

使用沃特世方法转换计算器比手动计算工作流程更快速、更轻松地缩放使用不同粒径色谱柱的方法

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Jamie Kalwood, Kim Haynes

摘要

在填充粒径不同的颗粒、采用不同色谱柱配置（内径和柱长）的色谱柱上缩放既有的分析方法时，需要在实验室之外付出相当长的时间去计算等效的方法条件。缩放梯度方法时，需要进行的计算包括重新确定流速、梯度时间和进样体积。分析人员可以根据适用的公式手动执行这些计算，也可以借助合适的工具（例如沃特世方法转换计算器）。本应用简报考察了两种缩放工作流程：先使用适当的方法缩放公式，根据理论手动按比例缩小实验，然后使用沃特世方法转换计算器生成按比例缩小的条件，并重复实验。手动计算的结果与沃特世方法转换计算器给出的结果高度吻合，证明沃特世方法转换计算器能够有效地缩放方法，显著节省时间，减少潜在的计算错误和/或不确定性。

优势

- 使用沃特世方法转换计算器，以最少的用户输入快速缩放方法
- 自动计算新方法所需的值
- 根据输入的信息为系统驻留体积要求提供指导

简介

在很多情况下，我们都需要将反相液相色谱(RPLC)方法缩放到填充不同粒径的色谱柱。要将使用高通量色谱柱（亚2 μm 左右的颗粒）开发的方法转移到常规质量控制(QC)环境常用，或者制备级液相色谱工作流程前几个步骤常用的色谱柱（ $\geq 3 \mu\text{m}$ 颗粒），通常需要将方法放大到粒径更大的色谱柱。人们开发方法时通常使用亚2 μm 颗粒，目的是充分利用这些小粒径颗粒效率更高的优势，尽可能提高分离速度。但是，这些小粒径色谱柱并不总是适用于QC环境。稳健性和重现性对QC环境至关重要，而使用亚2 μm 颗粒可能会为此带来挑战，因为此类色谱柱需要配合运行压力上限较高的仪器使用，且如果不适当净化样品，填充亚2 μm 颗粒的色谱柱往往易被样品辅料或内源性化合物堵塞。将方法缩小为使用较小粒径的色谱柱（从5 μm 缩小至 $< 5 \mu\text{m}$ ）是很常规的操作。美国药典(USP)各论中的液相色谱方法就是这样一个例子，为了追求缩短样品运行时间、减少溶剂用量和降低成本的优势，这些方法经常被缩小至粒径更小的色谱柱1-4。需要注意的是，将方法放大为制备级方法时需要执行的计算与本文所述的不同。制备级工作流程的侧重点与分析级工作流程不同，因此有单独的处理方式。

本应用简报考察了执行缩放实验的工作流程。我们会将使用5 μm 颗粒色谱柱的理论方法缩小至2.5 μm 颗粒色谱柱，模拟对现有方法进行现代化改进的过程。这个过程将通过两个不同的工作流程来完成。首先，使用《USP通则<621>色谱法》指定的公式手动执行缩放计算。接下来，使用沃特世方法转换计算器缩放同一方法，并将所得值与手动计算的结果进行比较。

结果与讨论

《USP通则<621>色谱法》概述了在不同粒径和尺寸的色谱柱之间正确缩放方法所需的计算。该章节还针对经过验证的方法制定了必须遵守的额外要求，不过这些要求对本应用简报中的实验并不适用。要正确缩放方法（无论放大还是缩小），首先都需要计算新方法的流速。除进样体积外，所有后续计算都会用到新色谱柱的流速。公式1显示了如何计算新流速，其中 F_2 是新流速， F_1 是原始流速， d_{c_x} 是色谱柱内径， d_{p_x} 是色谱柱粒径。在本例中，任何下标为1的变量都与原始方法的条件相关联，任何下标为2的变量都与新方法的条件相关联。

$$F_2 = F_1 * \left[\frac{dc_2^2 * dp_1}{dc_1^2 * dp_2} \right]$$

F_1 = 原始流速

F_2 = 调整后的/新流速

dc_1 = 原始色谱柱内径

dc_2 = 新色谱柱内径

dp_1 = 原始色谱柱粒径

dp_2 = 新色谱柱粒径

公式1.新流速的计算公式，考虑了原始流速以及原始色谱柱和新色谱柱的尺寸和粒径。

上面的公式考虑了两根色谱柱的内径和粒径，确保对两者施加正确的线速度。通过匹配两根色谱柱的线速度，可使被测分析物与固定相相互作用的时间相同，从而产生相当的结果。

本应用简报将缩放利培酮这种药物的有机杂质分析方法。如USP各论中所述，使用4.6 x 250 mm, 5 μ m色谱柱，原始流速设置为2 mL/min⁵。新色谱柱尺寸为3.0 x 100 mm，填充2.5 μ m颗粒。代入数值计算新流速，结果表明新流速应为1.70 mL/min，如图1所示。

$$t_{G2} = t_{G1} * \left(\frac{F_1}{F_2} \right) [(L_2 * dc_2^2) / (L_1 * dc_1^2)]$$

t_{G2} = 新梯度时间(min)
 t_{G1} = 原始梯度时间(min)
 F_1 = 原始流速(mL/min)
 F_2 = 新流速(mL/min)
 L_1 = 原始色谱柱柱长(mm)
 L_2 = 新色谱柱柱长(mm)
 dc_1 = 原始色谱柱内径(mm)
 dc_2 = 新色谱柱内径(mm)

图1.使用原始色谱柱的值和新色谱柱尺寸，根据公式1计算 F_2

。

确定新流速后，下一步是计算新的运行时间，也称为梯度时间。该计算对梯度和等度分析都适用，但梯度测试还需要执行额外的计算，尤其是计算梯度比率。《USP通则<621>色谱法》概述了计算新梯度时间 t_{G2} 的公式，如下方所示⁶。和之前一样，公式中任何带下标1的变量都与原始测试条件相关联，任何带下标2的变量都与新条件相关联。变量 t_{Gx} 表示梯度时间， F_x 表示流速， L_x 表示色谱柱柱长， dc_x 表示色谱柱内径。

$$t_{G2} = t_{G1} * \left(\frac{F_1}{F_2} \right) [(L_2 * dc_2^2) / (L_1 * dc_1^2)]$$

t_{G2} = 新梯度时间(min)
 t_{G1} = 原始梯度时间(min)
 F_1 = 原始流速(mL/min)
 F_2 = 新流速(mL/min)
 L_1 = 原始色谱柱柱长(mm)
 L_2 = 新色谱柱柱长(mm)
 dc_1 = 原始色谱柱内径(mm)
 dc_2 = 新色谱柱内径(mm)

公式2.使用色谱柱柱长(L)、内径(dc)、流速(F)和原始梯度时间(t_{G1})计算新的梯度时间(t_{G2})

代入利培酮有机杂质分析方法的值计算 t_{G2} ，得到新的梯度时间为10 min，如图2所示。原始分析时间为50 min，更新后的分析时间为10 min，缩小方法后可将运行时间缩短为原来的五分之一，进而提高样品通量。

$$t_{G2} = t_{G1} * \left(\frac{F_1}{F_2}\right) * [(L_2 * dc_2^2)/(L_1 * dc_1^2)]$$

$$t_{G2} = 50 * \left(\frac{2.00}{1.70}\right) * [(100 * 3.0^2)/(250 * 4.6^2)]$$

$$t_{G2} = 50 * (1.176) * [(900)/(5290)]$$

$$t_{G2} = 50 * (1.176) * 0.170$$

$$t_{G2} = 10.00$$

图2.使用公式2，利用原始方法条件的值、原始色谱柱尺寸、计算得到的新色谱柱流速和新色谱柱尺寸计算 t_{G2} 。

对于等度分析，最后要计算的是进样体积。但对于梯度方法，计算进样体积之前还需要执行其他步骤，包括确定梯度时间比率并将该比率应用于原始梯度表，得到新的梯度表。使用前面的 t_{G2} 和 t_{G1} 值即可轻松计算出梯度时间比率。在本例中，梯度比率为10/50（即0.2）。该比率随后可应用于梯度表中的每一步，如表1所示。

原始梯度时间	区段时间	梯度比率	调整后的区段时间	调整后的梯度时间
0.00	-	0.20	-	0.00
12.00	11.99		2.40	2.40
18.00	6.00		1.20	3.60
25.00	7.00		1.40	5.00
35.00	10.00		2.00	7.00
40.00	5.00		1.00	8.00
42.00	2.00		0.40	8.40
50.00	8.00		1.60	10.00

表1.将梯度比率应用于原始梯度表，根据调整后的区段时间计算出调整后的（或新的）梯度时间。

对于梯度中的每一步，都必须计算区段时间。请看表1的第一行和第二行，第一个区段时间为12.00，因为这是第一步与第二步之间的时间差值。使用区段时间而不是梯度时间进行调整至关重要，因为梯度比率仅适用于梯度的各个区段或“步骤”。查看调整后的区段时间和调整后的梯度时间，可以看到调整后的梯度时间是前一行调整后的梯度时间与调整后的区段时间之和。梯度最后一步的调整后梯度时间应与之前计算出的 t_{G2} 值相匹配，本例就是如此。

既然新的梯度表、梯度时间和流速都已确定，接下来就可以计算新的进样体积了。这个步骤独立于之前的计算，可在需要时执行。公式3展示了如何根据原始进样体积(V_{inj1})、色谱柱柱长(L_x)和色谱柱内径(d_{c_x})调整进样体积。和前文中的公式一样，任何带下标1的变量都与原始条件相关联，任何带下标2的变量都与调整后的条件相关联。

$$V_{inj2} = V_{inj1} * (L_2 * dc_2^2) / (L_1 * dc_1^2)$$

V_{inj2} = 新进样体积

V_{inj1} = 原始进样体积

L_1 = 原始色谱柱柱长

L_2 = 新色谱柱柱长

dc_1 = 原始色谱柱内径

dc_2 = 新色谱柱内径

公式3.根据原始色谱柱和新色谱柱的尺寸以及原始进样体积计算调整后的进样体积

原始测试条件是在4.6 x 250 mm色谱柱上进样10 μ L。如前文所述，新色谱柱的规格是3.0 x 100 mm。图3展示了新进样体积的计算过程。

$$V_{inj2} = V_{inj1} * (L_2 * dc_2^2) / (L_1 * dc_1^2)$$

$$V_{inj2} = 10 * (100 * 3.0^2) / (250 * 4.6^2)$$

$$V_{inj2} = 10 * (900) / (5290)$$

$$V_{inj2} = 1.7$$

图3.使用公式3，利用原始进样体积值、原始色谱柱尺寸和新色谱柱尺寸计算 V_{inj2} 。

完成所有计算后，分析人员现在可以使用大致成型的新条件在新色谱柱上运行分析，确定能否获得相当的色谱结果。手动执行这些计算需要花费大量时间和精力，对于还得额外调整梯度表的复杂梯度方法而言尤其如此。此外，手动计算这些参数有可能引入人为错误，而任何轻微的计算错误都可能导致结果出现巨大差异，并最终影响测试条件。简化方法缩放工作流程不仅可以缩短计算时间，还可以减少出现人为错误的可能性。简化此工作流程最简单直接的方法是使用计算工具。沃特世方法转换计算器是一款免费软件，可根据用户输入的关键信息（例如色谱柱尺寸、粒径、流速和梯度曲线）计算新的方法条件。我们沿用前文中的示例，在方法转换计算器中输入这些值，将方法从4.6 x 250 mm, 5 μm色谱柱缩小至3.0 x 100 mm, 2.5 μm色谱柱。图4所示为方法转换计算器界面和缩放实验的结果。

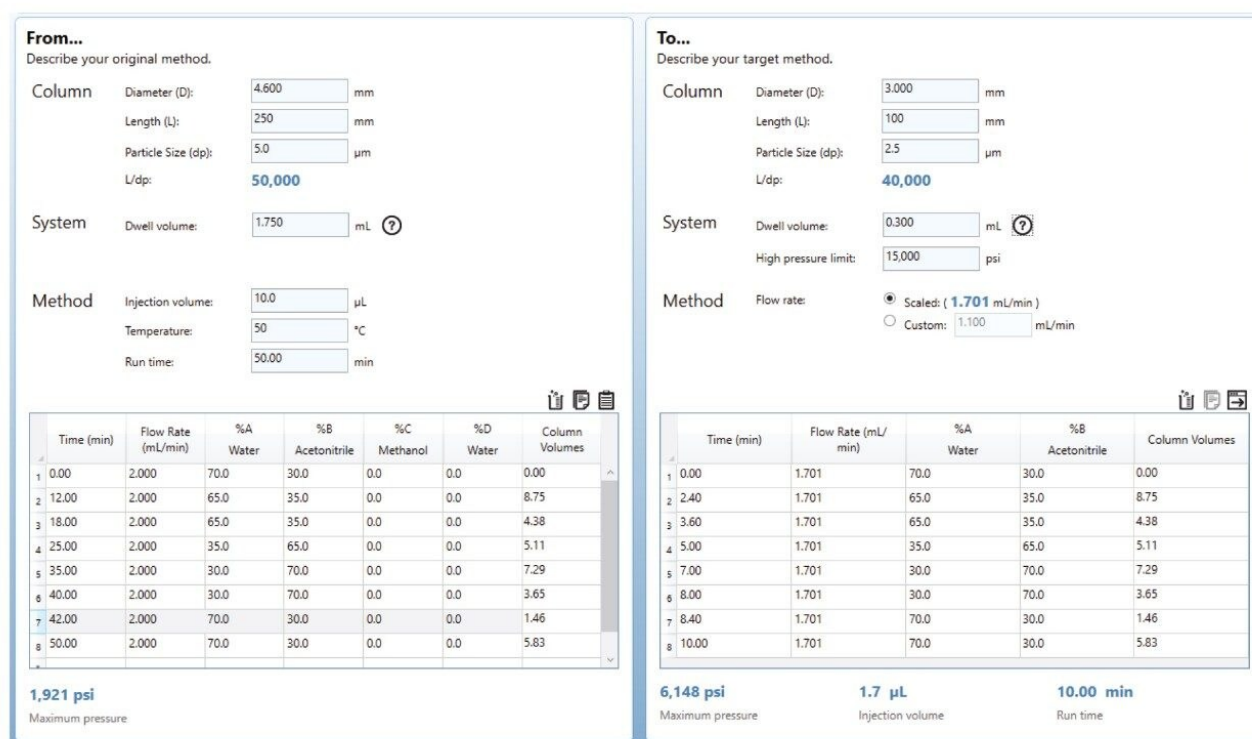


图4.使用沃特世方法转换计算器将方法从4.6 mm x 250 mm, 5 μm色谱柱缩小至3.0 x 100 mm, 2.5 μm色谱柱

使用沃特世方法转换计算器比手动计算新的测试条件要轻松得多。只需在工具左侧输入原始色谱柱尺寸、粒径、进样体积、柱温和运行时间即可。如果是梯度方法，还必须在左侧的梯度表中填写原始测试条件的梯度信息。用户还必须输入系统驻留体积（尤其是对于梯度方法），因为驻留体积会对性能产生相当大的影响。与手动计算不同，在沃特世方法转换计算器中输入系统驻留体积的测定值，将有助于计算器确定缩放方法时不需要额外增加

步骤来补偿不同系统之间的驻留体积差异。而手动计算方法中没有任何针对这方面的公式。系统驻留体积采用一种简单的方法即可轻松测量⁷。

接下来，用户需要在右侧输入新色谱柱的尺寸。如果缩放梯度方法的同时还要更换系统，还必须输入新系统的驻留体积。在此处的示例中，系统从HPLC更改为UPLC，因此我们在工具中输入了系统驻留体积。在本例中，不需要为补偿驻留体积额外增加步骤，但如果需要，计算器会在右下角的运行时间旁边显示这些步骤。

输入这些信息后，计算器将实时执行所有必要的计算。如右侧所示，计算器显示新方法的流速应为1.701 mL/min，总运行时间为10 min。此外，在新的测试条件下需要进样1.7 μ L的样品。这三个值都与之前的手动计算结果一致。查看右侧的新梯度表可进一步确定，梯度也与手动计算出的梯度表值相匹配。

鉴于这两种方法缩放方案得到的结果相同，第二种方案的真正优势在于节省了时间并降低了出错的可能性。使用沃特世方法转换计算器可以消除计算过程中的疑虑，让分析人员快速缩放方法并恢复样品分析。

结论

为了确保新的方法条件能得到与原始条件相似的色谱结果，缩放RPLC分析方法的前期工作可能相当繁重。前期工作包括计算各种参数，包括进样体积、流速和运行时间。如果是缩放梯度方法，为了确保梯度斜率和梯度的各个区段与原方法相当，还得调整梯度表。《USP通则<621>色谱法》中概述的这些计算方法非常复杂，完成计算需要耗费一定的时间和精力。手动计算这些值可能引入人为错误，导致测试的条件有误，进而浪费时间和成本。

沃特世方法转换计算器是一款免费工具，用户只需输入很少的信息即可执行这些计算，有助于减少出现人为错误的可能性，同时大幅加快计算速度。分析人员只需输入某些关键值（例如色谱柱尺寸和原始方法条件），计算器就能计算出新的流速、运行时间和梯度表。沃特世方法转换计算器是一款多用途工具，方法放大和缩小实验均适用。为了证明这一点，我们分别采用手动方案和沃特世方法转换计算器对同一种方法进行了缩放。

参考资料

1. Berthelette K, Turner JE, Walter TH, Haynes K. 按照USP <621>指导原则使用MaxPeak™Premier HPS技术对USP专论中关于对乙酰氨基酚杂质分析的梯度HPLC方法进行现代化改进，沃特世应用纪要，[720007846ZH](#)，2023年2月27日访问。

2. Berthelette K, Nguyen JM, Turner JE, Savage D. USP专论方法现代化助力节省成本和缩短用时：使用UHPLC/UPLC仪器和色谱柱转换HPLC方法，沃特世应用纪要，[720007427ZH](#)，2023年2月27日访问。
3. Dlugasch AB, Simeone J, McConville PR. Scaling a USP Gradient Method on the ACQUITY Arc System in Support of Lifecycle Management. Waters Application note. [720006620](#), Accessed 27-Feb-2023.
4. Sehajpal J, Fairchild JN, Swann T. USP Method Modernization for Lidocaine Formulations using XBridge Columns and Different LC Systems. Waters Application note. [720006179](#), Accessed 27-Feb-2023.
5. Risperidone USP monograph. Accessed 20-Feb-2023.
https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-46A907B2-576F-4C97-8BA1-6C17E8249978_4_en-US?source=Activity <https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-46A907B2-576F-4C97-8BA1-6C17E8249978_4_en-US?source=Activity>
6. USP General chapter <621>. Accessed 20-Feb-2023.
https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_6_en-US?source=TOC <https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_6_en-US?source=TOC>
7. 如何确定系统驻留体积？ – WKB50707. 沃特世知识共享平台文章. 2023年2月27日访问. https://cn-support.waters.com/KB_Chem/Other/WKB50707_How_do_I_determine_system_dwell_volume <https://support.waters.com/KB_Chem/Other/WKB50707_How_do_I_determine_system_dwell_volume

720007887ZH, 2023年7月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号