

## 利用CORTECS实心核颗粒色谱柱进行HPLC梯度方法转换

Jonathan E. Turner, Bonnie A. Alden, Mia Summers, Kenneth Berthelette 和 Kenneth J. Fountain  
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

### 应用优势

- 分析时间缩短约四倍，从而提高了常规样品分析的通量
- 溶剂使用量与进样量降低约两倍
- 可在HPLC仪器压力限值内(小于5000 psi)工作

### 简介

将使用填充了大颗粒的大体积色谱柱的HPLC梯度方法转换至填充高效CORTECS 2.7  $\mu\text{m}$ 颗粒的小体积色谱柱，可轻松缩短分析时间、节省溶剂与样品消耗量，最终节约成本。在转换HPLC梯度方法时，可通过适当调整方法条件和选择相当的色谱柱填料来避免对色谱分离性能的影响。

下述应用纪要展示了针对阿巴卡韦相关化合物的典型HPLC梯度方法进行适当的方法转换。阿巴卡韦(Ziagen®)是一种核苷类逆转录酶抑制剂，被用于抗HIV的治疗。该样品由五种化合物组成，其中四种为主要成分阿巴卡韦的相关物质，如图1所示。此类检测常用的色谱柱为全多孔 $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm色谱柱。通过转换为CORTECS  $\text{C}_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$ 色谱柱，可大大缩短该梯度方法的分析时间，同时还能保持目标峰的选择性和分离度。

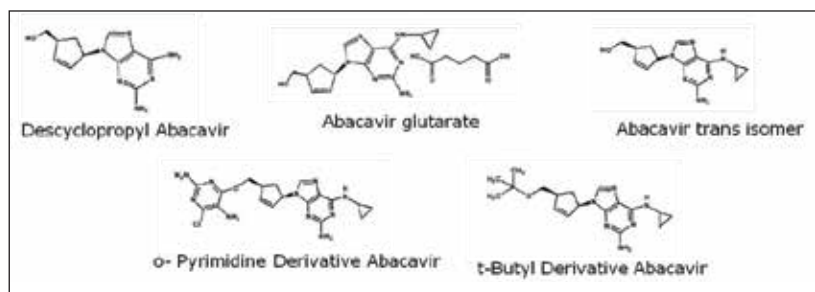


图1. 阿巴卡韦及其相关物质。

### 沃特世解决方案

[Alliance® HPLC系统](#)

[CORTECS® 2.7  \$\mu\text{m}\$  实心核颗粒色谱柱](#)

[Empower® 3 色谱数据软件](#)

### 关键词

方法转换, Alliance, HPLC, CORTECS, Abacavir, 相关物质, 实心

## 实验

采用全多孔C<sub>18</sub>, 5 µm, 4.6 x 150 mm  
色谱柱的方法

## 液相色谱条件

系统: 配有2489 TUV检测器的  
Alliance HPLC

色谱柱: 全多孔C<sub>18</sub>,  
5 µm, 4.6 x 150 mm

流动相A: 0.1%三氟乙酸水溶液

流动相B: 85%甲醇水溶液

反压: 1800 psi

## 梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
初始	1.0	95	5
23.64	1.0	70	30
38.39	1.0	10	90
43.83	1.0	10	90
44.89	1.0	95	5
50.00	1.0	95	5

检测条件: UV, 254 nm

洗针液: 水/乙腈 (90:10)

密封清洗液: 乙腈/水 (80:20)

进样体积: 8 µL

采用CORTECS C<sub>18</sub>, 2.7 µm, 4.6 x 75 mm  
色谱柱的转换方法

## 液相色谱条件

系统: 配有2489 TUV检测器的  
Alliance CORTECS C<sub>18</sub>, 2.7 µm,  
4.6 x 75 mm  
([部件号186007376](#))

流动相A: 0.1%三氟乙酸水溶液

流动相B: 85%甲醇水溶液

反压: 4400 psi

## 梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
初始	1.85	95	5
6.38	1.85	70	30
10.37	1.85	10	90
11.83	1.85	10	90
12.12	1.85	95	5
15.00	1.85	95	5

检测条件: UV, 254 nm

洗针液: 水/乙腈 (90:10)

密封清洗液: 乙腈/水 (80:20)

进样体积: 4 µL

样品瓶: 配有PTFE/硅橡胶隔垫的  
沃特世LCGC认证透明玻璃瓶  
([部件号186000307C](#))

数据管理: Empower 3

## 样品制备

阿巴卡韦相关化合物 (USP参比标准品)  
1.0 mg/mL溶于100% HPLC级水中。

## 方法转换方程

### 减小填料粒度同时保持效率

对于给定色谱柱长度，随着填料粒度减小，理论塔板数将增加，因此可使用更短的色谱柱并维持色谱分离。当填料粒度发生变化时，可利用以下方程确定合适的色谱柱长度。

$$L_{C2} = \frac{L_{C1} \times d_{p2}}{d_{p1}} \quad \begin{array}{l} L_C = \text{色谱柱长度} \\ d_p = \text{填料粒度} \end{array}$$

### 缩放进样体积

随着色谱柱体积减小，需要根据下述方程对进样体积进行相应调整。

$$V_{I2} = V_{I1} \left( \frac{d_{C2}}{d_{C1}} \right)^2 \times \left( \frac{L_{C2}}{L_{C1}} \right) \quad \begin{array}{l} V_I = \text{进样体积} \\ L_C = \text{色谱柱长度} \\ d_C = \text{色谱柱内径} \end{array}$$

### 缩放流速

必须根据色谱柱内径的变化来调整流速以保持相同的线性速度。要保持性能，还必须以填料粒度变化的反比例来调整流速，可采用以下方程进行调整。

$$F_{C2} = F_{C1} \times \left( \frac{d_{C2}}{d_{C1}} \right)^2 \times \left( \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \right) \quad \begin{array}{l} F_C = \text{流速} \\ d_C = \text{色谱柱直径} \\ d_p = \text{填料粒度} \end{array}$$

### 缩放梯度持续时间

为保持两个色谱柱具有相同的色谱柱体积，必须改变梯度时间以维持梯度斜率。梯度时间可用以下方程进行调整。

$$t_{g2} = t_{g1} \times \left( \frac{F_{C1}}{F_{C2}} \right) \times \left( \frac{d_{C2}}{d_{C1}} \right)^2 \times \left( \frac{L_{C2}}{L_{C1}} \right) \quad \begin{array}{l} F_C = \text{流速} \\ d_C = \text{色谱柱直径} \\ d_p = \text{填料粒度} \end{array}$$

结果与讨论

基于此类检测常用的色谱柱为全多孔 $C_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$  色谱柱, 因此选择CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$  填料用于方法转换。向2.7  $\mu\text{m}$  颗粒填充的色谱柱转换时需要75 mm的色谱柱长度来保持L/dp比例。该方法转换中选择4.6 x 75 mm的色谱柱。色谱柱长度的变化需要将进样体积从8  $\mu\text{L}$  调整为4  $\mu\text{L}$ 。因为色谱柱的内径并无变化, 所以仅根据填料粒度的变化来调整流速。调整后的流速经计算为1.85 mL/min。色谱柱配置与流速的调整需要对每个时间段的梯度进行调整, 从而确保在同等色谱柱体积条件下进行分离。

表1和图2显示了方法转换的对比情况。采用CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱的转换方法与采用全多孔 $C_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$  色谱柱的方法具有相同的选择性。同时还保持了两对关键峰的分离度值。CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 75 mm 色谱柱生成的反压为4400 psi, 完全在HPLC仪器的压力限值(5000 psi)内。将HPLC梯度法转换至CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱, 分析时间缩短约四倍, 同时溶剂消耗量节省了两倍。

表1.采用CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱进行阿巴卡韦相关物质方法转换的结果。

色谱柱	色谱柱尺寸	USP分离度 峰3,2	峰4,3	分析时间	乙腈体积/ 每次运行(mL)	反压 (psi)
全多孔 $C_{18}$ , 5 $\mu\text{m}$	4.6 x 150 mm	2.7	3.3	50.0	20.8	1800
CORTECS $C_{18}$ , 2.7 $\mu\text{m}$	4.6 x 75 mm	2.7	4.1	15.0	10.5	4400

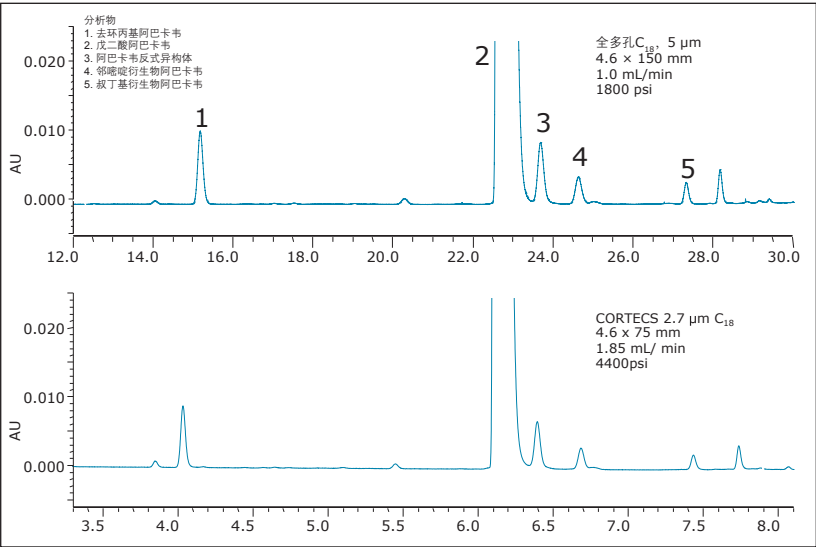


图2. 阿巴卡韦相关物质方法转换至CORTECS  $C_{18}$ , 2.7  $\mu\text{m}$  色谱柱的色谱图。

## 结论

可轻松将使用填充大颗粒的大体积色谱柱的HPLC梯度方法转换至填充高效CORTECS颗粒的小体积色谱柱。本应用纪要介绍对阿巴卡韦相关物质的典型HPLC梯度方法的进行成功转换，其通量增加了约四倍，同时保持了色谱分离性能。除了节省了时间外，溶剂消耗量还降低了约两倍。当采用CORTECS C<sub>18</sub>, 2.7 µm, 4.6 x 75 mm色谱柱时，所生成的反压为4400 psi，完全在HPLC仪器的压力限值（小于5000 psi）内。HPLC梯度方法向CORTECS 2.7 µm色谱柱转换时增加了通量，降低了溶剂消耗量，从而大大节约了成本。

# Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, Alliance, Empower和CORTECS是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

沃特斯中国有限公司  
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866  
上海: 021 - 6156 2666  
广州: 020 - 2829 5999  
成都: 028 - 6578 4990  
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676  
[www.waters.com](http://www.waters.com)