



培训教程

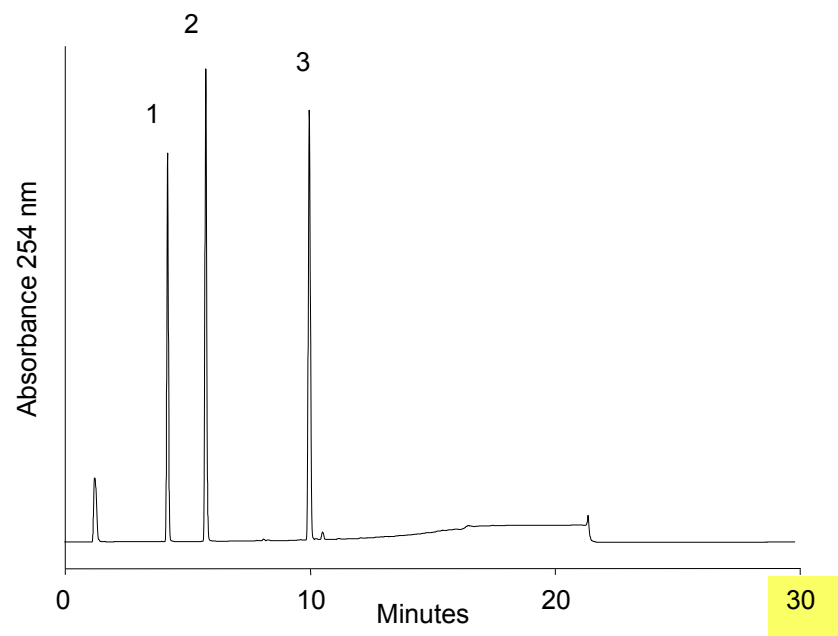
H-Class 基础



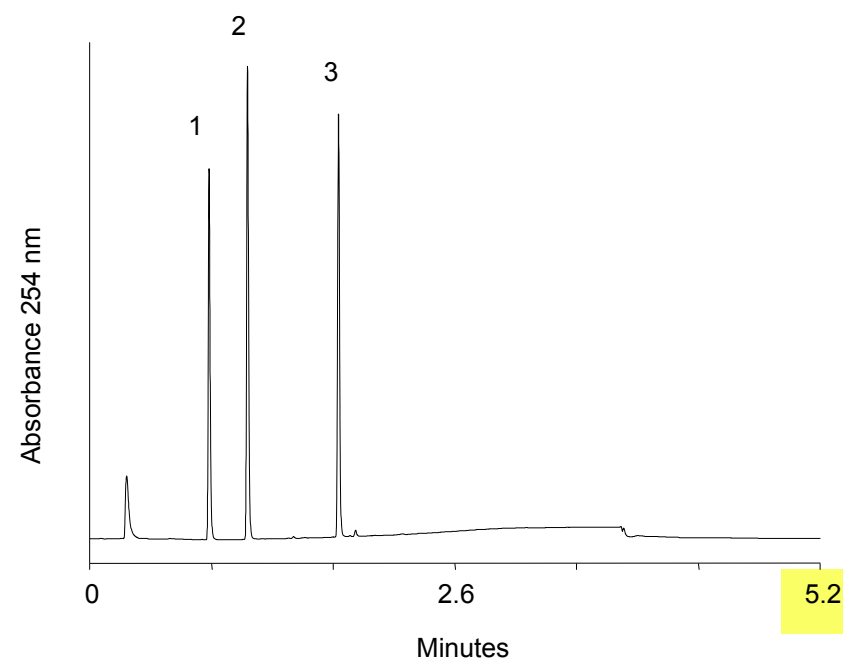
- 四种类别的 HPLC 方法转换包括：
 - 长柱转换为短柱
 - 从一个色谱柱品牌转换到另一个品牌
 - 从一个系统转换为另一个不同的系统
 - 同时转换系统和色谱柱
- 方法转换到 UPLC 系统且使用 UPLC 柱时,UPLC的好处才能够完全体现
 - 需要同时转换系统和色谱柱

从HPLC 转换到 UPLC

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



原始 **30 分钟 HPLC图**



转换后 **5.2 分钟 UPLC图**

实现方法转换：HPLC 到 UPLC

- UPLC将会同时提高速度、灵敏度和分离度
- 详细地描述HPLC方法将会大大简化转换过程
- 系统地转换会得到最好的结果

关于方法转换的特别提示

- 新的UPLC方法可能会与原来的HPLC方法有所不同....
 - 操作条件, 比如, 流速
 - 运行时间
 - 表现
- 但是, 新的UPLC™方法必须达到HPLC方法的目标要求
 - 相关被分析物的完全分离
 - 峰纯度
 - 确切地鉴别峰
 - 定量的准确度和精密度

成功进行方法转换的步骤

- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标色谱柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

所需的信息:原始方法

- 色谱柱
 - 色谱柱化学(键合配体, 品牌, 粒径大小)
 - 柱内径
- 色谱条件
 - 流动相
 - 流速
 - 梯度表: 包括再生和再平衡
 - 温度
- 样品
 - 稀释
 - 浓缩
 - 分子量
 - 进样体积

所需的信息:原始结果

- 色谱图
 - 峰数目
 - 保留
 - 分离度
- 定量
 - 检测限
 - 定量限
 - 线性范围
 - 准确度
 - 精密度

成功进行方法转换的步骤

- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

- 等度方法
 - 不同仪器之间的系统体积差异影响较小
 - 可以直接通过几何缩放的形式转换
- 梯度方法
 - 不同仪器之间的系统体积差异对转换影响很大

- 我们假定:
 - 溶剂总是以程序所设定的流速流动
 - 百分比组成总是以设定值变化
 - 梯度按照所设定的梯度表而运行
 - 溶剂组成可以按照所设定的时间达到色谱柱

- 然而, 色谱系统的不同会影响:
 - 保留时间
 - 灵敏度
 - 重新平衡的时间

- 梯度形成的模式
 - 配有梯度比例阀的单泵
 - 双泵
 - 品牌和型号
- 系统体积（死体积或滞后体积）
 - 值和测量所用方法
- 进样机理
- 检测模式

例:原始方法

- 室温: 21- 22℃
- 流速: 1.50 mL/min
- 分析样品: 咖啡因 (100 μ g/mL)
氢化奎尼丁 (33 μ g/mL)
3-氨基二苯酮(39 μ g/mL)
- 分子量: 小于 500 amu
- 样品稀释剂: 二甲基亚砷(DMSO)
- 进样体积: 10 μ L
- 检测波长: 254nm
- 流动相: A: 0.05% TFA 水溶液
B: 0.05% TFA 乙腈溶液

例:原始的梯度表

| 梯度段 | 时间 | 流速 | %A | %B | 曲线 |
|-----|----|-----|----|----|----|
| 起始 | 0 | 1.5 | 95 | 5 | * |
| 2 | 15 | 1.5 | 5 | 95 | 6 |
| 3 | 20 | 1.5 | 5 | 95 | 1 |
| 4 | 30 | 1.5 | 95 | 5 | 1 |

例:原始的色谱柱

- 固定相: XTerra® MS C₁₈
- 粒径: 5 μm
- 内径: 4.6 mm
- 长度: 150 mm



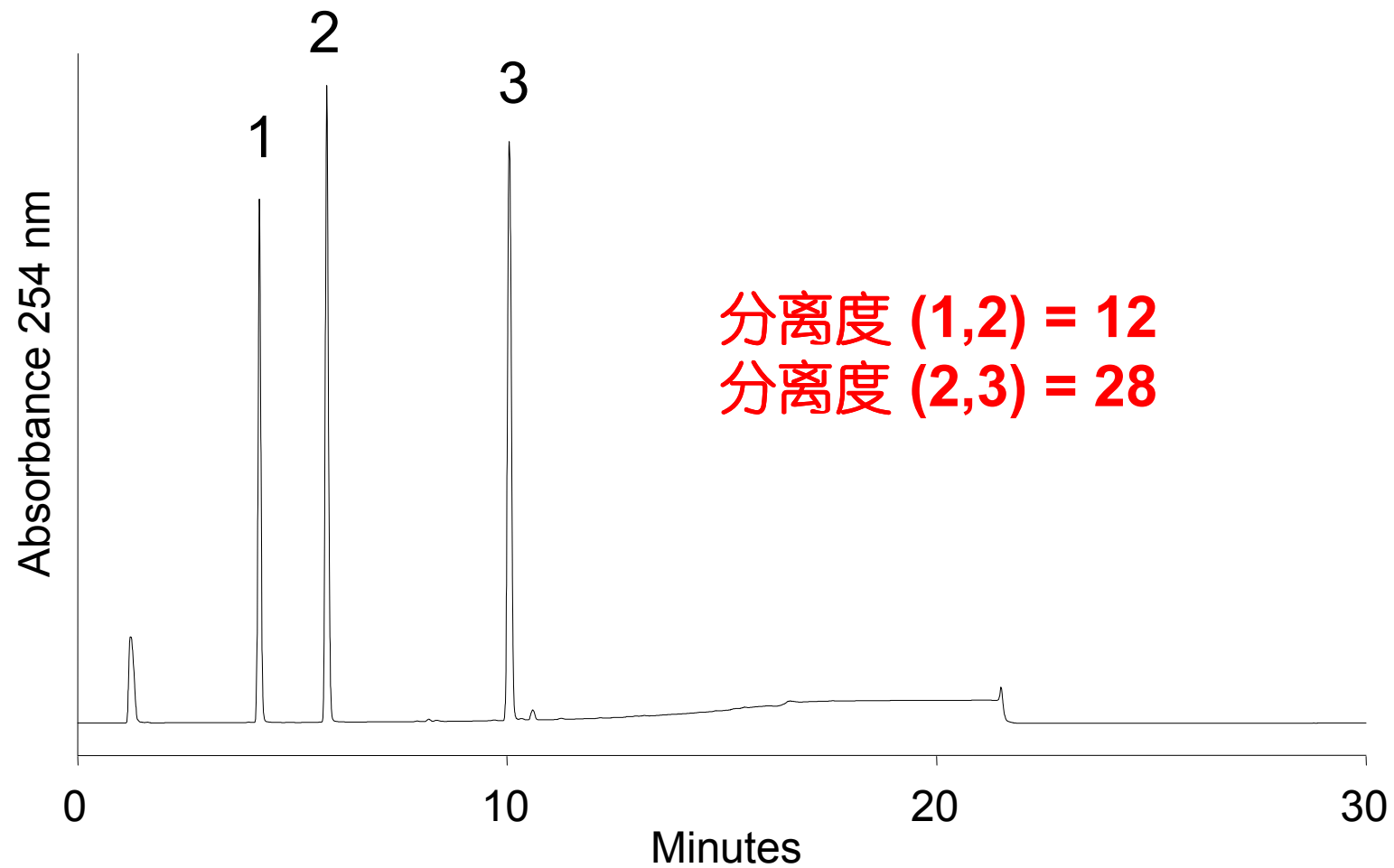
计算: $\frac{L}{dp} = \frac{150,000 \mu\text{m}}{5 \mu\text{m}} = 30,000$

例:原始的仪器

- Waters Alliance® 2695 溶剂管理器
— 低压混合的单泵梯度
- Waters Alliance® 2695 样品管理器
- Waters 2487 TUV / 254nm



例:原始的结果



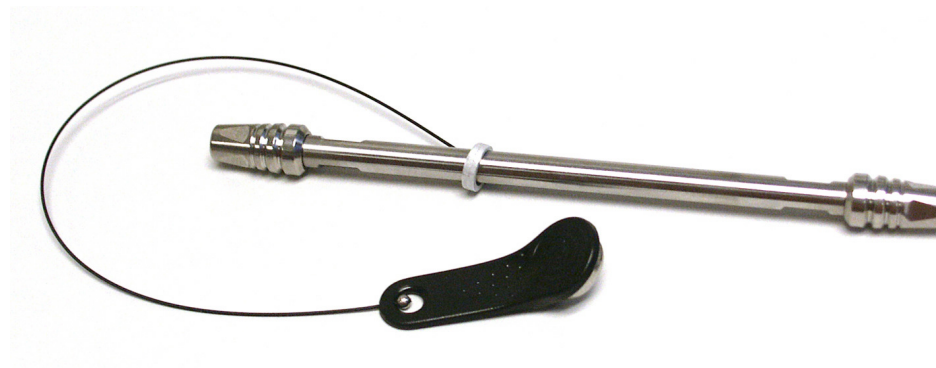
- Alliance® 2695 = 1.04 ml
- ACQUITY UPLC™ = 0.109 ml
- 这将会给方法转换带来什么不同吗?
 - Alliance 2695 使用 4.6 x 150 mm 色谱柱
 - ACQUITY UPLC™ 使用 2.1 x 50 mm 色谱柱

成功进行方法转换的步骤

- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标色谱柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

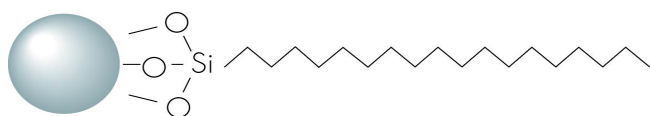
目标柱 : ACQUITY UPLC 柱

- 键合相
 - ACQUITY UPLC BEH C₁₈
 - ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈
 - ACQUITY UPLC BEH C₈
 - ACQUITY UPLC BEH Phenyl
- 查看色谱柱选择性表找到与之前的柱子最相近的

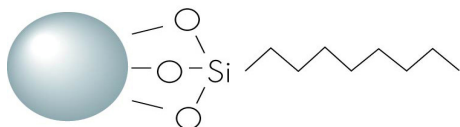


ACQUITY UPLC 柱

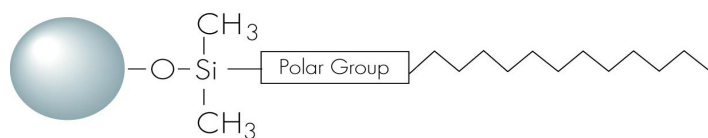
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



ACQUITY UPLC BEH C₁₈

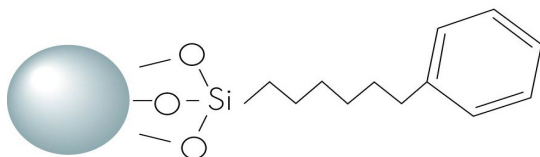


ACQUITY UPLC BEH C₈



ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈

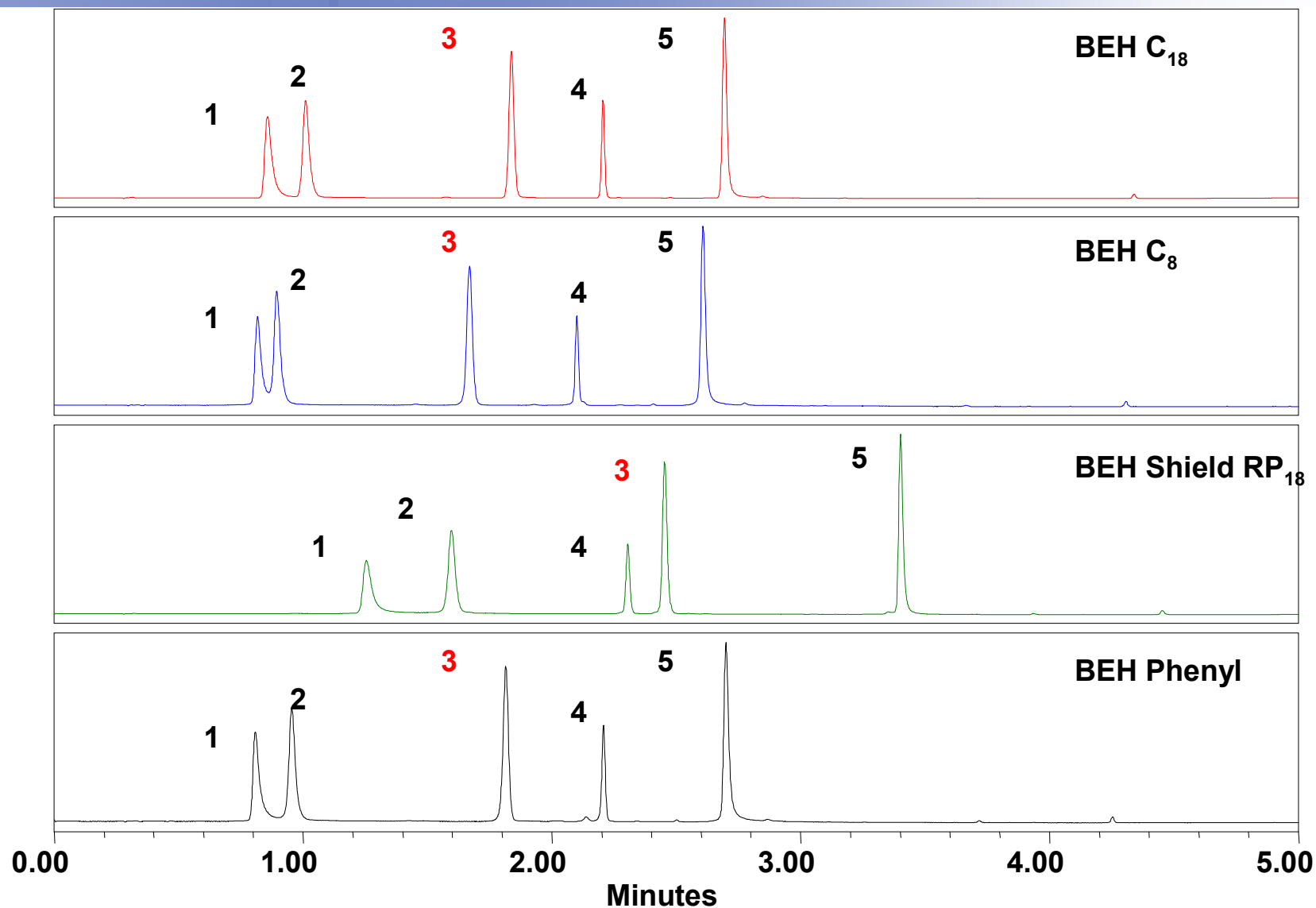
Waters 专利技术
(氨基甲酸酯极性基团嵌入)



ACQUITY UPLC BEH Phenyl

配体选择性 紫海胆中的咖啡酸衍生物

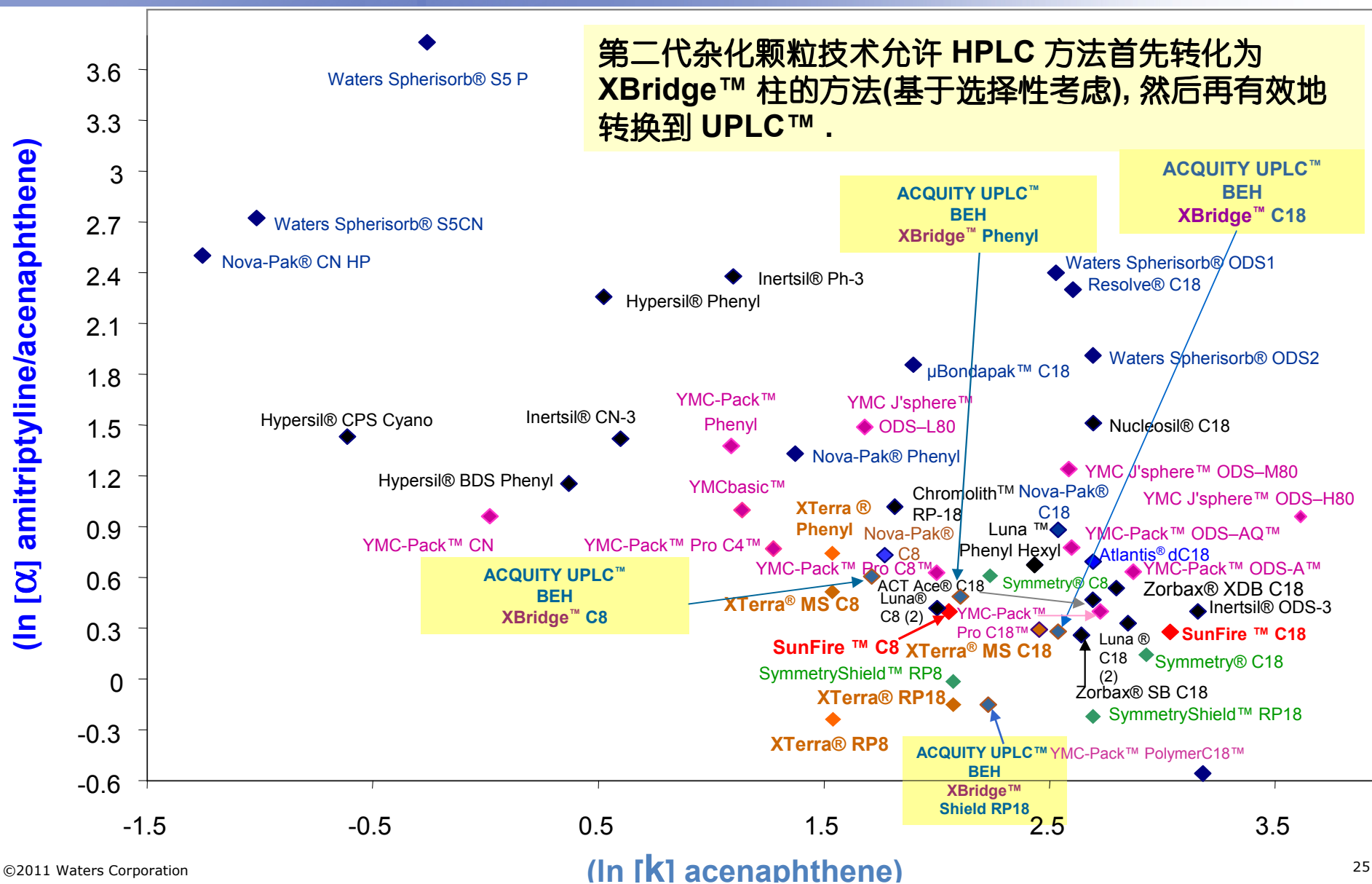
Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



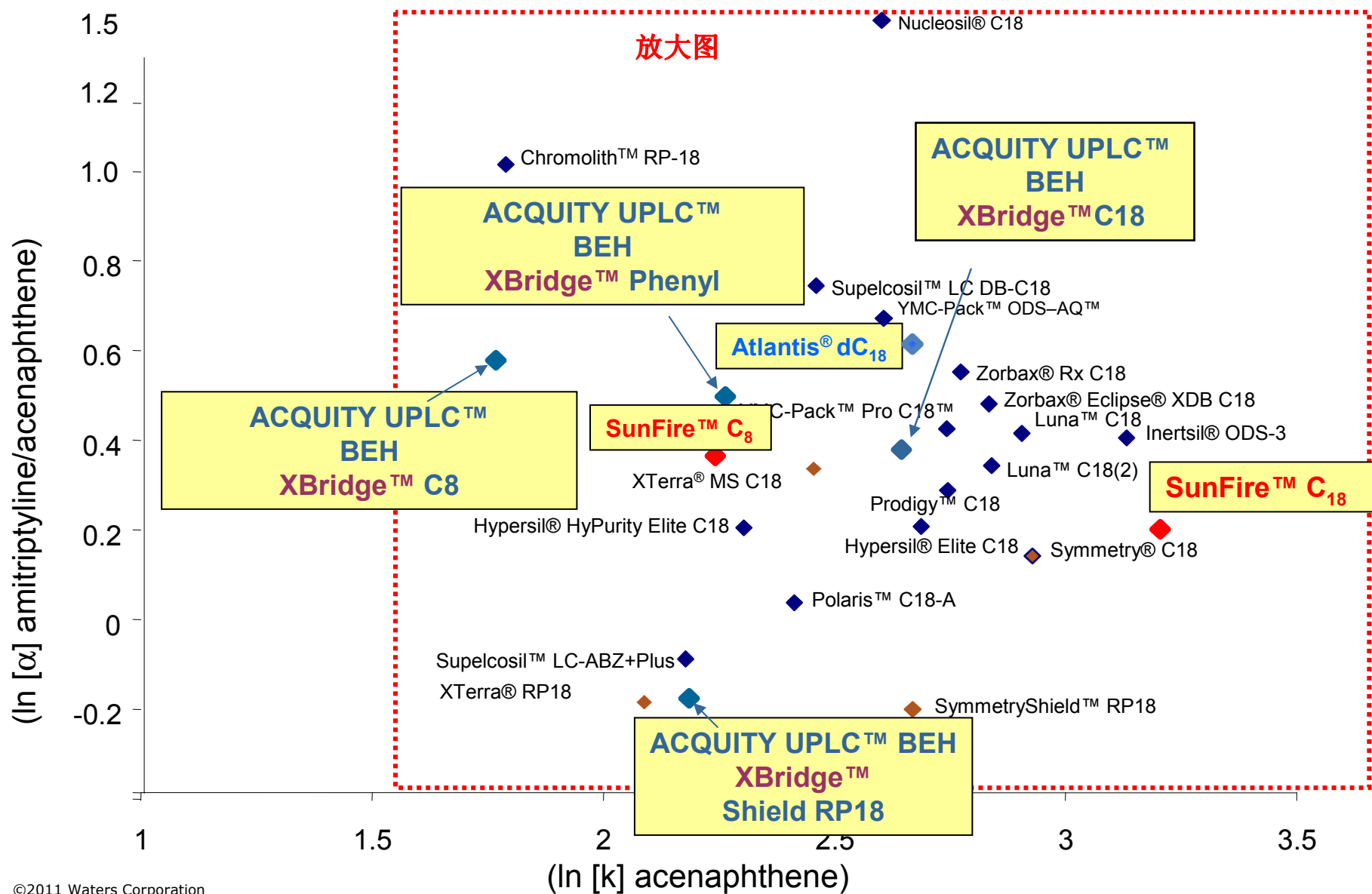
用来测量残留硅羟基活性的组分

- 二氢茚（中性组分）的保留取决于填料中化学键合相的疏水性
 - 填料的疏水性越高,保留因子 (k) 值越高.
- 阿米替林(碱性组分, $pka=9.4$)的保留取决于两个因素:化学键合相的疏水性和残留硅羟基的活性及浓度（碱性化合物较难分析的一个很好的例子）

反相柱选择性表



现代 “C₁₈ 区域”



■ 内径

- 通常用 2.1mm
- 只有在特殊情况下用 1.0mm
 - 严格的样品限量
 - 流路直接接至MS

■ 柱长

- 如果主要目标是速度
 - 以50 mm 柱长为起点 ($L/dp = 29,500$)
- 如果主要目标是分离度
 - 以100 mm 柱长为起点 ($L/dp = 58,900$)

目标柱规格 ACQUITY UPLC柱

- 从 4.6 x 150 mm XTerra MS C18 (5 μm 颗粒) 柱缩放到 2.1 x 50 mm ACQUITY UPLC BEH C18 柱 (1.7 μm 颗粒)

成功进行方法转换的步骤

- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

- 参数
 - 流动相
 - 温度
 - 几何缩放
 - 进样量
 - 流速
 - 等度方法只需要调整流速和进样量
 - 梯度曲线
- 几何缩放的目的是为了减少评估和优化转换方法所带来的变化

- 用完全相同的流动相
 - 添加剂
 - pH
 - 离子强度
 - 有机溶剂
 - 组成百分比

- 只有在评估几何转换之后需要优化时再做修改

目标条件:温度

- 温度直接影响每一个色谱机理
- 在方法转换当中温度一定要保持一致
- 溶剂预热是必需的
 - 溶剂在原来柱中的时间是**1.66**分钟
 - 溶剂在优化的目标柱中的时间是**15**秒
 - 热传递的时间很少
- **ACQUITY UPLC™** 柱稳定装置可用于调谐大约**0.5 到 0.75 mL/min**的流速

目标条件:进样量

- 用完全相同的样品
 - 同样的浓度
 - 同样的稀释倍数
- 计算对应于柱体积的进样体积

4.6 x 150 mm



20 μ L 进样量/2.49 mL = 0.8%

2.1 x 50 mm



20 μ L 进样量/0.17 mL = 12%

$$\text{目标进样体积} = \text{原来的进样体积} \times \frac{\text{目标柱体积}}{\text{原始柱体积}}$$

缩放 10 μL 进样量从 4.6 x 150 mm 到 2.1 x 50 mm

$$10 \mu\text{L} \times \frac{3.14 \times 1.1^2}{3.14 \times 2.3^2} \times \frac{50}{150} =$$

$$10 \mu\text{L} \times \frac{0.17}{2.49} = 10 \mu\text{L} \times 0.068$$
$$= 0.7 \mu\text{L}$$

目标条件：进样量

- 用同样的样品
 - 同样的浓度
 - 同样的稀释倍数
- 计算对应于柱体积的进样体积
 - 建议在ACQUITY UPLC™ 上的最小进样体积为0.5 - 1μL
 - 如果计算出的进样体积太小
 - 用起始强度的流动相稀释5-10倍
 - 在2.1 x 50mm 柱上最大进样体积为5μL

目标条件：流速

- 调节流速,由于线速度一定,因此流速与柱内径的平方成比例
- 对于小颗粒的填料可调节线速度

$$\text{目标流速} = \text{原始流速} \times \frac{\pi r_{\text{目标}}^2}{\pi r_{\text{原始}}^2}$$

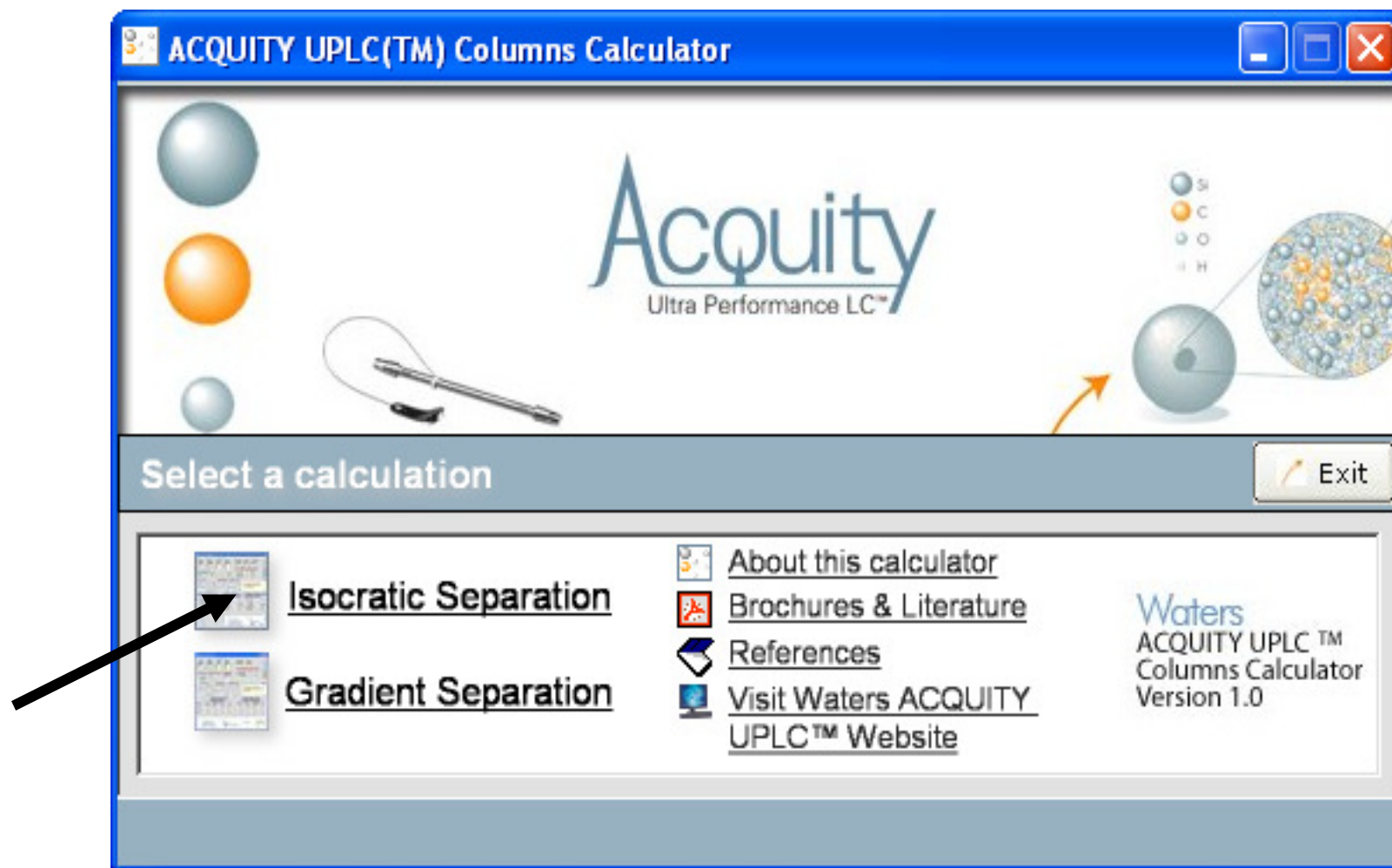
简化为:

$$\text{目标流速} = \text{原始流速} \times \frac{d_{\text{目标}}^2}{d_{\text{原始}}^2}$$

缩放 1.5 mL/min 流速从 4.6x150mm 到 2.1x50mm

$$1.5 \text{ mL/min.} \times \frac{2.1^2}{4.6^2} = 0.31 \text{ mL/min.}$$

等度分离



等度分离

Isocratic Separations

File Run Help

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 |

| Flow Rate | Temperature | Retention Factor |
|---------------|--------------|------------------|
| 1.00 [mL/min] | 30 [Celsius] | 8 [k] |

Solvent Composition

%Aqueous: 100 MeOH %0 MeCN %0

Pressure Units

☒ bar ☐ PSI ☐ MPa

Injection Volume

20 [µL]

Select Maximum Column Pressure: 689 bar **Change**

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.

Calculate Print Reset Exit

Results With Existing Column

N: [] Plates

Run Time: [] min

Pressure*: [] bar

This dialog box will display information as you click on each item's label.

Results | Explanation of Results

| Conditions of Equal Efficiency | | | Conditions of Maximum Efficiency (10 cm Column Length) | | | Conditions of Shortest Analysis Time (5 cm Column Length) | | |
|--------------------------------|------------|-------------|--|-------------|------------|---|------------|--|
| Column Length | [] cm | Max. Plates | [] | Run Time | [] min | Run Time | [] min | |
| Run Time | [] min | Run Time | [] min | Flow Rate | [] mL/min | Flow Rate | [] mL/min | |
| Flow Rate | [] mL/min | Flow Rate | [] mL/min | Pressure* | [] bar | Pressure* | [] bar | |
| Pressure* | [] bar | Pressure* | [] bar | Column ID | [] mm | Column ID | [] mm | |
| Column ID | [] mm | Column ID | [] mm | Inj. Volume | [] µL | Inj. Volume | [] µL | |
| Inj. Volume | [] µL | Inj. Volume | [] µL | | | | | |

HPLC 条件

Isocratic Separations

File Run Help

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Retention Factor |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|-------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 | 23 | 8 |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | [mL/min] | [Celsius] | [k] |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | |

Solvent Composition

%Aqueous 60 MeOH %0 MeCN %40

Pressure Units

☐ bar ☒ PSI ☐ MPa

Injection Volume

10 [µL]

Results With Existing Column

N [] Plates
Run Time [] min
Pressure* [] PSI

Select Maximum Column Pressure 10000 PSI **Change**

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.

Calculate Print Reset Exit

Isocratic retention factor, maximum value = 20. The retention factor is the analysis time divided by the column dead

Zoom

Isocratic Separations

File Run Help

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Retention Factor |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 [mL/min] | 23 [Celsius] | 8 [k] |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | | | |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | |

Solvent Composition

%Aqueous: 60 MeOH %0 MeCN %40

Pressure Units

☐ bar ☒ PSI ☐ MPa

Injection Volume

10 [µL]

Select Maximum Column Pressure 10000 PSI **Change**

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.

Calculate Print Reset Exit

Results With Existing Column

N [] Plates
Run Time [] min
Pressure* [] PSI

Isocratic retention factor, maximum value = 20. The retention factor is the analysis time divided by the column dead

Results | Explanation of Results

| Conditions of Equal Efficiency | | | | Conditions of Maximum Efficiency (10 cm Column Length) | | | | Conditions of Shortest Analysis Time (5 cm Column Length) | | | |
|--------------------------------|--|--------|-------------|--|--------|-------------|--|---|--|--|--|
| Column Length | | cm | Max. Plates | | | Run Time | | min | | | |
| Run Time | | min | Run Time | | min | Plates | | | | | |
| Flow Rate | | mL/min | Flow Rate | | mL/min | Flow Rate | | mL/min | | | |
| Pressure* | | PSI | Pressure* | | PSI | Pressure* | | PSI | | | |
| Column ID | | mm | Column ID | | mm | Column ID | | mm | | | |
| Inj. Volume | | µL | Inj. Volume | | µL | Inj. Volume | | µL | | | |

等度 UPLC 条件

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

等度 UPLC 条件

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

| Results | | | Explanation of Results | | | | | |
|---------------------------------------|-------|--------|---|-------|--------|--|-------|--------|
| <u>Conditions of Equal Efficiency</u> | | | <u>Conditions of Maximum Efficiency (10 cm Column Length)</u> | | | <u>Conditions of Shortest Analysis Time (5 cm Column Length)</u> | | |
| Column Length | 5 | cm | Max. Plates | 21025 | | Run Time | 1.3 | min |
| Run Time | 1.6 | min | Run Time | 8.7 | min | Plates | 8393 | |
| Flow Rate | 0.649 | mL/min | Flow Rate | 0.242 | mL/min | Flow Rate | 0.782 | mL/min |
| Pressure* | 8290 | PSI | Pressure* | 6096 | PSI | Pressure* | 10000 | PSI |
| Column ID | 2.1 | mm | Column ID | 2.1 | mm | Column ID | 2.1 | mm |
| Inj. Volume | 0.7 | μL | Inj. Volume | 1.4 | μL | Inj. Volume | 0.7 | μL |

比传统的“双倍”流速略高一点

原始的梯度表

| 梯度 | 时间 | 流速 | %A | % B | 曲线 | 梯度段 (min) | 梯度段 (cv) |
|---------|----|-----|----|--------|----|--------------|-------------|
| Initial | 0 | 1.5 | 95 | 5 | * | 0 | 0 |
| 2 | 15 | 1.5 | 5 | 95 | 6 | 15 | |
| 3 | 20 | 1.5 | 5 | 95 | 1 | 5 | |
| 4 | 30 | 1.5 | 95 | 5 | 1 | 10 | |

梯度段:用柱体积来描述

对于1.5mL/min 在 4.6 x 150mm 柱上运行15分钟

梯度体积 = 流速 x 时间 = 1.5mL/min x 15min = 22.5mL

柱体积 = $\pi \times r^2 \times L = 3.14 \times 2.3^2 \times 150 = 2.49\text{mL}$

梯度段 (cv) = $\frac{\text{梯度体积}}{\text{柱体积}}$

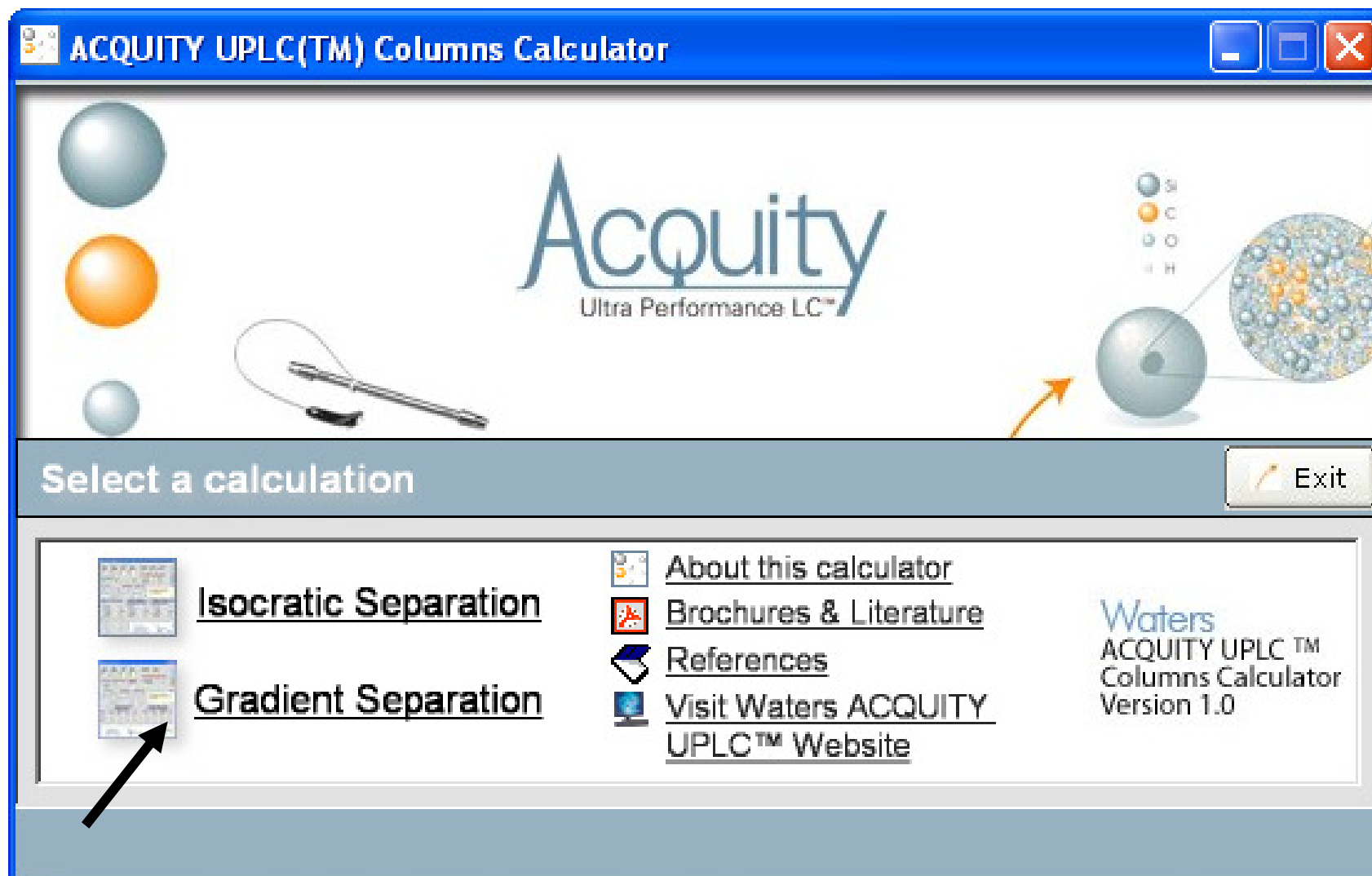
$$\text{梯度段} = \frac{22.5 \text{ mL}}{2.49 \text{ mL}} = 9.03 \text{ cv}$$

原始的梯度表

| 梯度 | 时间 | 流速 | %A | %B | 曲线 | 梯度段 (min) | 梯度段 (cv) |
|---------|----|-----|----|----|----|--------------|-------------|
| Initial | 0 | 1.5 | 95 | 5 | * | 0 | 0 |
| 2 | 15 | 1.5 | 5 | 95 | 6 | 15 | 9.03 |
| 3 | 20 | 1.5 | 5 | 95 | 1 | 5 | 3.01 |
| 4 | 30 | 1.5 | 95 | 5 | 1 | 10 | 6.02 |

梯度分离

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



UPLC 梯度分离

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Injection Volume | Instrument Delay |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.00 [mL/min] | 30 [Celsius] | 20 [µL] | 1.00 [mL] |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | | | | |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | | |

Organic Modifier in B
MeCN %100 ————— MeOH %0

Pressure Units
☒ bar ☐ PSI ☐ MPa

Results With Existing Column
Peak Capacity
Pressure* bar

| Step | Time | Flow | %A | %B | Time Segment (min) | Column Volumes |
|------------|------|------|-----|----|--------------------|----------------|
| Init Cond. | 0.00 | 1.00 | 100 | 0 | 0.00 | - |
| Init Hold | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Select Maximum Column Pressure 689 bar [Change](#)

[Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.](#) [Calculate](#)

Exit
Reset

Acquity Columns Calculator

HPLC 梯度方法

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Injection Volume | Instrument Delay |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|-------------|------------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 | 23 | 10 | 1.00 |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | [mL/min] | [Celsius] | [µL] | [mL] |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | | |

Organic Modifier in B
MeCN %100 ————— MeOH %0

Pressure Units
☐ bar ☒ PSI ☐ MPa

Results With Existing Column
Peak Capacity
Pressure* PSI

| Step | Time | Flow | %A | %B | Time Segment (min) | Column Volumes |
|------------|-------|------|----|----|--------------------|----------------|
| Init Cond. | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 15.00 | 1.50 | 5 | 95 | 15.00 | 13.68 |
| 4 | 20.00 | 1.50 | 5 | 95 | 5.00 | 4.56 |
| 5 | 30.00 | 1.50 | 95 | 5 | 10.00 | 9.12 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Select Maximum Column Pressure 10000 PSI [Change](#)

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices. [Calculate](#)

Acquity Columns Calculator

HPLC 梯度方法

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Injection Volume | Instrument Delay |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|-------------|------------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 | 23 | 10 | 1.00 |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | [ml/min] | [Celsius] | [µL] | [mL] |
| 15 cm | 3.9 mm | | | | | | |

Organic Modifier: MeCN %100

Select Maximum Pressure: 5000 14000 15000 PSI

☐ Set as Default.

OK

Exit
Reset

Acquity Columns Calculator

Select Maximum Column Pressure 10000 PSI [Change](#)

[Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.](#) [Calculate](#)

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Injection Volume | Instrument Delay |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|-----------|-------------|------------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 | 23 | 10 | 1.00 |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | [mL/min] | [Celsius] | [µL] | [mL] |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | | |

Organic Modifier in B
MeCN %100 ————— MeOH %0

Pressure Units
☐ bar ☒ PSI ☐ MPa

Results With Existing Column
Peak Capacity: 119
Pressure*: 1407 PSI

| Step | Time | Flow | %A | %B | Time Segment (min) | Column Volumes |
|------------|-------|------|----|----|--------------------|----------------|
| Init Cond. | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 15.00 | 1.50 | 5 | 95 | 15.00 | 13.68 |
| 4 | 20.00 | 1.50 | 5 | 95 | 5.00 | 4.56 |
| 5 | 30.00 | 1.50 | 95 | 5 | 10.00 | 9.12 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Select Maximum Column Pressure 14000 PSI [Change](#)

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices. [Calculate](#)

Acquity Columns Calculator

UPLC 方法

2.1 mm ID

1.0 mm ID

Gradient Results

Results With Existing Column

| | | | | | |
|-----------------------|------------|------------------|--------|----------------|------|
| Peak Capacity: | 119 | Column Length: | 15 cm | Particle Size: | 5 µm |
| Pressure* [PSI] | 1407 | Column Diameter: | 4.6 mm | MW of Sample: | 200 |

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices | Optimally Scaled UPLC(TM) Method Choices | [Print](#)

Scaled Gradient 2.1 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| Length [cm] | ID [mm] | Flow mL/min | Peak Capacity | Run Time [min] | Pressure* [PSI] | Injection Volume [µL] | Detailed Gradient Profile |
|-------------|---------|-------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| 5 cm | 2.1 | 0.313 | 124 | 5.1 | 3619 | 0.7 | View |
| 10 cm | 2.1 | 0.313 | 180 | 10.1 | 7237 | 1.4 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

Scaled Gradient 1.0 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| Length [cm] | ID [mm] | Flow mL/min | Peak Capacity | Run Time [min] | Pressure* [PSI] | Injection Volume [µL] | Detailed Gradient Profile |
|-------------|---------|-------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| 5 cm | 1.0 | 0.071 | 74 | 5.1 | 3619 | 0.2 | View |
| 10 cm | 1.0 | 0.071 | 129 | 10.1 | 7237 | 0.3 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices

几何缩放到 UPLC 方法

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices | Optimally Scaled UPLC(TM) Method Choices | [Print](#)

Scaled Gradient 2.1 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| <u>Length</u> [cm] | <u>ID</u> [mm] | <u>Flow</u> [mL/min] | <u>Peak</u> Capacity | <u>Run Time</u> [min] | <u>Pressure*</u> [PSI] | <u>Injection</u> Volume [μL] | <u>Detailed</u> Gradient Profile |
|-----------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|--|
| 5 cm | 2.1 | 0.313 | 124 | 5.1 | 3619 | 0.7 | View |
| 10 cm | 2.1 | 0.313 | 180 | 10.1 | 7237 | 1.4 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

2.1 x 50 mm 几何缩放

Geometrically Scaled Gradient: 2.1 X 50 mm

| Step | Time (min) | Flow mL/min | %A | %B | Time Segment [min] | Column Volumes |
|------------|---------------|----------------|----|----|--------------------------|-------------------|
| Init Cond. | 0.00 | 0.313 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 0.313 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 5.00 | 0.313 | 5 | 95 | 5.00 | 13.68 |
| 4 | 6.67 | 0.313 | 5 | 95 | 1.67 | 4.56 |
| 5 | 10.00 | 0.313 | 95 | 5 | 3.33 | 9.12 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Injection Volume: 0.7 µL**P_{max} = 3619 PSI**

Print

调整梯度表到2.1x50 mm柱

在相同线速度下调节流速到 2.1 x 50mm柱

| 梯度 | 时间 | 流速 | %A | %B | 曲线 | 梯度段 (分) | 梯度段 (cv) |
|---------|-------|------|----|----|----|------------|-------------|
| Initial | 0 | 0.31 | 95 | 5 | * | 0 | 0 |
| 2 | 5 | 0.31 | 5 | 95 | 6 | 5.0 | 9.03 |
| 3 | 6.67 | 0.31 | 5 | 95 | 1 | 1.67 | 3.01 |
| 4 | 10.00 | 0.31 | 95 | 5 | 1 | 3.33 | 6.02 |

Gradient Separations

Select your existing HPLC conditions here: © 2005 Waters Corporation

| Column Length | Column Diameter | Particle Size | MW of Sample | Flow Rate | Temperature | Injection Volume | Instrument Delay |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------|------------------|
| 30 cm | 4.6 mm | 10 µm | 100 | 1.50 [mL/min] | 23 [Celsius] | 10 [µL] | 1.00 [mL] |
| 25 cm | 4.0 mm | 8 µm | 200 | | | | |
| 15 cm | 3.9 mm | 5 µm | 300 | | | | |

Organic Modifier in B
MeCN %100 ————— MeOH %0

Pressure Units
☐ bar ☒ PSI ☐ MPa

Results With Existing Column
Peak Capacity: 119
Pressure*: 1407 PSI

| Step | Time | Flow | %A | %B | Time Segment (min) | Column Volumes |
|------------|-------|------|----|----|--------------------|----------------|
| Init Cond. | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 1.50 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 15.00 | 1.50 | 5 | 95 | 15.00 | 13.68 |
| 4 | 20.00 | 1.50 | 5 | 95 | 5.00 | 4.56 |
| 5 | 30.00 | 1.50 | 95 | 5 | 10.00 | 9.12 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Select Maximum Column Pressure 14000 PSI [Change](#)

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices. [Calculate](#)

Exit
Reset

Acquity Columns Calculator

UPLC 方法

2.1 mm ID

1.0 mm ID

Gradient Results

Results With Existing Column

Peak Capacity: 119 Column Length: 15 cm Particle Size: 5 µm
Pressure* [PSI]: 1407 Column Diameter: 4.6 mm MW of Sample: 200

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices | Optimally Scaled UPLC(TM) Method Choices | [Print](#)

Scaled Gradient 2.1 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| Length [cm] | ID [mm] | Flow mL/min | Peak Capacity | Run Time [min] | Pressure* [PSI] | Injection Volume µL | Detailed Gradient Profile |
|-------------|---------|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
| 5 cm | 2.1 | 0.313 | 124 | 5.1 | 3619 | 0.7 | View |
| 10 cm | 2.1 | 0.313 | 180 | 10.1 | 7237 | 1.4 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

Scaled Gradient 1.0 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| Length [cm] | ID [mm] | Flow mL/min | Peak Capacity | Run Time [min] | Pressure* [PSI] | Injection Volume µL | Detailed Gradient Profile |
|-------------|---------|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
| 5 cm | 1.0 | 0.071 | 74 | 5.1 | 3619 | 0.2 | View |
| 10 cm | 1.0 | 0.071 | 129 | 10.1 | 7237 | 0.3 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices

用传统的“加倍”法转到UPLC方法

Geometrically Scaled UPLC(TM) Method Choices | Optimally Scaled UPLC(TM) Method Choices | [Print](#)

Scaled Gradient 2.1 mm Column
(HPLC Linear Velocity)

| Length [cm] | ID [mm] | Flow mL/min | Peak Capacity | Run Time [min] | Pressure* [PSI] | Injection Volume [μL] | Detailed Gradient Profile |
|----------------|------------|----------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 5 cm | 2.1 | 0.313 | 124 | 5.1 | 3619 | 0.7 | View |
| 10 cm | 2.1 | 0.313 | 180 | 10.1 | 7237 | 1.4 | View |

[Change Flow](#) [Calculate](#) [HPLC Linear Velocity](#) [UPLC\(TM\) Linear Velocity](#)

UPLC 流速 0.6 ml/min

用传统的“加倍”法转到UPLC方法

| Geometrically Scaled Gradient: 2.1 X 50 mm | | | | | | |
|--|------------|-------------|----|----|--------------------|----------------|
| Step | Time (min) | Flow mL/min | %A | %B | Time Segment [min] | Column Volumes |
| Init Cond. | 0.00 | 0.600 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 0.600 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 2.61 | 0.600 | 5 | 95 | 2.61 | 13.68 |
| 4 | 3.47 | 0.600 | 5 | 95 | 0.87 | 4.56 |
| 5 | 5.21 | 0.600 | 95 | 5 | 1.74 | 9.12 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Injection Volume: 0.7 µL **Pmax = 6945 PSI**

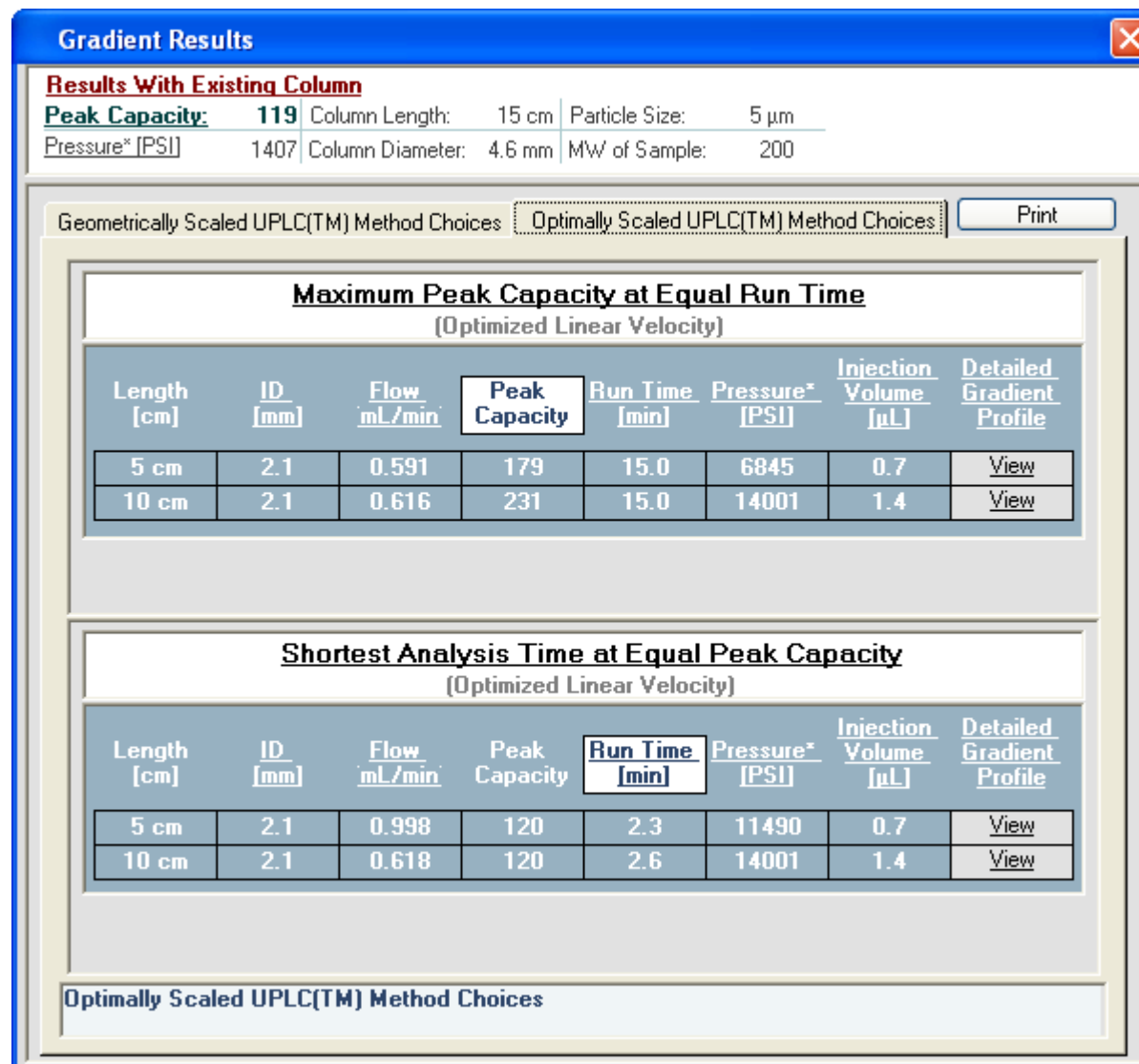
Print

UPLC 转换

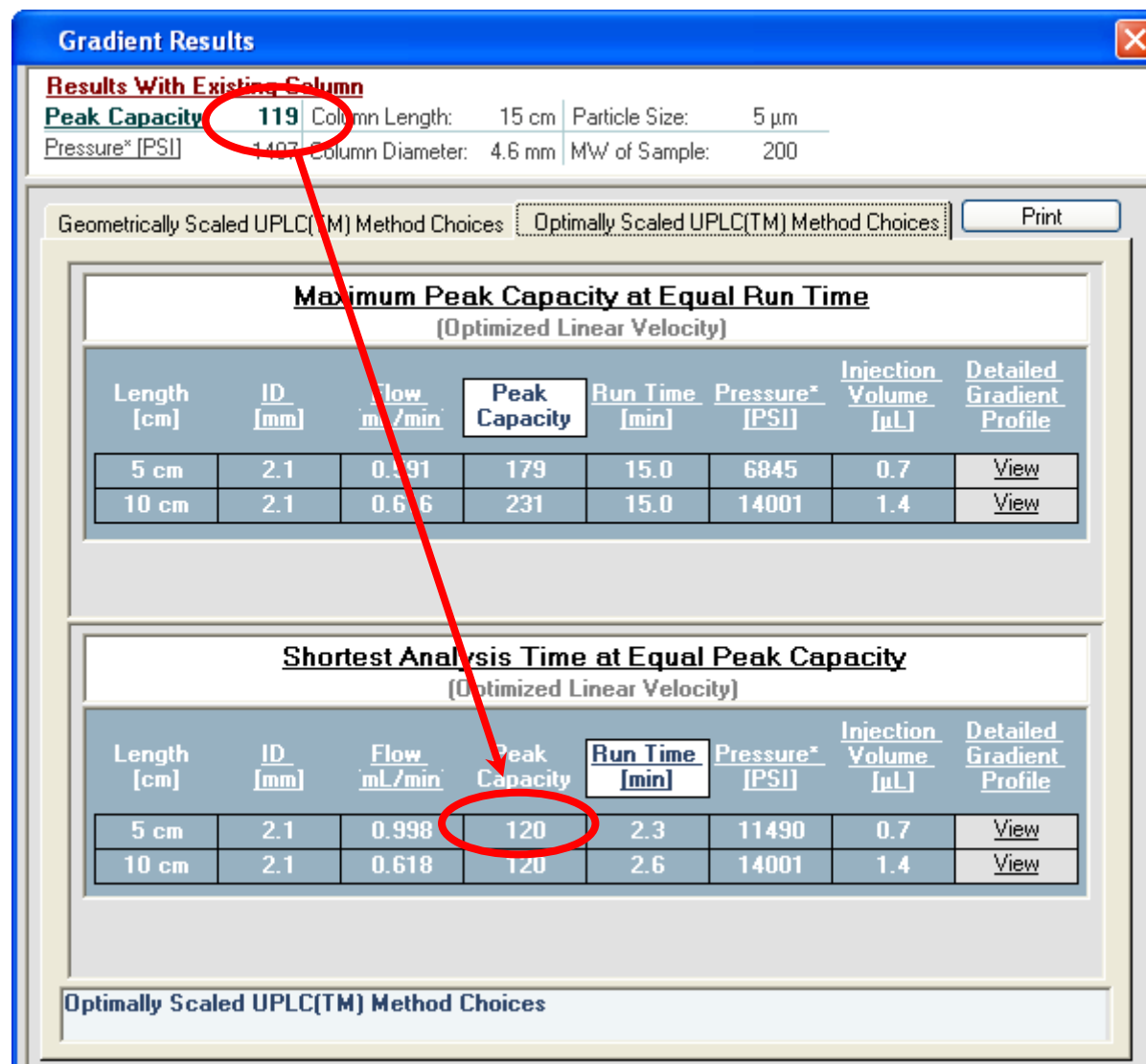
转换到 2.1 x 50 mm 柱 UPLC 流速 0.6 mL/min

| 梯度 | 时间 | 流速 | %A | %B | 曲线 | 梯度段 (分) | 梯度段 (cv) |
|---------|------|-----|----|----|----|------------|-------------|
| Initial | 0 | 0.6 | 95 | 5 | * | 0 | 0 |
| 2 | 2.61 | 0.6 | 5 | 95 | 6 | 2.61 | 9.03 |
| 3 | 3.48 | 0.6 | 5 | 95 | 1 | 0.87 | 3.01 |
| 4 | 5.22 | 0.6 | 95 | 5 | 1 | 1.74 | 6.02 |

优化到 UPLC:方法选择



优化到UPLC:相同峰容量时的最短分析时间



相同峰容量的最短分析时间

Shortest Analysis Time at Equal Peak Capacity: 2.1 X 50 mm



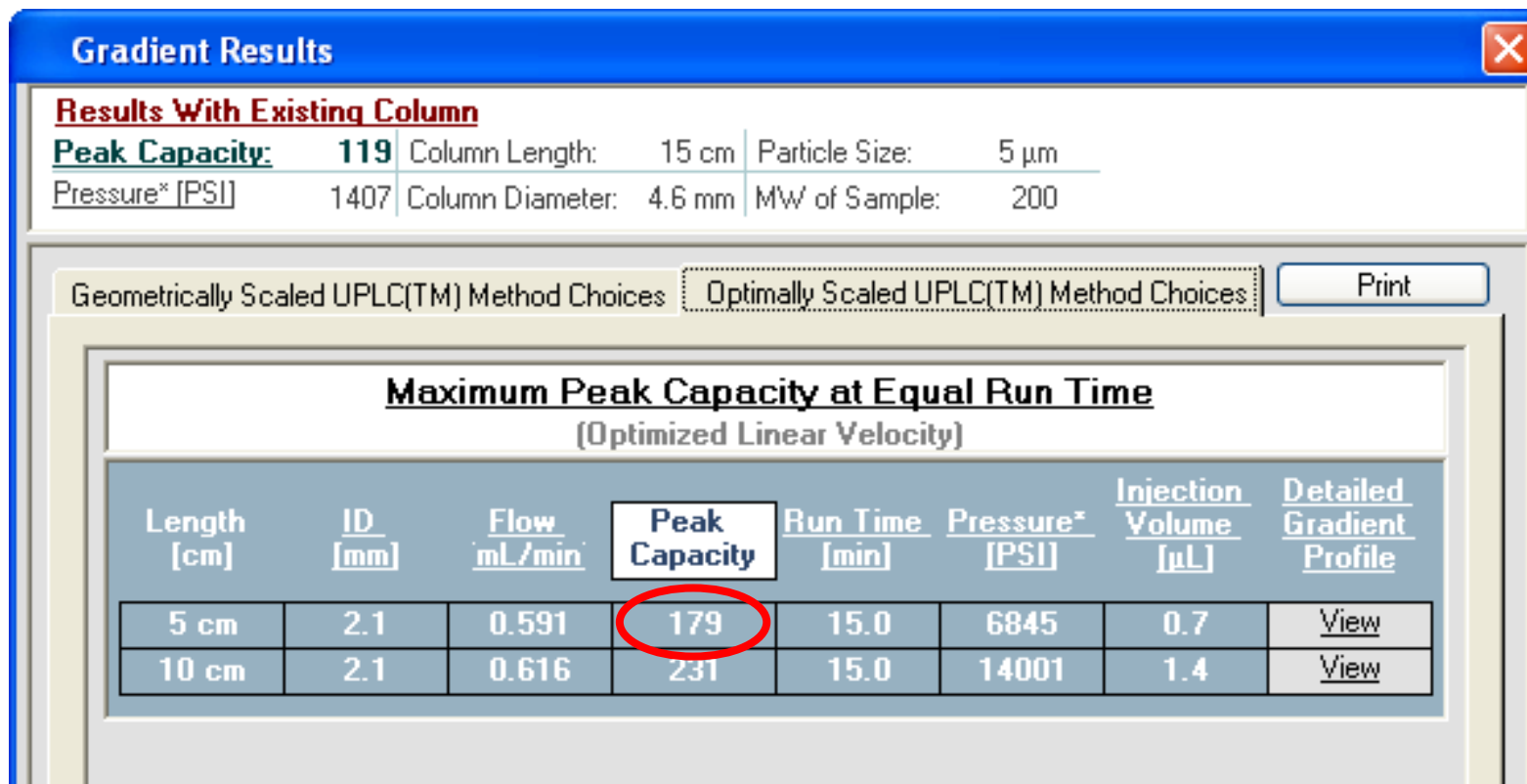
| Step | Time (min) | Flow mL/min | %A | %B | Time Segment [min] | Column Volumes |
|------------|---------------|----------------|----|----|--------------------------|-------------------|
| Init Cond. | 0.00 | 0.998 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 0.998 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 2.27 | 0.998 | 5 | 95 | 2.27 | 19.79 |
| 4 | 3.02 | 0.998 | 5 | 95 | 0.76 | 6.60 |
| 5 | 4.53 | 0.998 | 95 | 5 | 1.51 | 13.19 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Injection Volume: 0.7 µL

Pmax = 11490 PSI

Print

优化到 UPLC 相同时间内最大峰容量



相同时间内最大峰容量

Maximum Peak Capacity at Equal Run Time: 2.1 X 50 mm



| Step | Time (min) | Flow mL/min | %A | %B | Time Segment [min] | Column Volumes |
|------------|---------------|----------------|----|----|--------------------------|-------------------|
| Init Cond. | 0.00 | 0.591 | 95 | 5 | 0.00 | - |
| Init Hold | 0.00 | 0.591 | 95 | 5 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 15.00 | 0.591 | 5 | 95 | 15.00 | 77.61 |
| 4 | 20.00 | 0.591 | 5 | 95 | 5.00 | 25.87 |
| 5 | 30.00 | 0.591 | 95 | 5 | 10.00 | 51.74 |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Injection Volume: 0.7 µL

P_{max} = 6845 PSI

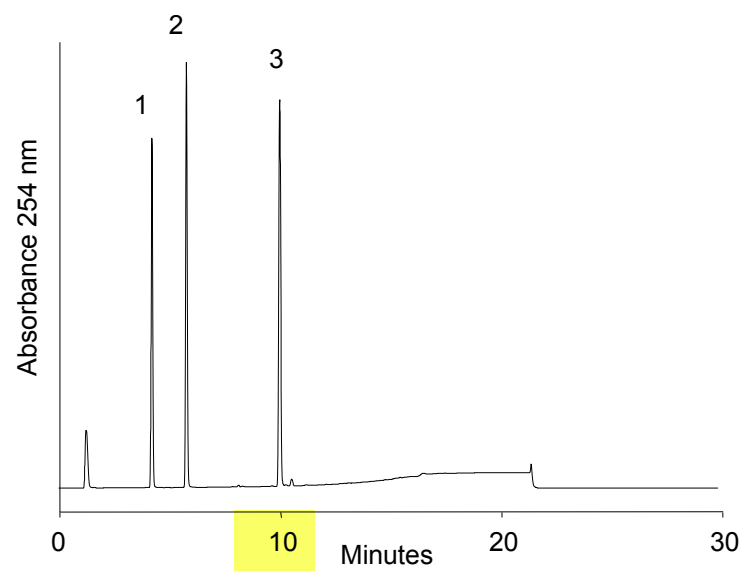
Print

目标条件:几何缩放和 UPLC™ 线速度调整

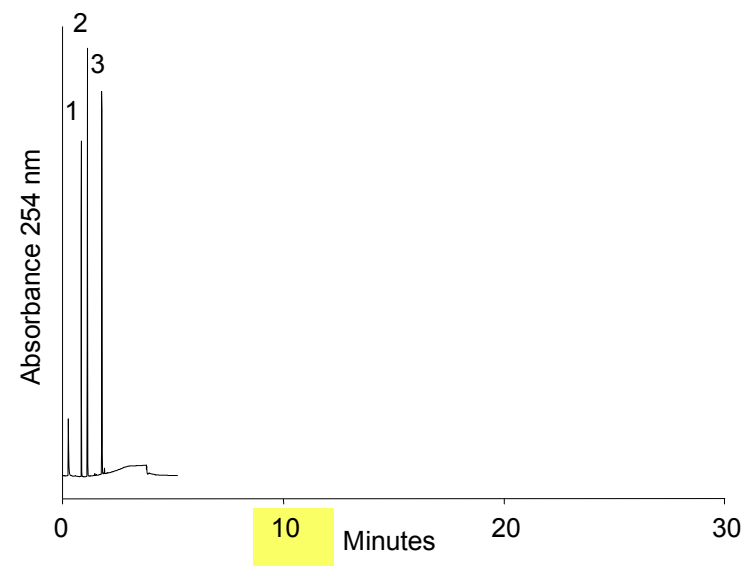
- 参数
 - 流动相
 - 温度
 - 几何缩放
 - 进样量
 - 流速
 - 等度方法只需调整流速和进样量
 - 梯度曲线
- 几何缩放的目的是为了减少评估和优化转换方法所带来的变化
- 调整到 UPLC 的线速度

HPLC 转换到 UPLC

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



原始 30 分钟 HPLC



转换到 5.2 分钟 UPLC

成功进行方法转换的步骤

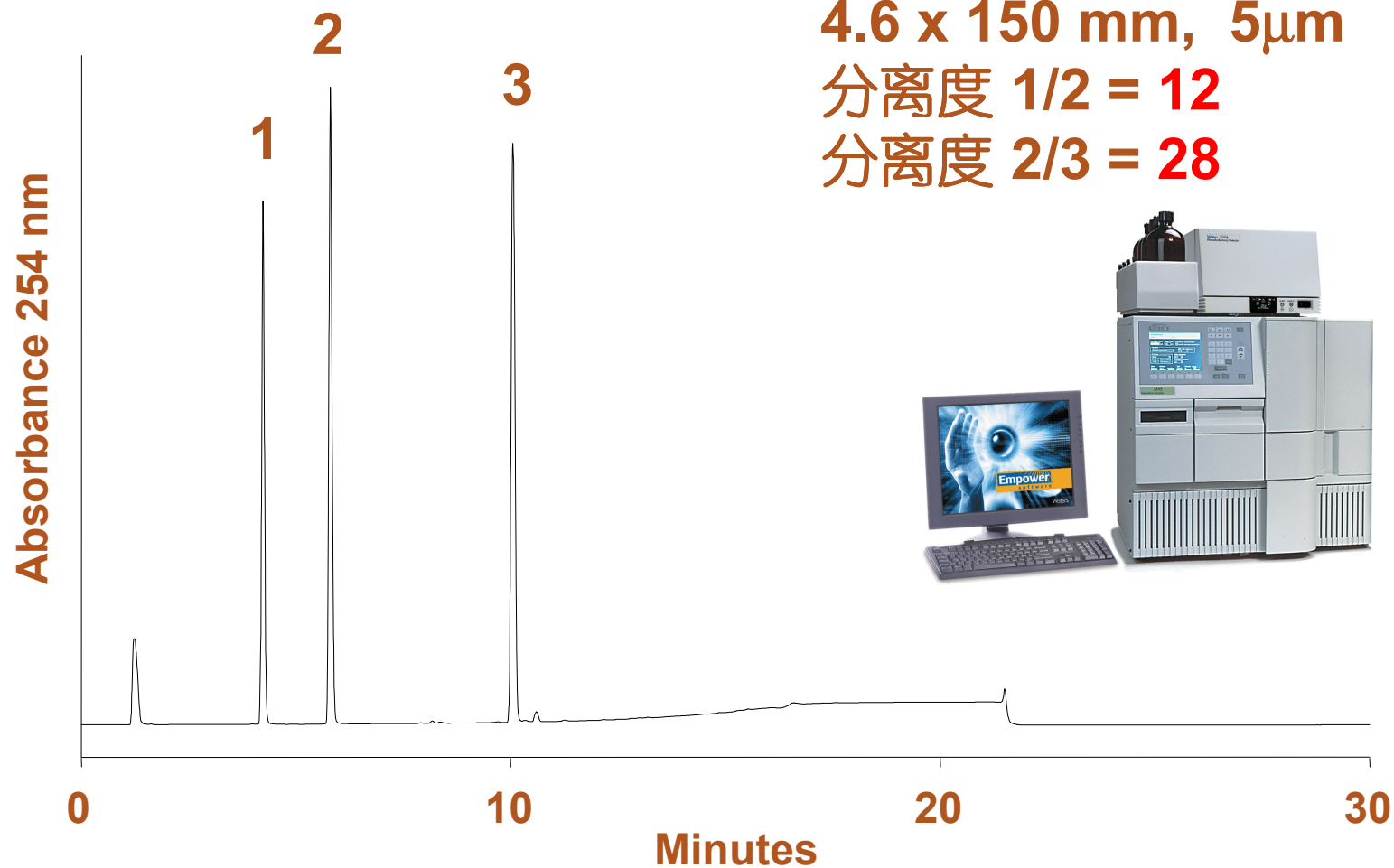
- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

- 峰匹配
 - 数峰个数
 - 考察峰间距
 - 严格考察基线中出现的和缺少的小峰
 - 匹配洗脱顺序和分离度

- 进一步进行通常的定量评估
 - 分离度
 - 检出限 (LOD)
 - 定量限 (LOQ)

原始 HPLC 方法

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

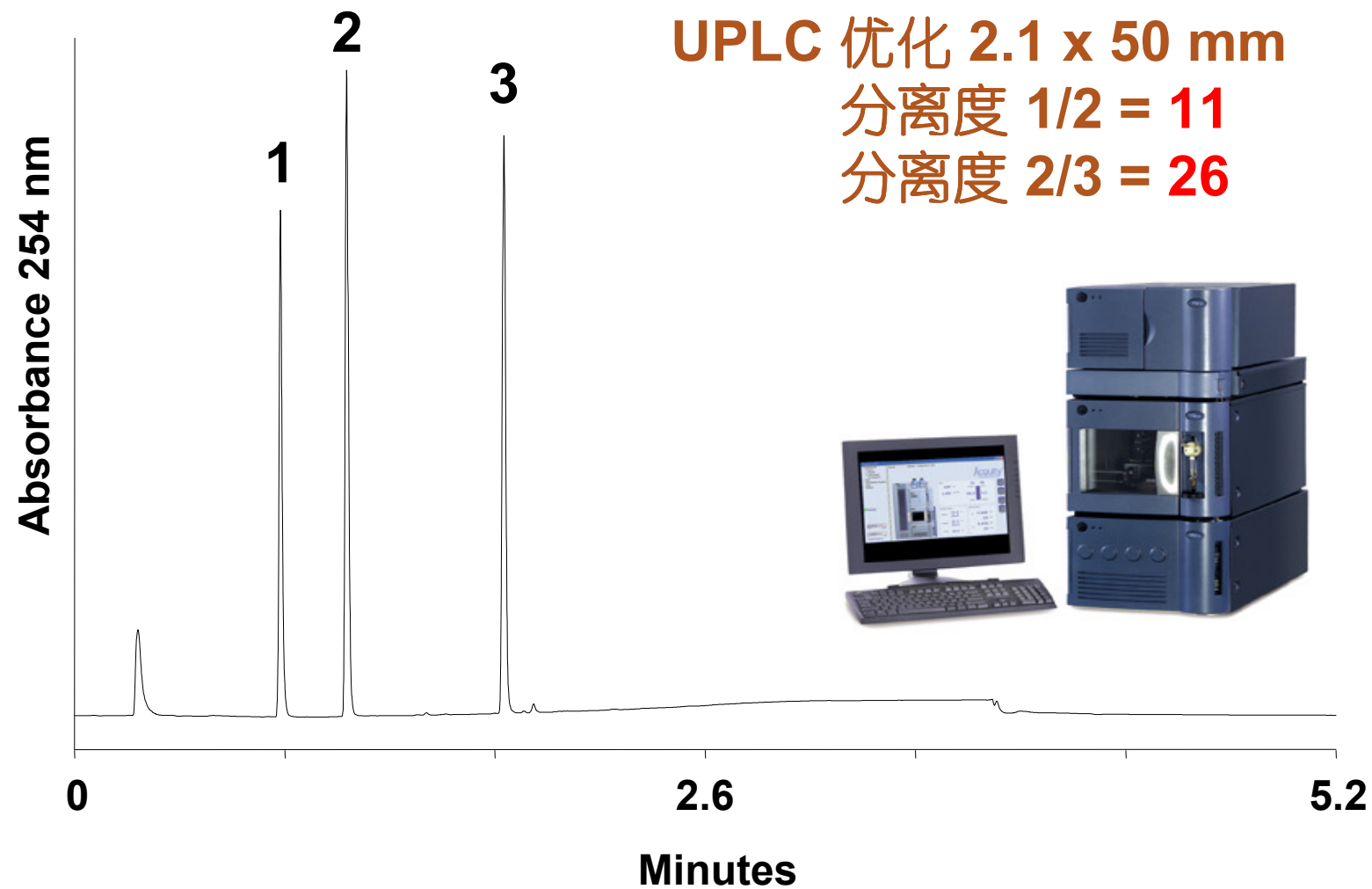


UPLC分离 与HPLC相同时间标度

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

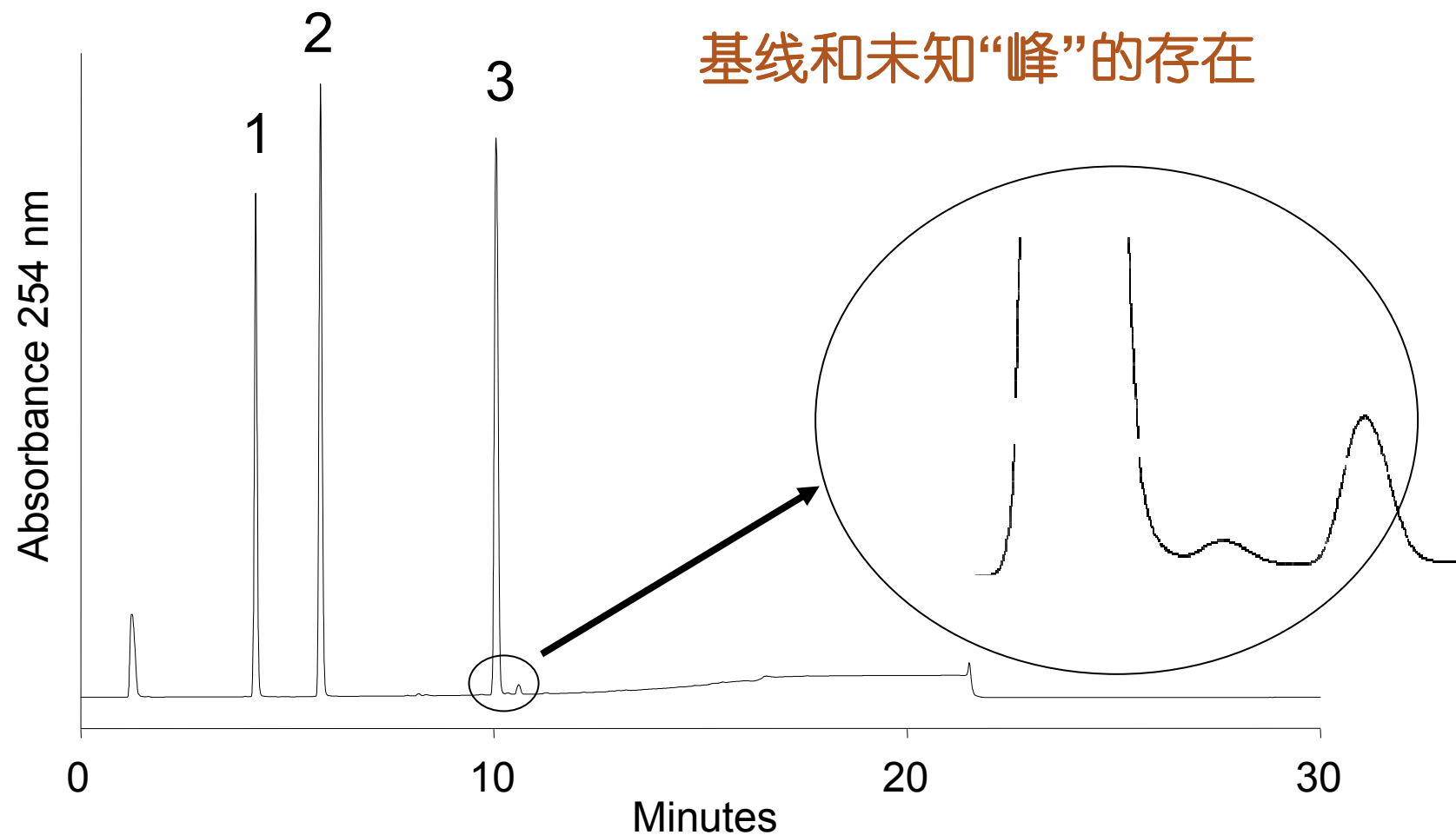


按比例放大图



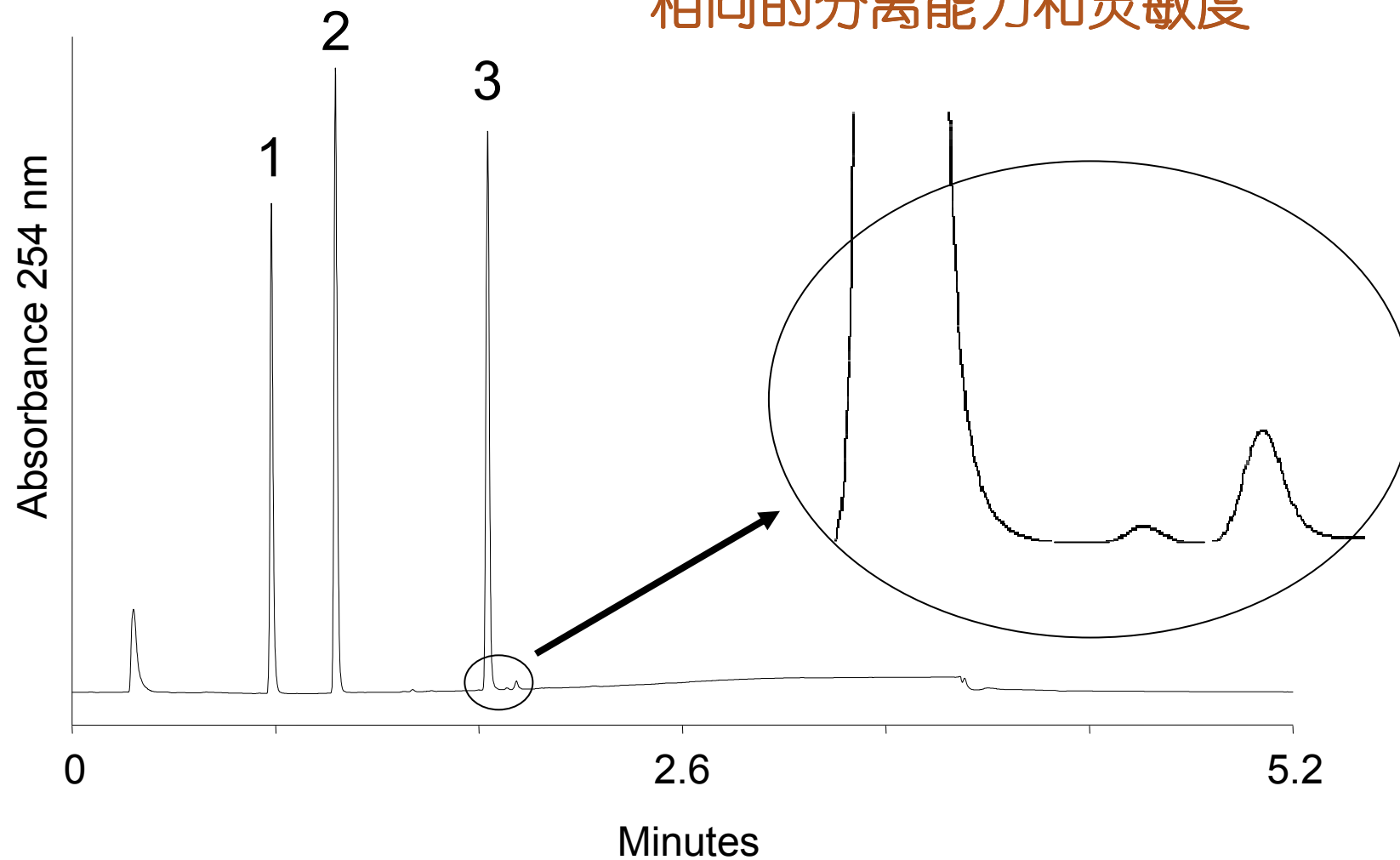
原始的 30分钟 HPLC方法 微量组分

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



5.2 分钟 UPLC 微量组分的放大图

相同的分离能力和灵敏度



成功进行方法转换的步骤

- 得到现有方法和结果的信息
- 仪器比较
- 选择新的或是目标柱
 - 色谱柱化学
 - 直径
- 在几何放大的基础上选择目标条件
- 评估转换的结果
- 如需要再进行优化

- ACQUITY UPLC™ 和反相HPLC运用的是同样的理论
- 之前所用的一切理论仍然适用
 - 所有的化学操作仍然适用
 - 所有的策略仍然与之前相同
 - 仿真软件在一些例子中已经验证过是很有用的, 就像是在通常的HPLC上一样
- 优化总是要进行的, 但过程会大大加快

- 方法可以从HPLC直接转换至ACQUITY UPLC™
 - 分离度增加
 - 速度增加
 - 检测灵敏度增加
- 许多参数可以也必须做一定的处理以保证原来的结果
- 注意通往成功的细节