

如何使用梯度起点调整功能简化色谱方法迁移工作



概述

- 梯度延迟体积 (*Dwell Volume*) 做为色谱仪器的“特征”个性参数，是色谱方法验证中系统耐用性验证项下一个绕不开的点，也是不同色谱仪之间方法迁移过程中需要重点考量的因素之一。
- 在23年9月的中国药典色谱通则的更新中，也对这个影响项做了增补，使得中国药典相关定义和规范与USP 621通则的要求基本对齐。
- 因此，可以预见由于梯度延迟体积不同而调整色谱方法将成为方法迁移和方法转换工作中的“必修课程”。

中国药典<0512>高效液相色谱法通则第二次征求意见稿

滞留体积 (dwell volume, 用D或V_d表示), 也称为梯度延迟体积, 是指从流动相混合点至柱入口之间的体积。梯度洗脱时, 所采用设备的配置可显著地影响方法所述的分离度、保密时间和相对保密时间。如果发生这种情况, 可归因于过大的滞留体积。因此, 应考虑方法开发时的系统与实际使用系统之间滞留体积的差异, 在开始梯度程序前增加一个等度平衡阶段, 通过调整等度阶段时间来调整梯度时间点, 以与所使用的分析设备相适应。如在品种项下给出了方法开发时所用的滞留体积, 则原梯度表中所述的时间点 (t_m in) 可用按下式计算的调整后时间点 (t_c, m in) 代替:

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

式中D为目标色谱系统的滞留体积 (ml);

D₀为方法开发时原色谱系统的滞留体积 (ml);

F为流速 (ml/min)。

- 修改梯度表并在梯度洗脱程序前增加等度平台来消除梯度延迟体积差异虽然可以被认为是可行的方案，但由于改变梯度表程序造成需要对方法进行再验证无疑增加了方法迁移过程的难度和执行成本。
- 华谱科仪针对这一情况开发了“梯度起点调整”功能，只需对目标系统和原系统的梯度延迟体积进行计算后并输入相应值，软件会自动调整梯度起点以消除梯度延迟体积差。
- 对于在较大延迟体积系统上开发的方法，原本是无法通过增加等度平台的方式来“平行”迁移到小延迟体积的色谱仪上的。但是通过使用华谱“梯度起点调整”功能，即使是由大体积系统迁移到小体积系统的方法迁移一样可以实现“简单平行迁移”。



梯度起点调整功能设置步骤

- 通过梯度延迟体积 (*Dwell Volume*) 差计算梯度调整时间：结果 t_c 单位为分钟 (min)

$$t_c = t - \frac{(D - D_0)}{F}$$

式中D为目标色谱系统的滞留体积 (ml)；

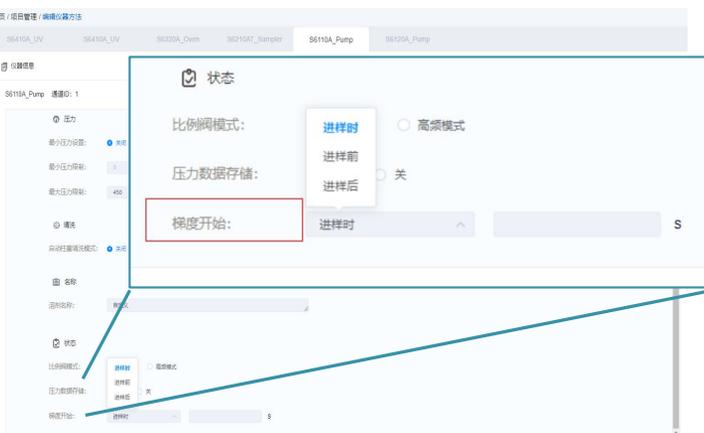
D₀ 为方法开发时原色谱系统的滞留体积 (ml)；

F为流速 (ml/min)。

- 根据计算所得值，填入梯度开始时间项：

如果结果是正值，选择进样后
如果结果是负值，选择进样前
数值需换算成秒 (S) 后填入

注意：由于该功能仅就梯度延迟体积差进行校正，因此对于方法迁移或方法转换中其他色谱条件如谱带展宽等造成的方法调整，请按照通则要求开展相应的方法再验证工作。



USP: determine procedure of Dwell volume

Dwell volume (D) (also referred to as V_D): The dwell volume (also known as gradient delay volume) is the volume between the point at which the eluents meet and the inlet of the column. It can be determined using the following procedure.

COLUMN: Replace the chromatographic column by an appropriate capillary tubing (e.g., 1 m × 0.12 mm).

MOBILE PHASE: See [Table 1](#).

MOBILE PHASE A: Water

MOBILE PHASE B: 0.1% v/v solution of acetone in water

Table 1

Time (min)	Mobile phase A (% v/v)	Mobile phase B (% v/v)
0–20	100→0	0→100
20–30	0	100

FLOW RATE: Set to obtain sufficient back-pressure (e.g., 2 mL/min).

DETECTION: Spectrophotometer at 265 nm

Determine the time ($t_{0.5}$), in minutes, when the absorbance has increased by 50% ([Figure 2](#)).

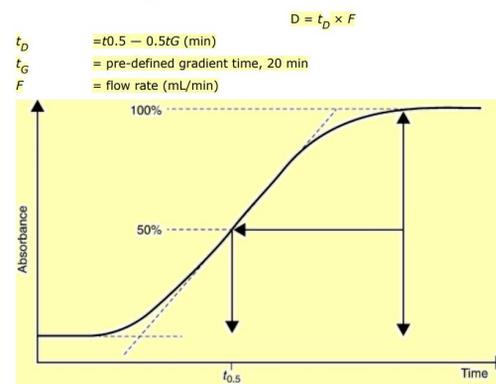


Figure 2.

[NOTE—where applicable, this measurement is performed with the autosampler in the "inject" position so as to include the injection loop volume in the dwell volume.]



谢谢观看



扫一扫，关注华谱科仪