

应用纪要

快速梯度方法从二元HPLC转移至Arc HPLC系统

Paula Hong

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报介绍了快速梯度方法从传统HPLC系统到Arc HPLC系统的转移。与二元HPLC系统相比，四元Arc HPLC系统具有更高的进样精度和保留时间重复性。

优势

- 快速梯度方法从二元HPLC转移至四元Arc HPLC系统
- 利用Arc HPLC系统在HPLC分析中获得高进样精度

简介

随着资源的全球化，不同实验室和地理位置之间的方法转移成为人们日益关注的领域。虽然许多科学家更倾向于在类似的系统之间转移方法，但这并非始终可行。使用不同类型的泵（四元泵与二元泵）会影响组分的保留时间，而包括进样精度等其它方面的特性则与样品管理器有关。无论采用哪种系统，对于所有方法而言，进样精度和保留时间精度都是重要的性能特征。在本例中，我们展示了快速梯度方法从传统的二元HPLC系统到Arc HPLC系统的可转移性及其对关键分析性能的影响。

结果与讨论

由于梯度延迟或延迟体积、梯度输送机制以及两种溶剂管理器之间混合方式（高压与低压）的差异，二元与四元系统之间的方法转移面临独特的挑战。尽管某些方法更适合采用某一种泵¹，但许多常规HPLC方法在任一系统上都符合系统适应性标准。具体而言，这些方法都处于两种泵的性能规格范围内，包括起始%A和B以及流速。在这些条件下，方法通常可以转移，并且如果使用绝对保留时间标准，则可能仅需要调整延迟体积。

在本例中，我们将小分子混合物的快速梯度分离方法从传统的二元HPLC系统转移到Waters Arc HPLC系统。这种非常快速的梯度方法容易受到混合模式和梯度延迟体积变化的影响。比较分离结果，发现两种系统之间的保留时间存在偏移（图1和表1）。该偏移与这两种特定系统之间的梯度延迟体积差异（约0.200 mL）有关。虽然绝对保留时间可能是分离的一个关键方面，但通常使用相对保留时间来减少延迟体积对峰确认或鉴定的影响。在本例中，以苯戊酮作为参比化合物比较相对保留时间，结果表明这两种方法的选择性相同。

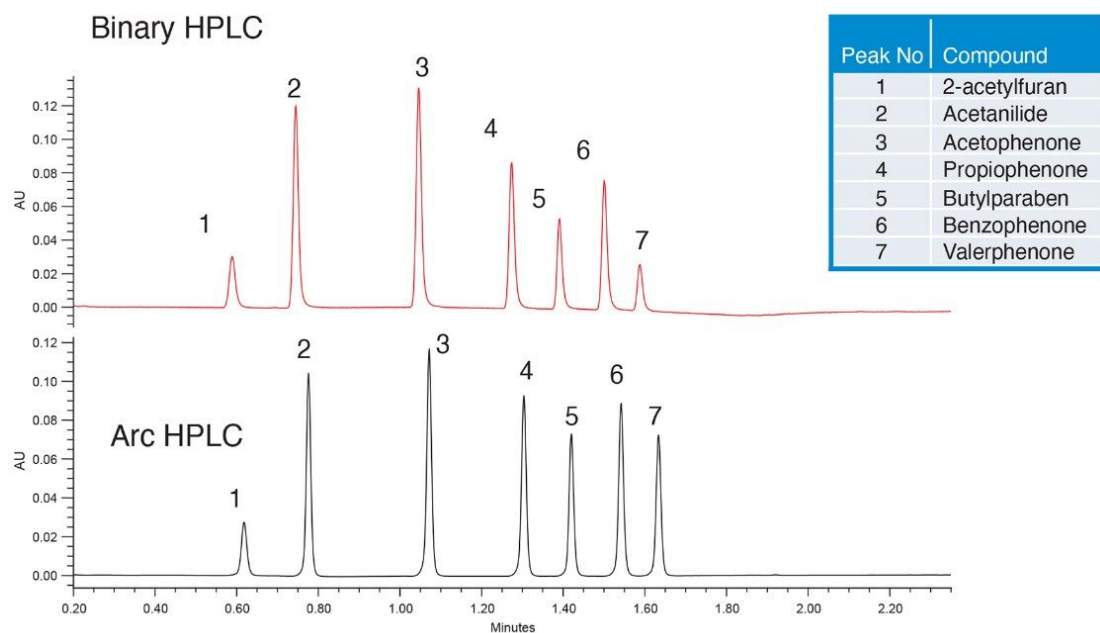


图1.小分子快速梯度分离法从二元HPLC系统到Arc HPLC系统的方法转移。梯度条件为：流动相B在1.5 min内由10%增加至80%，其中A为水，B为乙腈。用90/10水/乙腈稀释沃特世标准品，进样体积为20 μ L。分离效果保持一致，包括相对保留时间和USP分离度。相对峰面积因样品稳定性而异。

Compound	Retention time		RRT		USP resolution	
	Arc HPLC	Agilent 1110	Arc HPLC	Agilent 1100	Arc HPLC	Agilent 1100
2-acetylfuran	0.642	0.589	0.38	0.37	n/a	n/a
Acetanilide	0.80	0.74	0.48	0.47	5.91	6.00
Acetophenone	1.11	1.05	0.66	0.66	11.58	13.00
Propiophenone	1.34	1.27	0.80	0.80	8.80	9.50
Butylparaben	1.45	1.39	0.87	0.88	4.33	5.10
Benzophenone	1.58	1.50	0.94	0.95	4.70	4.80
Valerphenone	1.67	1.59	1.00	1.00	3.45	3.70

表1.在二元HPLC和Arc HPLC系统上进行快速梯度分离所得到的保留时间和USP分离度比较

其它色谱特性（包括两次分离的USP分离度）进一步证实了分离效果（图1和表1）。虽然某些USP分离度值略有差异，但所有峰均实现了良好分离，USP分离度均高于2.0。两套系统的USP拖尾因子为1.0-1.3，处于可接

受范围内。某些差异可能是由细微的系统差别（例如，接头和预加热器）引起的。此外，两次分析执行的时间点不同，且使用了两种不同的特定色谱柱和样品前处理方法。因此，不能排除柱间差异，因为它对基本色谱性能具有细微影响。

考虑到不同系统在梯度延迟体积方面存在差异，在方法转移过程中通常允许对梯度延迟进行调整²。为确保在两套系统上获得相同的分离结果，使用智能梯度起点相对于进样序列调整梯度起始点，无需修改梯度表³。根据所得结果，将梯度开始时间调整为进样前0.05 min。这样可以减小Arc HPLC系统的延迟体积，并且绝对保留时间与二元HPLC系统更接近，从而无需使用相对保留时间(RRT)（图2）。

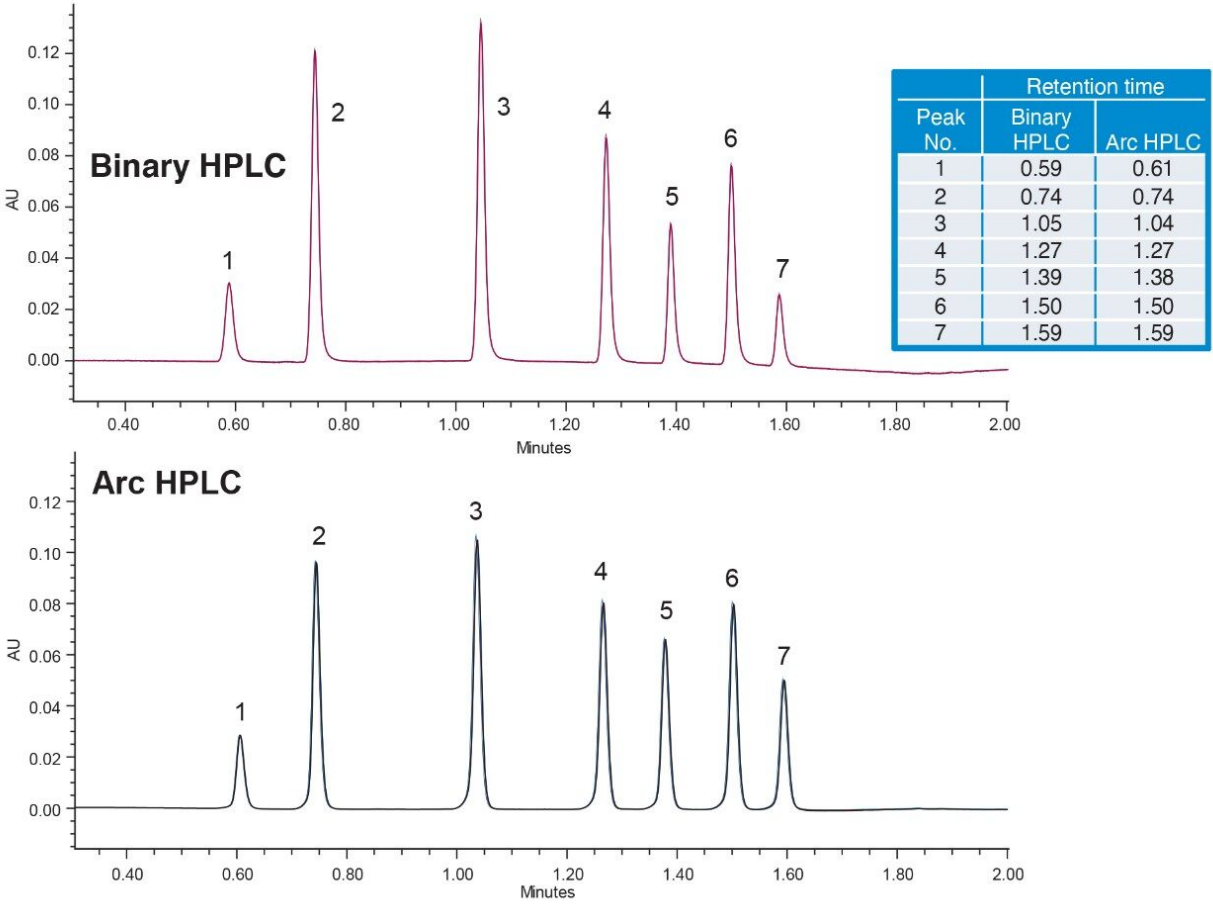


图2.将方法从二元HPLC系统转移到Arc HPLC系统并进行延迟体积调整得到的六次重复进样的叠加色谱图。使用智能梯度起点调整Arc HPLC系统的梯度延迟，以获得与二元HPLC相当的保留时间。执行六次重复进样以评估保留时间和峰面积精度。相对峰面积因样品稳定性而异。

为同时评估泵和样品管理器的精度，在每套系统上进行六次重复进样。如前文所述，保留时间精度与流动相输送系统有关，而峰面积精度或进样精度则受样品管理器性能的影响。比较这两套系统可以发现，每套系统的保

留时间标准偏差很小 (<0.002 min或7 μ L)，完全处于此类快速方法的典型规格范围内，表明无论使用何种泵，均可实现可重现的流动相输送。峰面积%RSD证明Arc HPLC系统样品管理器在进样体积为20 μ L时具有高精度，其值<0.2%（图3）。

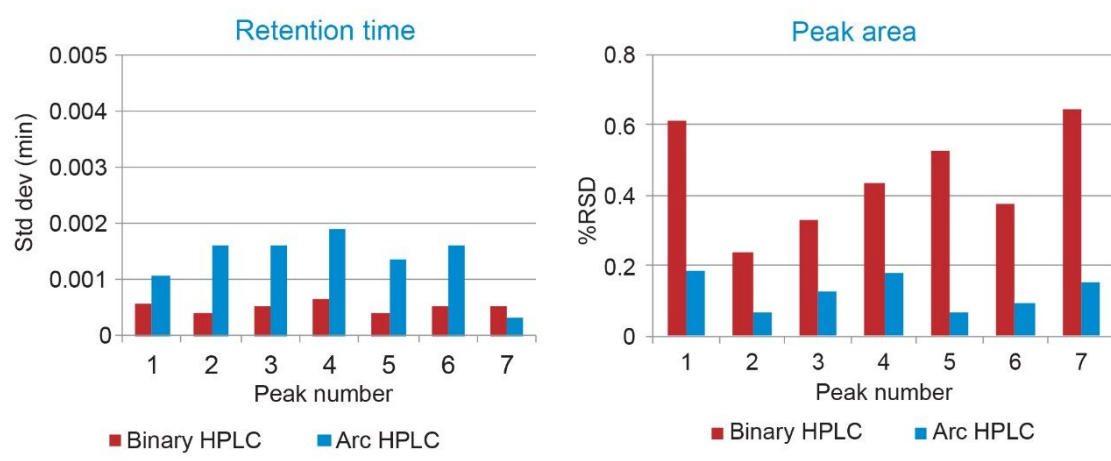


图3.在二元HPLC和Arc HPLC系统上采用快速梯度方法得到的保留时间标准偏差和进样精度比较。图中所示为六次重复进样所得结果。

结论

对于许多典型的HPLC方法，从二元系统转移到四元系统能够产生相当的结果。具体而言，利用4.6 $\times$ 50 mm色谱柱进行棘手的快速梯度分离方法转移表现出相似的保留时间和分离结果。由于每个泵的梯度延迟不同，观察到绝对保留时间存在细微差异，因此需要评估相对保留时间。使用智能梯度起点相对于进样序列调整梯度起始点后，在两套系统上观察到相当的绝对保留时间。利用两种泵均观察到较高的保留时间精度，标准偏差小于1 s或7 μ L，而Arc HPLC系统的进样精度则优于传统的二元LC系统。

参考文献

1. Simeone, J.、Hong, P.和McConville, P.R., 比较多个厂家二元超高效液相色谱系统运行长时间缓梯度时的性能，沃特世应用纪要，[720006369ZH](#) <

<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134994149> , 2018.

2. <621> CHROMATOGRAPHY. In United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 39 NF34), United Book Press, Inc.: Baltimore, MD, 2016, 459–471.

3. Hong, P. and McConville, P.R. Using Gradient SmartStart Technology and an ACQUITY UPLC H-Class System to Emulate an Agilent 1100 Series LC System Separation for Impurity Testing. Waters Application Note, [720005332EN](#) <<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=134851594>> , 2015.

特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/135068659>>

720006943ZH, 2020年6月