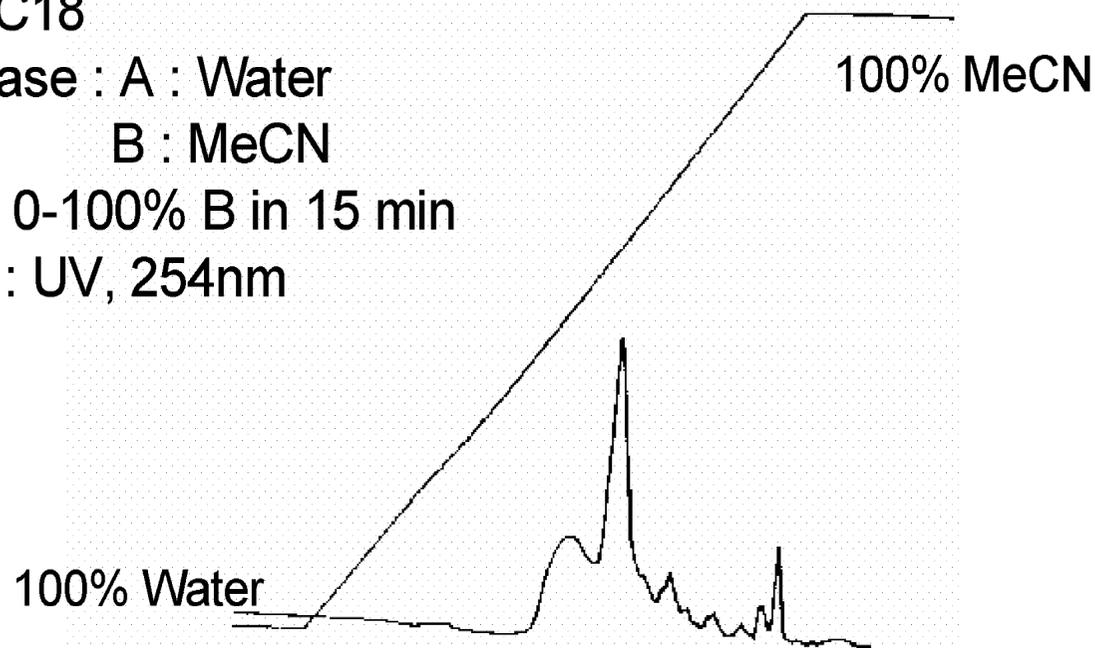
Column : C18

Mobile phase : A : Water

B : MeCN

Gradient : 0-100% B in 15 min

Detection : UV, 254nm



当色谱柱初始使用纯水平衡时，水中的有机物将在色谱柱上富集，随着梯度变化时，有机物将被洗脱出来

- 理解HPLC的滞后体积和系统死体积
- 进行梯度空白实验，检查流动相中是否含有的其它杂质
- 确保足够的时间返回到起始比例并且重新平衡色谱柱
- 使用高纯度的流动相（HPLC级）