

高效液相色谱法 (HPLC) 转换到超高效液相色谱法 (UHPLC) 的通用工具

Holger Franz and Susanne Fabel
Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany

引言

随着超高效液相色谱法 (UHPLC) 的商品化, 这项技术的使用呈现出一种持续增长的趋势。这一趋势主要受液相色谱仪器和色谱柱填料的创新驱动。UHPLC 固定相比 HPLC 固定相的粒径更小, 低至亚 2 μm 范围, 理论塔板和分离度均优于具有相同柱长但使用较大粒径的色谱柱。

通常情况下, HPLC 方法转换成 UHPLC 方法后, 足以维持原 HPLC 方法的分离度, 因此, 主流的做法是使用更短的色谱柱装填更小粒径的填料, 在保持分离度不变的前提下, 提高分离速度。但若要保证流速、进样体积或梯度曲线等参数适合新色谱柱的特性, 需要经过相当复杂的计算。Thermo Scientific™ Method Transfer Tool 能简化这些计算过程并且提供多语言界面支持。根据现有的 HPLC 色谱参数, 自动计算出 UHPLC 方法所需的最佳色谱参数。

本文向您介绍了 HPLC 方法向 UHPLC 方法转换的相关理论背景和数学方程, 同时对 Thermo Scientific Method Transfer Tool 的使用方法进行了详细介绍, 方便您更熟练地获取计算结果。除了基于梯度延迟体积差异进行的基本转换以外, 该工具还提供了更多有价值的功能, 如数据采集速率的调整, 以及色谱柱再平衡时间的调整等。

方法加速策略

在尽可能短的时间内达到足够的分离度是将 HPLC 方法转换为 UHPLC 方法的主要目的。具体做法是使用更短的色谱柱装填更细的填料。该方法的理论基础是基于各种色谱教科书广泛收录的色谱学理论。基于下文描述的各种色谱转换公式, Method Transfer Tool 可用于具有相似色谱选择性的全多孔色谱固定相在 HPLC 方法和 UHPLC 方法间的快速转换。

液相方法的分离效率可用峰容量 P 来表示。峰容量是指一定时间周期内可分离得到的色谱峰个数, 等于运行时间除以平均峰宽。因此, 较窄的峰宽是快速分离方法获取更高分离效率必不可少的条件。峰宽与理论塔板数 (N) 平方根的倒数成正比。考虑到柱长, 分离效率也可用理论塔板的高度 H 来表示。方程 1 给出了柱长 L 与塔板高度 H 和塔板数 N 的关系。

$$\text{方程 1: } N = \frac{L}{H}$$

式中:

N = 塔板数

L = 柱长

H = 塔板高度

在柱长一定的情况下，较小的塔板高度可获得较大的理论塔板数。较大的峰容量意味着较窄的峰宽和较小的塔板高度。哪些因素影响塔板高度 H 呢？为了寻找答案，必须考虑到色谱柱内的各个过程，色谱分离过程可以用 Van Deemter 方程（方程 2）表示。

$$\text{方程 2: } H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u$$

式中：

u = 线速率

A = 涡流扩散项

B = 纵向扩散项

C = 传质阻力项

涡流扩散项 A 描述了流动相沿固定相表面不同随机路径运动导致的分析物谱带展宽。分析物相对于流速的纵向扩散用 B 表示。 C 描述了分析物在不同的固定相孔隙内扩散产生的色谱峰展宽。随着流速的增加，谱带展宽程度增大。塔板高度 H 与流动相线速率的关系可以用 Van Deemter 曲线表示。Van Deemter 曲线有助于确定最佳流速，获取最高柱效率和最低塔板高度。根据 Halász¹（方程 3）——Van Deemter 方程的简化可以对全多孔固定相的柱效率进行简单估算。

$$\text{方程 3: } H = 2 \cdot d_p + \frac{6}{u} + \frac{d_p^2 \cdot u}{20}$$

式中：

d_p = 粒径（单位 μm ）

u = 流动相速率（单位 mm/s ）

塔板高度 H 相对于速率 u 的曲线取决于固定相粒径 d_p （见图 1，顶部）。该曲线直观地说明了小粒径固定相在增加速度中的关键作用：粒径越小，塔板高度越低，因此分离效果也越好。使用装填小粒径固定相的短色谱柱可以获得装填大粒径固定相的长色谱柱才具备的柱效。因此使用小粒径固定相可以缩短运行时间。

对于 $2 \mu\text{m}$ 的固定相，图 1 显示了使用较小粒径固定相的另一个好处：小粒径可以改善传质过程，即使流速已超出最佳范围，塔板高度的增加也会降至最低，这就为进一步提高流速带来了可能。

将 Halász 方程的一阶导数设为零，可以计算出最佳流速和最小塔板高度。然后，利用方程 4 求出最佳线速率（单位 mm/s ）。

$$\text{方程 4: } u_{\text{opt}} = \sqrt{\frac{B}{C}} = \frac{10.95}{d_p}$$

式中： u_{opt} = 最佳线速率（单位 mm/s ）

塔板高度是粒径的函数，在方程 3 中插入方程 4，得方程 5，可计算最小塔板高度。

$$\text{方程 5: } H_{\text{min}} \approx 3 \cdot d_p$$

式中： H_{min} = 最小塔板高度

色谱工作人员一般更愿意采用分离度代替理论塔板来衡量分离效率。分离度 R 与理论塔板数的平方根成正比，如方程 6 所示。

$$\text{方程 6: } R = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k}{1+k} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

式中：

R = 分离度

k = 容量因子

α = 选择系数

如果保持色谱柱柱长不变，粒径减小，则分析物的分离度提高。图 1 使用粒径分别为 5 μm 和 2 μm 的固定相论证了这一效果。

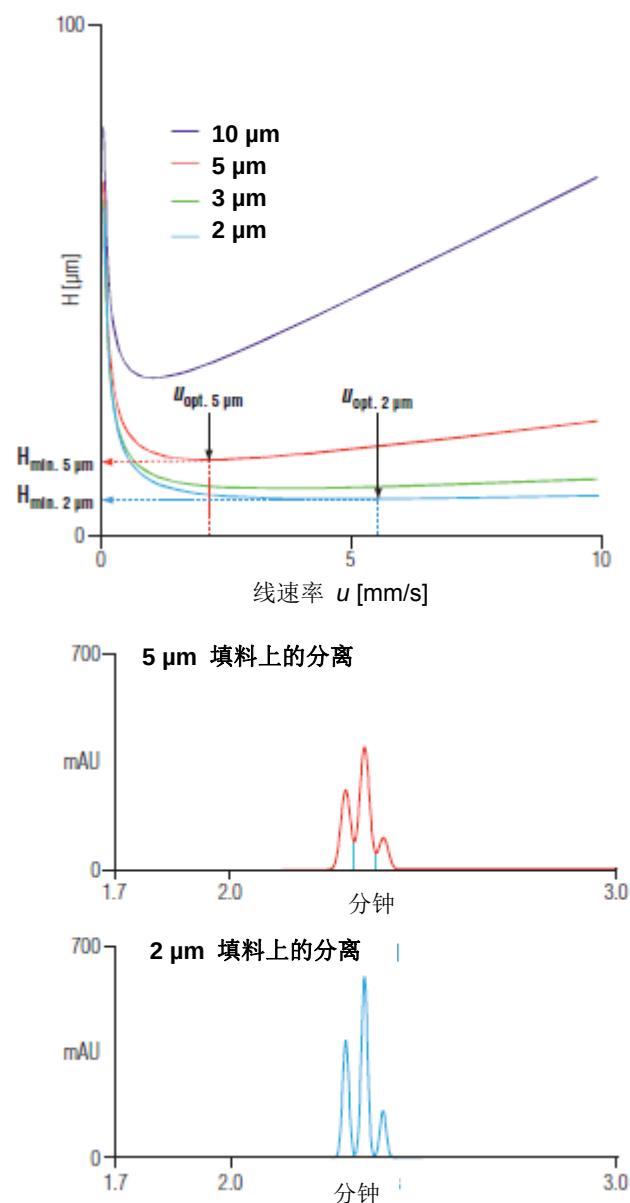


图 1. 不同粒径固定相分离三个化合物（底部）以及 Van Deemter 曲线（顶部）。最低塔板高度 H 说明，粒径越小，理论塔板数越多，分离度越大。

使用较小粒径时，即使线速率大于最佳线速率 u_{opt} ， H 增加幅度小，分离速度更快。因此，在保持分离度不变的同时，分离速度更快。塔板高度 H 相对于流动相的线速率 u 的 Van Deemter 曲线（顶部）揭示出小粒径的加速优势：由于最小塔板高度的降低和最佳速率的增加，减小粒径后允许使用更高流速，更短色谱柱。优化结果是，峰宽变小，分离度增加（底部）。

在梯度方法转换时，必须考虑梯度曲线与新色谱柱的尺寸和流速的匹配，从而保持分离性能。该理论由 L. Snyder² 提出，称为梯度体积原则。梯度体积指在规定的梯度时间 t_G 内，流经色谱柱的流动相体积。若梯度体积相对于柱体积不变，则认为分析物在比例相同的洗脱液进行了洗脱。若保持梯度体积和柱体积之比不变，则保证梯度方法可以准确的向不同规格色谱柱转移。

考虑变化后的流速 F 和柱体积，利用方程 7 计算出新方法的梯度时间间隔 t_G 。

$$\text{方程 7: } t_{G\text{-新}} = t_{G\text{-旧}} \cdot \frac{F_{\text{旧}}}{F_{\text{新}}} \cdot \frac{L_{\text{新}}}{L_{\text{旧}}} \cdot \left(\frac{d_{c\text{-新}}}{d_{c\text{-旧}}} \right)^2$$

式中：

t_G = 梯度时间

F = 流速

d_c = 柱内径

通过采用 Method Transfer Tool（图 2），可以实现方法参数的轻松转换，所讨论的理论自动适用。

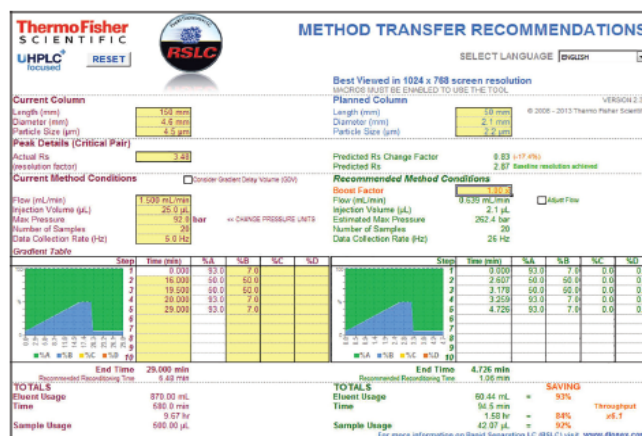


图 2. Thermo Scientific Method Transfer Tool 实现了传统（现有）HPLC 方法到新的（计划）UHPLC 方法的转换。

4 前提条件

Method Transfer Tool 是一种通用工具，可配合任何 HPLC 系统使用。然而，成功的方法转换必须考虑一些前提条件，本技术指南利用七种饮料添加剂的分离案例对此进行了说明。

柱尺寸

首先，从 HPLC 方法到 UHPLC 方法的转换要求选用填料较小粒径的适当色谱柱。如果新旧方法所用色谱柱的选择性相同，用 Method Transfer Tool 转换所得的 UHPLC 方法将与实际应用更加吻合。因此，来自同一制造商、表面改性相同的色谱柱更适合于方法的精确转换。如果此法不适用，可选择基质和键合相相同的色谱柱。使用较短的色谱柱可以加快分离，但使用较短色谱柱的前提是能提供足够的分离度，实现分析物的基线分离。表 1 概括了不同柱长和粒径大小组合的 Thermo Scientific™ Acclaim™ 120 C18 柱所预期的理论塔板数。需要注意的是，色谱柱制造商一般采用 4~5 μm 固定相填充规定粒径为 5 μm 的色谱柱。Acclaim 120 C18 5 μm 的色谱柱实际上填充的是平均粒径为 4.5 μm 的固定相，这在表格中有所体现。

表 1. 取决于柱长和粒径的理论塔板数(使用方程 5 计算)。

	理论塔板 N		
粒径	4.5 μm	3 μm	2.2 μm
柱长: 250 mm	19000	28000	38000
150 mm	11000	17000	23000
100 mm	7400	11000	15000
75 mm	5600	8300	11000
50 mm	3700	5600	7600

如果初始的分离度高于要求的分离度，可以缩短柱长。保持柱长不变，同时使用较小的色谱柱填料，可以提高分离度。减小柱内径并不能缩短分析时间，只是减少了流动相消耗和样品体积。但出于对高温分离的考虑，较小的柱内径可降低色谱柱温度不均匀的风险。

系统要求

小粒径固定相会产生较高的背压。减小粒径时必须增加流动相的线速率，以便色谱柱在 Van Deemter 最佳范围内工作。在高达 15,000 psi (1034 bar) 的工作压力下，Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 RS 系统可以完美实现这种方法。在流速不超过 5 mL/min 的整个流速范围内，最大压力恒定不变。从 5 mL/min 到 8 mL/min，最大压力线性调整到 800 bar。通过增加流速，这些承压能力有可能进一步地加速应用。需要注意的是，小粒径的色谱柱也可用于生物兼容的快速分析系统：Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000 BioRS 系统。它支持相同的流量和压力范围，因此可以以同样的方式使用。

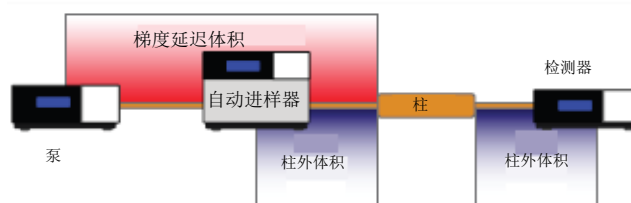


图 3. HPLC 系统的梯度延迟体积和柱外体积。二者在方法加速中均发挥着重要的作用。

梯度延迟体积 (GDV) 对于快速梯度法起着关键性作用。Method Transfer Tool 遵循 L. Snyder.² 引入的梯度体积原则。梯度体积的含义是，在特定的梯度时间 t_G 内，流经色谱柱的流动相体积。在该时间点下，可视为分析物被某一特定梯度比例所洗脱。因此，若保持梯度体积和柱体积的比值不变，则可以保证梯度方法在不同规格色谱柱之间准确的转换。为此，系统的梯度延迟体积 (GDV) 也必须遵循梯度体积原则（方程 8）。

$$\text{方程 8: } V_{GDV, \text{新}} = \frac{V_{GDV, \text{旧}} \cdot V_{GDV, \text{新}}}{V_{\text{column}}}$$

式中：

$$\begin{aligned} V_{GDV} &= \text{梯度延迟体积} \\ V_{\text{柱}} &= \text{柱体积} \end{aligned}$$

GDV 是从第一个混合点到柱头的体积（图 3）。GDV 主要受泵混合体积、自动进样器流路和柱前所有连接管路体积的影响。作者建议采用参考文献 3 中描述的方法确定 GDV。

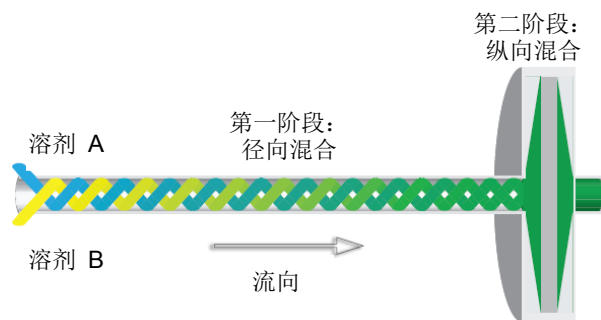


图 4. UltiMate 3000 系列的高度可定制两步混合概念使 GDV 可以适应各种需求。

当柱体积符合梯度体积原则要求，并能保持原方法的选择性不变时⁴（假设转换前后的两根色谱柱总孔隙率 ϵ_T 一致），可以按比例缩小 GDV。

实际上，按比例精确调整系统 GDV 是很困难的，而且有必要根据色谱柱体积按正确比例减小泵混合体积，因为这是总 GDV 产生的主要来源。为了解决这个问题，UltiMate 3000 泵的设计提出了高度可定制的两步混合体积概念，可以灵活满足该项需求（图 4）。

除了梯度延迟体积，柱外体积也是快速 LC 方法的一个重要参数。柱外体积是样品流经该系统时的管路体积，会导致分析物的色谱峰加宽（图 3）。LC 系统的柱外体积应当低于峰体积的 1/10。因此，从进样器到色谱柱、色谱柱到检测器的连接管路长度和内径应当尽可能小。为了避免产生死体积，安装管路时必须特别小心。Thermo Scientific™ Dionex™ Viper™ 连接器通过对管道尖端处进行密封，实现了零死体积连接，无需额外工具即可确保传统 HPLC 系统到现代 UHPLC 系统的转换。Viper 是一个手拧接头系统，可承受 1,250 bar (18,000 psi) 的 UHPLC 背压，仅需较小扭矩便可实现密封，并且可与其它厂家的管路和阀器件连接使用。除了正确的管道连接，流通池的体积也必须与 UHPLC 色谱柱分离所得色谱峰体积匹配。当流通池体积不超过最小峰体积^{5,6}的 10% 时，柱外效应导致的色谱峰展宽一般不明显。

检测器设置

传统方法向 UHPLC 方法转换时，检测器设置对检测器性能具有重大影响。数据采集速率和时间常数必须适应较窄的峰宽。一般情况下，每个色谱峰应由至少 30 个数据点定义。数据采集速率和时间常数设置通常是相互关联的，用于优化单个色谱峰的数据点数量，减少短期噪声，同时保持色谱峰高、对称性和分离度。Thermo Scientific Method Transfer Tool 具有估算新方法峰宽的功能。在此基础上，该工具提出了新的数据采集速率。该功能的具体细节详见本技术指南的特殊设置章节。

除了使用本方法转换工具进行估算，Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 变色龙色谱数据系统 (CDS) 软件也具有方法向导，输入最小色谱峰半峰高处的峰宽即可计算出最佳参数。最小色谱峰半峰高处的峰宽最好在最短运行时间和最大采集速率条件下获取。在方法向导中输入通过检测获取的峰宽值，可进行检测参数的优化。若需了解更详细情况，请参考检测器操作手册。

采用转换工具进行方法加速

分离示例

分离在二元 UltiMate 3000 RS 系统上进行，该系统由 HPG-3200RS 二元快速分离泵、带分析型定量环 (100 μ L) 的 WPS-3000RS 快速分析自动进样器、带预加热器 (2 μ L) 的 TCC-3000RS 快速分离柱温箱、带 2.5 μ L 流通池的 VWD-3400RS 可变波长检测器组成。Chromeleon CDS 软件同时用于仪器控制和数据报告。在 45°C 下采用梯度洗脱法，在两种不同的色谱柱上，对七种常见饮料添加剂的标准混合物进行分离：

- 传统 HPLC 色谱柱：Acclaim 120 C18, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm, (P/N 059148)
- UHPLC 色谱柱：Acclaim RSLC 120 C18, 2.2 μ m, 2.1 $\times$ 50 mm 柱 (P/N 068981)。

采用 HPLC 色谱柱时，数据采集速率为 5 Hz，采用 UHPLC 色谱柱时，数据采集速率为 25 Hz 和 50 Hz。紫外 (UV) 检测波长为 210 nm。该方法的详细情况，如流速、进样体积，以及传统方法和 RSLC 法的梯度表在下一章节中予以说明。色谱参数采用 Method Transfer Tool 进行转换和计算。

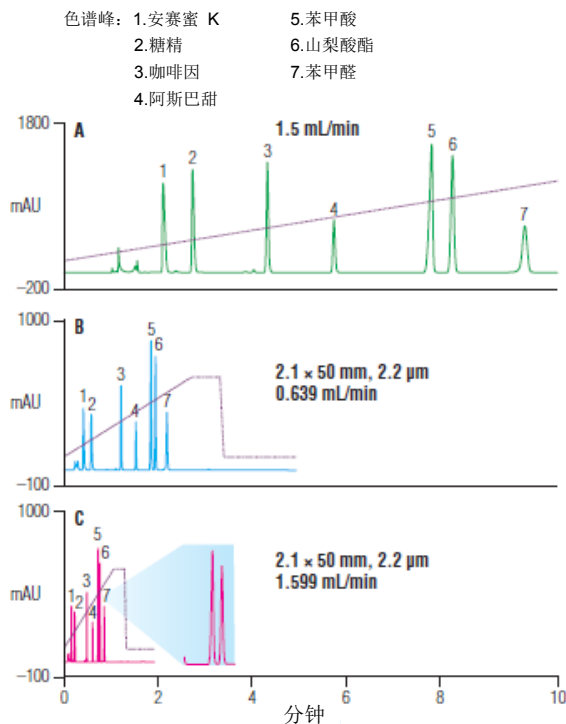


图 5. 方法加速, 采用 Method Transfer Tool, 从 A) 在 Acclaim 120 C18 5 μm 粒径色谱柱上的传统 LC 分离到 B) 和 C) 在 Acclaim RSLC 120 C18 2.2 μm 粒径色谱柱上的 UHPLC 分离。

七种饮料添加剂的传统分离法如图 5A 所示。利用 Method Transfer Tool, 该方法在两种流速下成功地实现了向 UHPLC 方法的转换 (图 5B 和 C)。下一章节描述了如何利用该通用工具进行轻松的转换。

适当分离度的柱选择

快速分离方法开发的前提是保证高效分离。在本例中, 化合物 5 和 6 的分离最具挑战性。根据表 1, 通过对塔板数的考虑, 可以做色谱柱的预选。4.6 $\times$ 150 mm, 5 μm 色谱柱实际填充的固定相粒径为 4.5 μm 。因此, 它的理论塔板数约为 11,100 塔板/柱。在该色谱柱上, 分离度 $R(5,6)=3.48$ 。此分离度足够大, 可选择具有较少理论塔板数的快速 LC 色谱柱。因此, 选用了塔板数约为 7600 的 2.1 $\times$ 50 mm, 2.2 μm 色谱柱。

输入到 Method Transfer Tool 黄颜色字段中的第一组数值分别是当前柱尺寸、计划柱尺寸和关键对的分离度。为了获得最精确的方法转换, 采用制造商提供的色谱柱规格表中所列粒径, 而非标称的粒径, 两者可能有所不同。标称粒径为 5 μm 的 Acclaim 120 C18 色谱柱实际填充的是 4.5 μm 粒径的固定相, 该数值应当用于实现精确的方法转换计算。此时, 根据固定相化学性质不变的假设, 计算者预测出新方法提供的分离度 (图 6)。

在图 6 的示例中, 苯甲酸和山梨酸酯之间的预测分离度为 2.87。分离度 $R \geq 1.5$ 时, 将弹出对话框, 并显示“达到基线分离”。这表明, 在具有足够分离度的情况下, 利用计划色谱柱, 有可能实现成功的方法转换。如果 R 小于 1.5, 则出现红色警告“未达到基线分离”。注意, 加权因子 BF 为 1 时方可进行分离度计算, 否则禁用。“调整流速”一节描述了加权因子的作用。



图 6. 以关键化合物间的分离度作为选择色谱柱的依据。



图 7. 当前方法的流速、进样体积和背压根据新的色谱柱尺寸进行调整。



图 8. 通过应用加权因子 2.5，使新的流速得到进一步加速。

仪器设置

Method Transfer Tool 的下一章节涉及基本的仪器设置。这些设置包括当前方法的流速、进样体积和系统背压，以及数据采集速率（图 7）。此外，如果输入需要运行的样品数量，则可以计算出新方法的处理量增益。

调整流速

根据 Van Deemter 理论，小粒径固定相需要较高的线速率，以提供最佳的分离效率。因此，利用当前方法和计划方法的粒径比，Method Transfer Tool 自动优化了线速率。此外，如果柱内径发生变化，新流速须根据柱截面的变化进行流速的调整，以保证流动相的线速率不变。可以输入加权因子 (BF)，乘以流速，进一步减少分离时间。如果 $BF = 1$ 时，所得的分离度可实现基线分离。该方法可以通过增加加权因子进行加速，因此增加了流速。图 1 显示了粒径相比较小时，超出最佳线速率也不会引起塔板数的显著降低。注意， $BF \neq 1$ 时，Method Transfer Tool 的分离度计算功能被禁用。

对于即将开始的分离，从 Acclaim 120 C18 4.6×150 mm, $4.5 \mu\text{m}$ 色谱柱变化到 2.1×50 mm, $2.2 \mu\text{m}$ 色谱柱时，流速从 1.5 mL/min 按比例调整到 0.639 mL/min（见图 7），使线速率与柱尺寸和粒径相对应。软件预测化合物 5 和 6 的分离度为 $R = 2.87$ 。实际达到的分离度为 $R = 2.91$ ，与计算结果大致吻合（图 5 的色谱图 B）。

输入加权因子 2.5，对该方法进一步增加流速（图 8）。然后执行该方法，令流速为 1.599 mL/min，分离度 $R = 2.56$ ，仍然符合要求（见图 5 中的放大色谱图 C）。

注意，估算压力超过 8,700 psi (600 bar) 时，Method Transfer Tool 显示警告“检查系统/柱压限”。由于该工具可以与任何 LC 仪器和色谱柱配合使用，我们可以避免意外地施加过高压力。目前，尽管 UHPLC 是一项成熟技术，许多所谓的 UHPLC 色谱柱仍不能在高于 8,700 psi 的压力下使用。

Current Method Conditions		☐ Consider Gradient Delay Volume (GDV)	Recommended Method Conditions	
Flow (mL/min)	1.500 mL/min	<< CHANGE PRESSURE UNITS	Boost Factor	2.50 x 0.639 mL/min
Injection Volume (µL)	25.0 µL		Flow (mL/min)	1.599 mL/min ☐ Adjust Flow
Max Pressure	92.0 bar		Injection Volume (µL)	2.1 µL
Number of Samples	20		Estimated Max Pressure	656.1 bar Check system / column pressure limits
Data Collection Rate (Hz)	5.0 Hz		Number of Samples	20
			Data Collection Rate (Hz)	64 Hz

图 9. 采用 Thermo Scientific Method Translate Tool 调整后的数据采集速率的示例。

数据采集速率

色谱峰是精准采集的 30 个数据点集成的结果。从 HPLC 到 UHPLC 的方法转换通常会减少峰体积和峰宽。为了满足 30 个数据点的要求，必须调整数据采集速率。

在假设当前采集速率适用于给定的分离方法前提下，Method Transfer Tool 可根据当前的数据采集速率和输入的两种色谱柱尺寸，计算出新方法的数据采集速率（方程 9）。在当前的示例中，数据采集率从 5 Hz 变成 64 Hz（图 9）。

$$\text{方程 9: } D_{\text{新}} = \frac{D_{\text{旧}}}{\sqrt{\frac{L_{\text{新}} \cdot d_{p, \text{新}}^3}{L_{\text{旧}} \cdot d_{p, \text{旧}}^3}}}$$

式中：

$D_{\text{新}}$ = 调整后的数据采集率 (Hz)

$D_{\text{旧}}$ = 当前数据采集率 (Hz)

$L_{\text{新}}$ = 新色谱柱柱长 (mm)

$L_{\text{旧}}$ = 旧色谱柱柱长 (mm)

$d_{p, \text{新}}$ = 新色谱柱固定相粒径 (µm)

$d_{p, \text{旧}}$ = 旧色谱柱固定相粒径 (µm)

调整进样体积

为了适应新色谱柱尺寸以达到与原方法接近的色谱峰高，需调整进样体积，使进入色谱柱的单位载样量相同，进样体积主要根据色谱柱内径按比例加以调整。此外，与原来的长色谱柱相比，可以预估新色谱柱获得的色谱峰更尖锐，峰宽更窄。调整后的进样体积可根据方程 10 计算得到。

$$\text{方程 10: } V_{\text{inj}} = \frac{V_{\text{inj, 旧}} \cdot V_{\text{column, 新}}}{V_{\text{column, 旧}}}$$

式中，

V_{inj} = 进样体积

一般情况下，建议 UHPLC 方法使用较小的流通池，以尽量减少柱外效应。这种流通池带有较短的光程（取决于制造商和检测器的类型），直接影响检测器的响应。方法转换工具未考虑到这种潜在的差异。在软饮料分析示例中，Acclaim 120 C18 4.6 × 150 mm, 4.5 µm 柱更换为 2.1 × 50 mm, 2.2 µm 柱时，进样体积从 25 µL 按比例调整到 2.1 µL（见图 7）。

预测背压

若通过减小粒径和柱径以及增加流速来加速当前方法，则意味着柱压的升高。柱两端的压差可以利用 Kozeny-Carman 公式⁷求得近似值。考虑到柱内径、流速和粒径的变化，新方法的压降利用 Method Transfer Tool 进行预测，然后乘以加权因子。在方法转换过程中，认为流动相的粘度不变。所计算的压力只是一个近似值，并未考虑标称粒径分布和实际粒径分布（依柱制造商而定）。

在软饮料分析示例中，在 2.1 × 50 mm 柱上 $BF = 1$ 时，实际压力从 92 bar 增加到 182 bar (1334 psi 到 2640 psi)，使用 UHPLC 方法， $BF = 2.5$ 时，实际压力增加到 460 bar (6671 psi)。利用 Method Transfer Tool 预测的压力分别为 262 bar 和 656 bar (3,800 psi 和 9,514 psi)。压力计算考虑固定相粒径的变化。在方法转换情况下，压力还受到其他因素的影响，如粒径分布、系统压力、流通池的变化等。采用加权因子等乘法因数时，可明显看出计算压力和实际压力之间的差异。压力计算只是为了给出一个参考值，即对于计划色谱柱，可使用什么样的流速，实际的压力还需要将该流速用于色谱柱以后测得。

梯度曲线的调整

根据梯度-体积原理，梯度曲线必须适应于变化后的色谱柱尺寸和流速。将当前梯度方法输入梯度表。然后对梯度曲线进行相应调整，并创建新的梯度曲线。

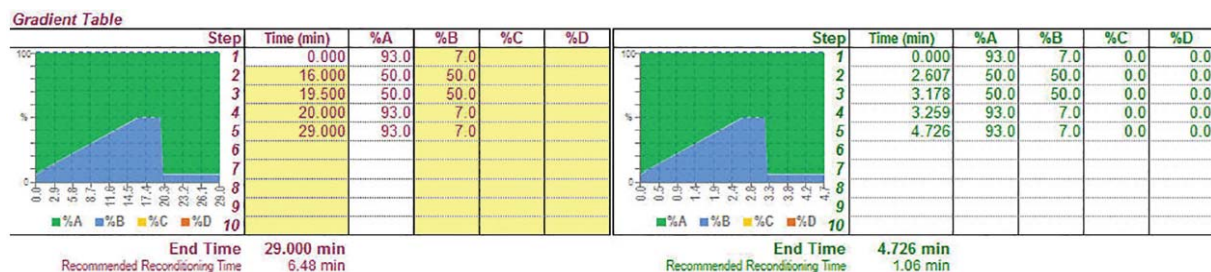


图 10. 根据梯度-体积原则，当前方法（A）的梯度表适合加权法（B）。

当使加权因子 $BF = 1$ 时，软饮料分析的调整梯度表如图 10 所示。根据梯度-体积原则，由于色谱柱尺寸从 $4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ （填充 $4.5 \mu\text{m}$ 固定相）变化到 $2.1 \times 50 \text{ mm}$, $2.2 \mu\text{m}$ ，流速从 1.5 mL/min 减少到 0.639 mL/min ，所以总运行时间从 29.0 min 减少到 4.73 min 。当使加权因子 $BF = 2.5$ ，分离时间进一步减少到 1.89 min 。梯度时间相应地进行了调整。图 5 中显示洗脱顺序的变化，在方法转换过程中可以保持梯度的分离性能。

Method Transfer Tool 的附加功能

除了本技术指南的背景部分介绍的方法调整流动相组成适应梯度延迟体积以外，Transfer Tool 还可以补偿 GDV 差异。激活工具中的“考虑梯度延迟体积 (GDV)”复选框，出现新行，此处当前方法和计划方法均可以输入 GDV。假设当前方法在 GDV 为 $1000 \mu\text{L}$ 的四元液相系统中运行。当 $BF = 1$ 时，应用将被转换到 GDV 为 $400 \mu\text{L}$ 的二元液相系统中。计算者将该值与最佳 GDV 进行对比（方程 11）。

$$\text{方程 11: } t_D = \frac{V_{GDV} - V_{GDV, \text{opt}}}{F}$$

式中：

t_D = 进样延迟和/或附加梯度步的延迟 (min)

$V_{GDV, \text{opt}}$ = 最佳梯度延迟体积 (μL)

V_{GDV} = 输入的梯度延迟体积 (μL)

F = 流速 ($\mu\text{L/min}$)

在本例中，较大的 GDV 不仅影响色谱柱中实际的流动相比例，还影响色谱柱平衡时间。因此，建议延迟进样并延长平衡时间。请注意，在图 11 的示例中，建议的延迟进样时间 (0.517 min) 和最后增加的平衡时间相同 ($5.244 - 4.727 \text{ min}$)。

Method Transfer Tool 显示新应用方法的最佳 GDV 为 $70 \mu\text{L}$ 。当 GDV 为 $50 \mu\text{L}$ 时（小于最佳 GDV），梯度比原来的方法更容易影响色谱结果。利用方程 11，Method Transfer Tool 可以通过延迟梯度时间为梯度延迟较小的系统做自动补偿。如果线性梯度的开始时间为 0 分，计算工具就在进样后引入一段等度时间（图 12）。因此，Method Transfer Tool 可确保用户可以确认目标 GDV，补偿方法转换的微小差异，实现方法间的无缝转换。需要特别注意的是，根据梯度体积原则，柱外体积必须使用与 GDV 相同的因数按比例进行缩小。柱外体积的定义是在没有色谱柱的情况下，自动进样器和检测器之间的体积。自动进样器后的所有连接管直径必须降至最低值。这样才能确保即使使用常规的 HPLC 也能有效应用 UHPLC 色谱柱。

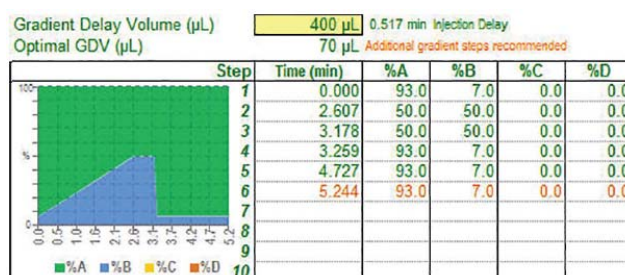


图 11. GDV 较大时，计划方法采用延迟进样和增加平衡时间。

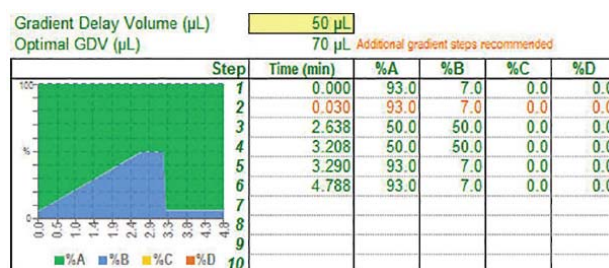


图 12. 进样后，Translator Tool 通过增加一段等度洗脱对较低的 GDV 加以补偿。如果线性梯度开始时间为 0 分钟，则增加一个梯度洗脱。

10 建议采用的平衡时间

根据输入的色谱柱参数，计算色谱柱平衡时间。建议的色谱柱平衡时间，用于典型的反相梯度分析。具有挑战性的梯度应用可能需要大大延长平衡时间。

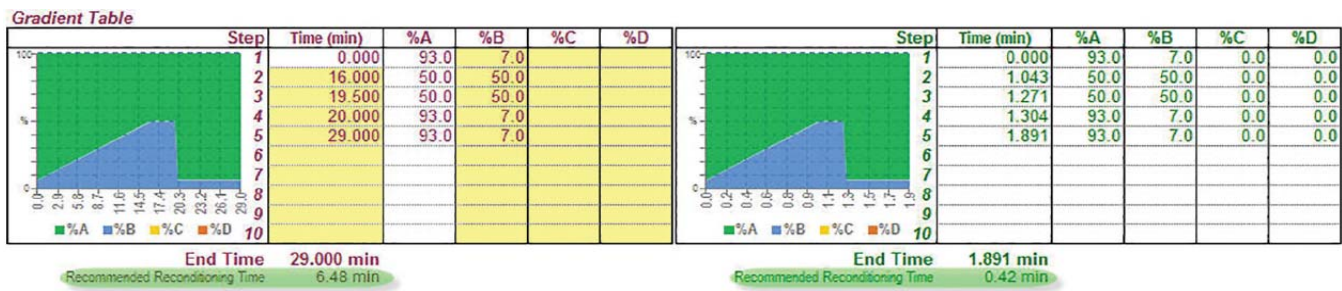


图 13. 建议采用的平衡时间在梯度表下方。

两个不同场景的计算有所不同。

考虑梯度延迟体积（方程 12）时：

在不考虑梯度延迟体积时，采用方程 11：

方程 11: $t_D = \frac{V_{GDV} - V_{GDV,opt}}{F}$

方程 12: $T_{Reg} = \frac{5 \cdot CV \cdot \epsilon_T + GDV}{F}$

式中：

T_{Reg} = 平衡时间 (min)

CV = 几何柱体积 (mL)

ϵ_T = 0.65；平均总孔隙度

TOTALS		TOTALS		SAVING	
Eluent Usage	870.00 mL	Eluent Usage	60.46 mL	=	93%
Time	580.0 min	Time	37.8 min	=	93%
Sample Usage	500.00 µL	Sample Usage	42.07 µL	=	92%
					Throughput x15.3

图 14. 利用 Method Transfer Tool 计算的当前（紫色）和计划（绿色）方法的分析时间、洗脱液使用量和样品用量。由于方法转换而节省的流动相、样品和时间采用突出显示。

消耗和节省

快速方法具有几点优势：更快的分离分析速度、更少的流动相和样品消耗。这三点优势显示在梯度表正下方的 Method Translation Tool 中。在将计算时间、洗脱液和样品用量时，需要将样品个数也考虑在内（见图 7）。

软饮料分析示例中，将 HPLC 方法转换成 UHPLC 方法节省了 93% 的流动相和 92% 的样品。采用 $BF = 1$ ，样品处理量增加了 6.1 倍。与传统 LC 方法相比， $BF = 2.5$ 时，较高的流速使处理量增加了 15.3 倍（图 14）。

结论

本技术指南介绍了从 HPLC 方法到 UHPLC 方法转换所需的理论背景。Thermo Scientific Method Transfer Tool 使不同方程之间相当复杂的转换关系更容易理解，同时支持 12 种操作语言。除了基本参数，它还提供了有价值的功能，即关于如何处理变化的梯度延迟体积、数据采集速率的调整，以及色谱柱平衡时间的调整，使其成为对于任何 HPLC 或 UHPLC 用户来说都具有价值的工具。该工具是免费的，可以在[这里](#)下载。

参考文献

1. Halász, I.; Ende, R.; Asshauer, J. J. Chromatogr., A 1975, 112, 37–60.
2. Snyder, L.R.; Dolan, J.W.; Grant, J.R. J. Chromatogr., A 1979, 165, 3–30.
3. Gilroy, J.J.; Dolan, J.W. LC/GC Europe, 2004, 17(11), 566–572.
4. Schellinger, A.P.; Carr, P.W. J. Chromatogr., A 2005, 1077, 110–119.
5. Poole, C.F. The Essence of Chromatography; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 2003; pp 44–46.
6. Hanai, T.T. HPLC: A Practical Guide; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1999; pp 25–26.
7. Bear, J. Dynamics of Fluids in Porous Media; Dover: Mineola, NY, 1988.

www.thermoscientific.com/dionex

©2013 Thermo Fisher Scientific Inc. 保留所有权利。ISO 为 International Standards Organization 的商标。所有其它商标的所有权均归 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。本文件信息旨在呈现 Thermo Fisher Scientific 的产品能力，不鼓励以侵犯他人知识产权的任何方式使用这些产品。产品规格、术语以及定价有可能随时变更。并非各个产品在所有国家均有售。详情请咨询当地销售代表。



Thermo Fisher Scientific,
Sunnyvale, CA USA 通过
ISO 9001:2008 认证。

非洲+43 1 333 50 34 0	丹麦+45 70 23 62 60	日本+81 6 6885 1213	俄罗斯/独联体 +43 1 333 50 34 0
澳大利亚+61 3 9757 4300	欧洲-其他+43 1 333 50 34 0	韩国+82 2 3420 8600	新加坡+65 6289 1190
奥地利+43 810 282 206	芬兰+358 9 3291 0200	拉美 +1 561 688 8700	瑞典+46 8 556 468 00
比利时+32 53 73 42 41	法国+33 1 60 92 48 00	中东+43 1 333 50 34 0	瑞士 +41 61 716 77 00
巴西 +55 11 3731 5140	德国+49 6103 408 1014	荷兰+31 76 579 55 55	台湾 +886 2 8751 6655
加拿大 +1 800 530 8447	印度+91 22 6742 9494	新西兰 +64 9 980 6700	英国/爱尔兰+44 1442 233555
中国 800 810 5118 (国内免费电话)	意大利+39 02 950 591	挪威+46 8 556 468 00	美国 +1 800 532 4752
400 650 5118			

TN70828_E 11/13S

Thermo
SCIENTIFIC

Thermo Fisher Scientific 旗下品牌