

HPLC 到 UPLC 的方法转换

UPLC作为一种全新类别的色谱分离方法，取得的超高效分离结果是有目共睹的。如何将已有的HPLC方法转换成UPLC方法，是此前很多UPLC用户关心的问题。在从原有的HPLC方法转换成新的UPLC方法过程中，Waters为您提供完整的转换方案。一方面，所有的UPLC用户将得到Waters给您提供的方法转换计算器，下面的分步解释能使您看得更清楚;另一方面，本文附录中也将介绍方法转换的步骤，帮助您更好地理解方法转换的原理。您将看到方法转换后的结果是使您同时拥有速度、分离度和灵敏度。

方法转换计算器的使用

下图是方法转换计算器的初始页面。进入方法转换计算器后先选择是需要转换等度分离还是梯度分离的方法。同时方法转换计算器中也包括了一些与 UPLC 有关的样本和文字资料，可以很方便地阅读。

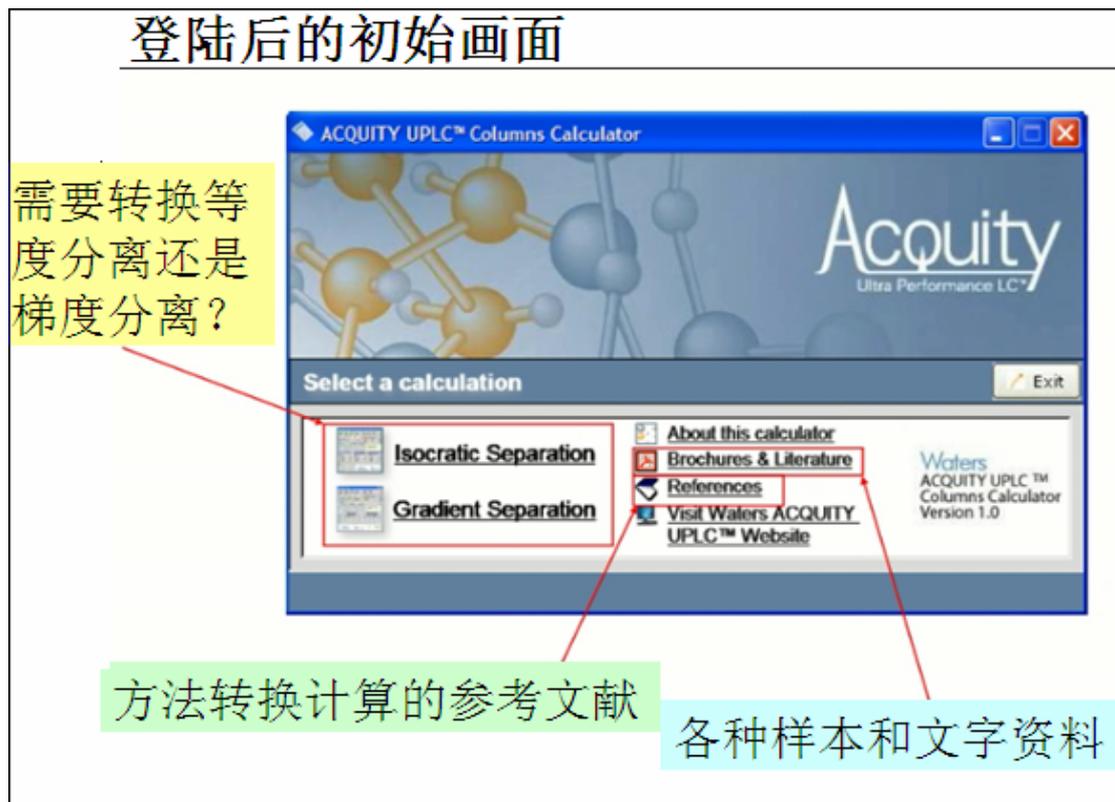


图 1，方法转换计算器的初始页面

下面分为两种情况：等度分离方法的转换和梯度分离方法的转换

1, 等度分离的方法转换

输入HPLC色谱柱的条件及流速等信息

选择色谱柱的最大压力

计算(估计)出柱效等参数的结果

三种结果选择：保持相同柱效；保持最佳分离效率；最快分析速度。分别对应不同的色谱柱参数。

图 2, 选择等度分离后出现的画面以及各个功能块的功能

1, 输入 HPLC 的条件

图 3, 输入 HPLC 的条件

1, 输入HPLC 的条件

2, 选择UPLC 的最大柱反压, 【缺省值为10000psi】

如果要更改最大反压, 点击 **change**

Maximum Pressure

Select Maximum Pressure:

5000 10000 PSI 15000

Set as Default

OK

Isocratic Separations

Select your existing HPLC conditions here:

Column Length	Column Diameter	Particle Size	MW of Sample	Flow Rate	Temperature	Retention Factor
15 cm	3.9 mm	4 μm	100	0.60	40	12
12.5 cm	3.0 mm	3.5 μm	200	[mL/min]	[Celsius]	[k]
10 cm	2.1 mm	3 μm	300			

Solvent Composition

%Aqueous: 70 MeOH: 30 MeCN: 30

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

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	Plates	Run Time	min	Plates
Run Time	min	Run Time	min	Flow Rate	Flow Rate	Flow Rate	mL/min	mL/min
Flow Rate	mL/min	Flow Rate	PSI	Pressure	Pressure	Pressure	PSI	PSI
Pressure	PSI	Pressure	mm	Column ID	Column ID	Column ID	mm	mm
Column ID	mm	Column ID	μL	Inj. Volume	Inj. Volume	Inj. Volume	μL	μL
Inj. Volume	μL	Inj. Volume						

maximum value = 200. The retention factor is the analysis time divided by the column dead time minus 1.

图 4, 选择 UPLC 色谱柱的最大反压

1, 输入 HPLC 的条件

2, 选择 UPLC 的最大柱反压, 【缺省值为 10000psi】

按下 **Calculate** 按钮

Isocratic Separations

Select your existing HPLC conditions here:

Column Length	Column Diameter	Particle Size	MW of Sample	Flow Rate	Temperature	Retention Factor
15 cm	3.9 mm	4 μm	100	0.60	40	12
12.5 cm	3.0 mm	3.5 μm	200	[mL/min]	[Celsius]	[k]
10 cm	2.1 mm	3 μm	300			

Solvent Composition

%Aqueous: 70 MeOH: 30 MeCN: 30

Pressure Units: bar PSI MPa

Injection Volume: 10 [μL]

Results With Existing Column

N: 9464 Plates

Run Time: 10.2 min

Pressure: 1164 PSI

Select Maximum Column Pressure 10000 PSI **Change**

Click here for your ACQUITY UPLC™ column choices.

Calculate Print Reset Exit

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	5	cm	Max. Plates	21160	Run Time	1.4	min	Plates
Run Time	2.5	min	Run Time	11.5	min	Plates	7777	
Flow Rate	0.600	mL/min	Flow Rate	0.264	mL/min	Flow Rate	1.075	mL/min
Pressure	5565	PSI	Pressure	4836	PSI	Pressure	10000	PSI
Column ID	2.1	mm	Column ID	2.1	mm	Column ID	2.1	mm
Inj. Volume	2.5	μL	Inj. Volume	4.9	μL	Inj. Volume	2.5	μL

maximum value = 200. The retention factor is the analysis time divided by the column dead time minus 1.

图 5, 开始计算

Conditions of Equal Efficiency		Conditions of Maximum Efficiency (10 cm Column Length)		Conditions of Shortest Analysis Time (5 cm Column Length)	
Column Length	5 cm	Max. Plates	21160	Run Time	1.4 min
Run Time	2.5 min	Run Time	11.5 min	Plates	7777
Flow Rate	0.600 mL/min	Flow Rate	0.264 mL/min	Flow Rate	1.075 mL/min
Pressure*	5565 PSI	Pressure*	4836 PSI	Pressure*	10000 PSI
Column ID	2.1 mm	Column ID	2.1 mm	Column ID	2.1 mm
Inj. Volume	2.5 µL	Inj. Volume	4.9 µL	Inj. Volume	2.5 µL

兼顾速度和分离效率

具有最佳的分离效率

具有最快的分析速度

图 6，计算得到的三种结果

至此，等度分离的方法转换已经完成，得到了三种结果，可以根据不同的需要来选择。

2，梯度分离方法的转换

在初始的登陆画面中选择梯度分离，得到的画面如下：

The screenshot shows the 'Gradient Separations' software window. It includes a menu bar (File, Run, Help), a title bar, and a main content area. The main area is divided into several sections: 'Select your existing HPLC conditions here:' with a table of parameters (Column Length, Column Diameter, Particle Size, MW of Sample, Flow Rate, Temperature, Injection Volume, Instrument Delay); 'Organic Modifier in B' (MeOH %100); 'Pressure Units' (bar, PSI, MPa); 'Results With Existing Column' (Peak Capacity, Pressure); and a 'Gradient Table' with columns for Step, Time, Flow, ΔA , ΔB , Time Segment (min), and Column Volumes. A 'Calculate' button is at the bottom right. Callouts point to various elements: '现有的 HPLC 条件' (Existing HPLC conditions) points to the parameter table; '现有 HPLC 的梯度表' (Existing HPLC gradient table) points to the gradient table; '调整 UPLC 色谱柱的最大反压' (Adjust the maximum backpressure of the UPLC column) points to the 'Select Maximum Column Pressure' field; '计算 (估计) 出的 HPLC 结果' (Calculated (estimated) HPLC results) points to the 'Results With Existing Column' section; '计算出的时间段和柱体积' (Calculated time segments and column volumes) points to the 'Time Segment' and 'Column Volumes' columns; and '屏幕帮助窗口' (Screen help window) points to the bottom status bar.

图 7，选择梯度分离后得到的各个功能区功能的画面

在选择了梯度分离后，同等度分离方法转换步骤相似，要在页面中输入 HPLC 的条件，不同的是要给出原来 HPLC 方法的梯度表，如下面各个图中所示的步骤。

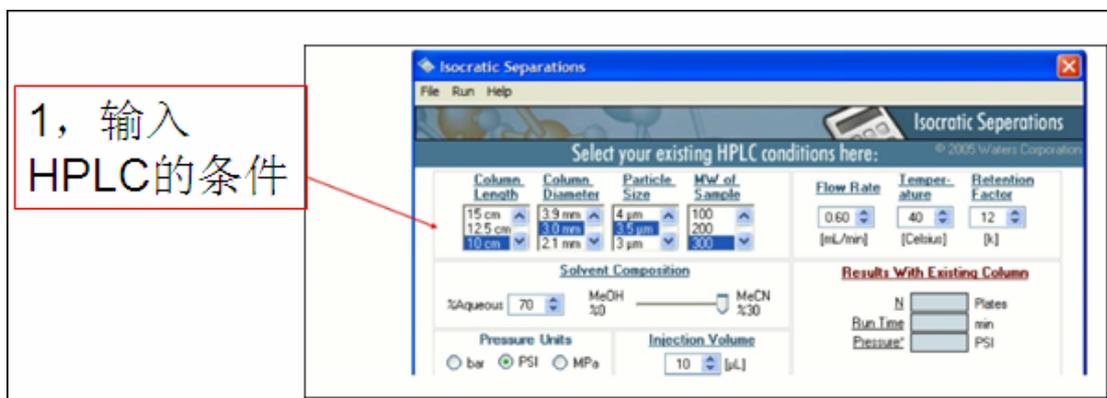


图 8 输入 HPLC 的条件

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						

注意:

- 只需输入时间和B%，其他栏可以自动得到
- 相邻2栏的时间增量最少为0.01分钟
- 相邻栏B%的增量小于20%不能计算出优化的结果

图 9 输入梯度曲线的参数

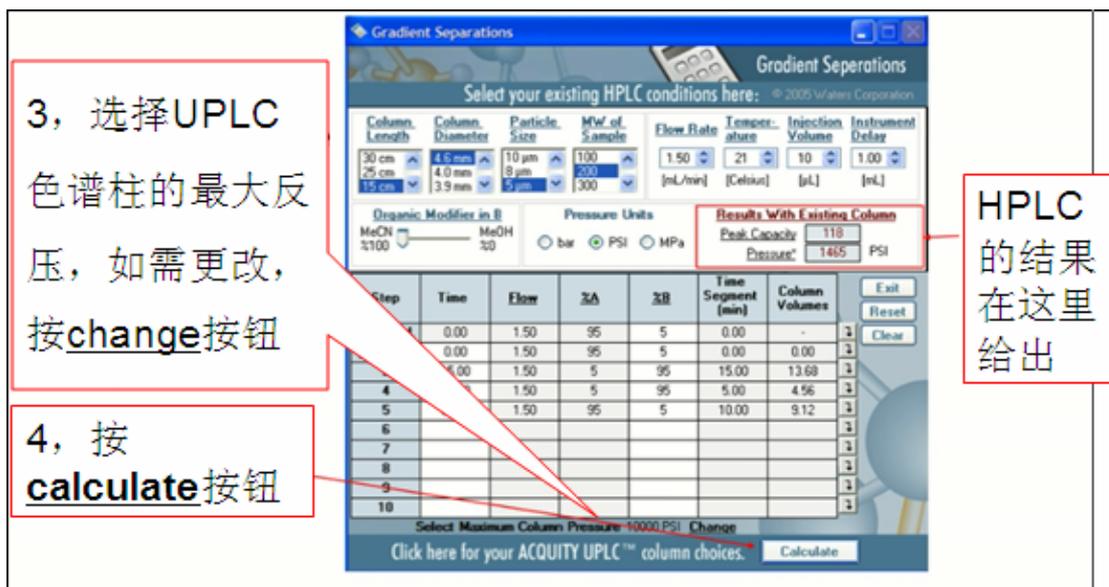


图 10 选择柱反压及计算步骤



图 11, 两种模式的选择

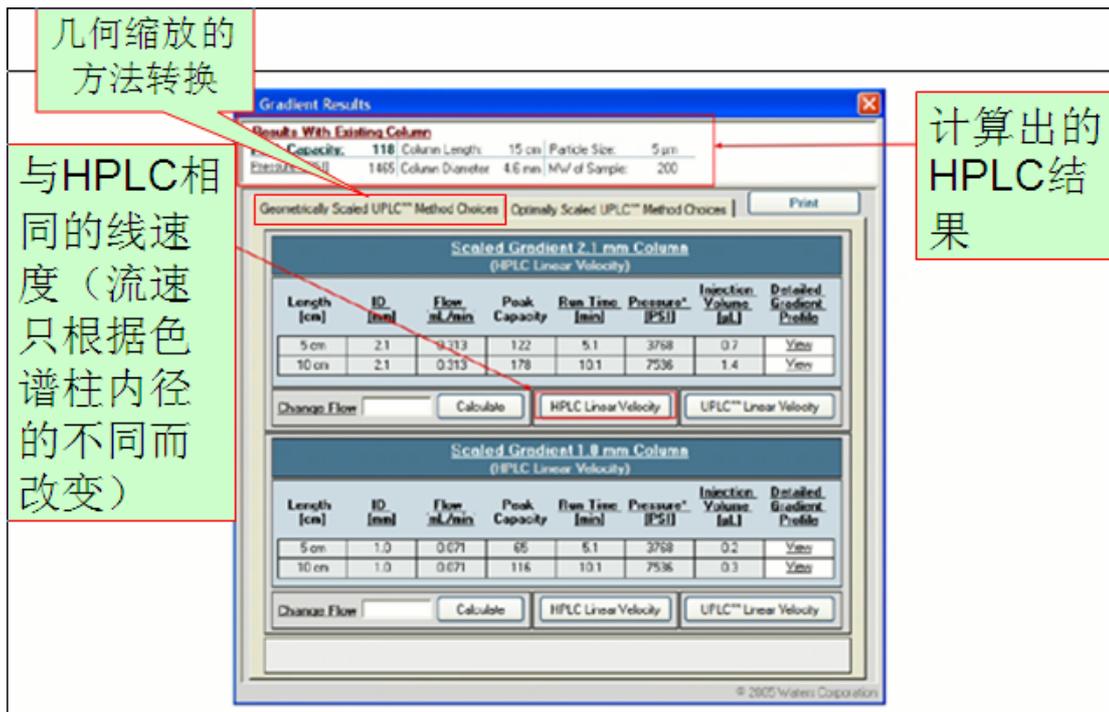


图 12，几何缩放的方法转换

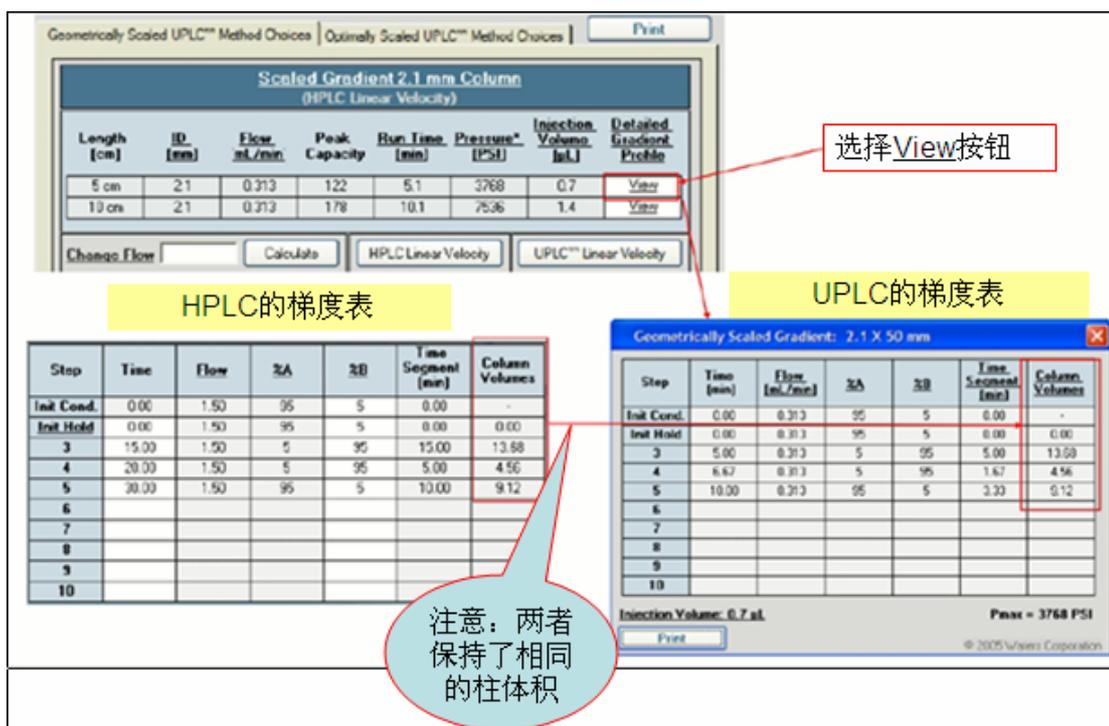


图 13，查看梯度表结果

选择 UPLC™ Linear Velocity

出现的这些……是什么意思？

因为最大压力 P_{max} 已经超过了 10000psi
(注释信息)

Peak Capacity:	118	Column Length:	15 cm	Particle Size:	5 μm
Pressure (PSI):	1455	Column Diameter:	4.6 mm	MW of Sample:	200

Length [cm]	ID [mm]	Flow mL/min	Peak Capacity	Run Time [min]	Pressure [PSI]	Injection Volume [μL]	Detailed Gradient Profile
5 cm	2.1	0.919	---	---	---	---	View
10 cm	2.1	0.919	---	---	---	---	View

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	65	5.1	3768	0.2	View
10 cm	1.0	0.071	116	10.1	7536	0.3	View

--- indicates maximum UPLC™ pressure limit exceeded. Please increase UPLC™ maximum pressure, lower HPLC flow rate and/or increase temperature.

© 2005 Waters Corporation

图 14，选择 UPLC 的线速度选项

优化的缩放方法转换

相同运行时间，最大的峰容量

相同的峰容量，最小的运行时间

Length [cm]	ID [mm]	Flow mL/min	Peak Capacity	Run Time [min]	Pressure [PSI]	Injection Volume [μL]	Detailed Gradient Profile
5 cm	2.1	0.574	179	15.0	6319	0.7	View
10 cm	2.1	0.510	227	15.0	12501	1.4	View

Length [cm]	ID [mm]	Flow mL/min	Peak Capacity	Run Time [min]	Pressure [PSI]	Injection Volume [μL]	Detailed Gradient Profile
5 cm	2.1	0.998	119	2.5	11968	0.7	View
10 cm	2.1	0.532	119	2.9	12501	1.4	View

图 15，优化的缩放方法转换

几何缩放转换下的HPLC线速度得到的梯度表

Step	Time (min)	Flow (mL/min)	ΔA	ΔB	Time Segment (min)	Column Volume
Init Cond.	0:00	0.293	95	5	0:00	-
Init Hold	0:00	0.293	95	5	0:00	0:00
3	5:00	0.293	5	95	5:00	13.60
4	6:07	0.293	5	95	1:07	4.96
5	10:00	0.293	95	5	3:33	9.12
6						
7						
8						
9						
10						

Injection Volume: 0.7 µL
Pmax = 3760 PSI

相同运行时间最大峰容量模式得到的梯度表

Step	Time (min)	Flow (mL/min)	ΔA	ΔB	Time Segment (min)	Column Volume
Init Cond.	0:00	0.574	95	5	0:00	-
Init Hold	0:00	0.574	95	5	0:00	0:00
3	15:00	0.574	5	95	15:00	76.32
4	20:00	0.574	5	95	5:00	25.11
5	30:00	0.574	95	5	10:00	96.22
6						
7						
8						
9						
10						

Injection Volume: 0.7 µL
Pmax = 6910 PSI

几何缩放转换下的UPLC线速度得到的梯度表

Step	Time (min)	Flow (mL/min)	ΔA	ΔB	Time Segment (min)	Column Volume
Init Cond.	0:00	0.969	95	5	0:00	-
Init Hold	0:00	0.969	95	5	0:00	0:00
3	1:70	0.969	5	95	1:70	13.68
4	2:27	0.969	5	95	0:57	4.96
5	3:43	0.969	95	5	1:13	9.12
6						
7						
8						
9						
10						

Injection Volume: 0.7 µL
Pmax = 11863 PSI

相同峰容量最小运行时间模式下得到的梯度表

Step	Time (min)	Flow (mL/min)	ΔA	ΔB	Time Segment (min)	Column Volume
Init Cond.	0:00	0.969	95	5	0:00	-
Init Hold	0:00	0.969	95	5	0:00	0:00
3	2:43	0.969	5	95	2:43	25.24
4	3:24	0.969	5	95	0:51	7.06
5	4:07	0.969	95	5	1:02	14.16
6						
7						
8						
9						
10						

Injection Volume: 0.7 µL
Pmax = 11368 PSI

图 16, 方法转换可以得到的四种梯度表结果

您可以在梯度分离主屏幕下选择“file”菜单下的“save as”保存HPLC梯度方法

保存成 *.WAT文件

图 17, 保存 HPLC 梯度方法的画面