

HPLC 梯度洗脱小知识

色谱技术参考

HPLC 的梯度洗脱

对于组分复杂的样品，采用一种色谱体系，很难得到理想的分离结果。要么分离时间太长，要么分离度太差。

液相色谱中采用梯度洗脱的目的：缩短分析时间；提高分离效果。

梯度洗脱：流动相由几种不同极性的溶剂组成，通过改变流动相中各溶剂组成的比例改变流动相的极性，使每个流出的组分都有合适的容量因子 k' ，并使样品中的所有组分可在最短时间内实现最佳分离。

梯度洗脱特点：

提高柱效

改善检测器的灵敏度

当样品中的一个峰的 k' 值和最后一个峰的 k' 值相差几十倍至几百倍时，使用梯度洗脱效果特别好。

梯度洗脱中为保证流速的稳定，必须使用恒流泵，否则难获重复结果。

梯度洗脱常用一个弱极性的溶剂A和一个强极性的溶剂B。

梯度范围：指流动相中强溶剂分别在起始液和终止液中的浓度。

调节梯度范围对得到最佳的梯度分离起重要作用。

最佳梯度范围：第一个峰处分时间大约为2倍的 t_0 ，梯度结束时把最后一个峰洗脱出来。

梯度洗脱的形式

线性梯度：在梯度洗脱时，流动相强度的变化与梯度时间成线性比例。在一定时间内流动相强度越大，直线斜率越大。

指数梯度：在梯度洗脱时，流动相强度随梯度时间变化呈指数关系。

凹形：梯度起始阶段强度变化缓慢，随时间增加，强度变化加快。

凸形：起始阶段梯度速度变化快，终止阶段梯度速度变化慢。

选择适当的 A, B 溶剂

强度：A 溶剂为低强度；

B 溶剂为高强度，B 溶剂的强度应能够在梯度过程中使所有欲测谱带都能被洗脱，并使各谱带的 k' 值在 2-10 之间。

初步分离：选择好 A、B 两种溶剂，先按中等强度进行配比，在此恒定强度下进行初步分离。

A、B 混合溶剂强度应使所有谱带的 k' 值在 1-10 之间。

梯度形式选择

经过初步分离，一般可能得到3种分离色谱图：

- ① 前半部峰重叠，后半部峰分离度过大，保留时间太长；
可选择线性梯度，或凹形梯度。
- ② 前半部分离良好，后半部峰重叠；
可选择凸形梯度。
- ③ 前后两部分分离良好，中间部分峰重叠。
可选择折线梯度。

