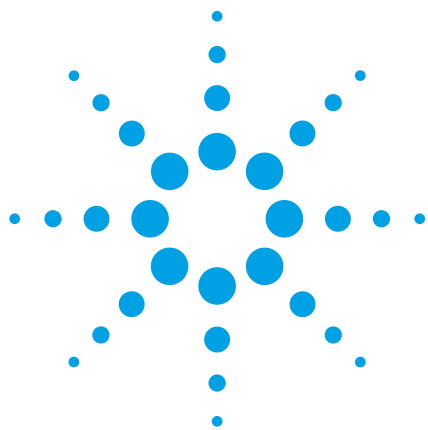




使用 Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案和 Agilent Easy Access 软件的无人值守液相色谱系统

在同一液相色谱系统上可用多达 8 根色谱柱进行反应动力学试验、色谱柱初选和杂质检查

应用报告

药物开发

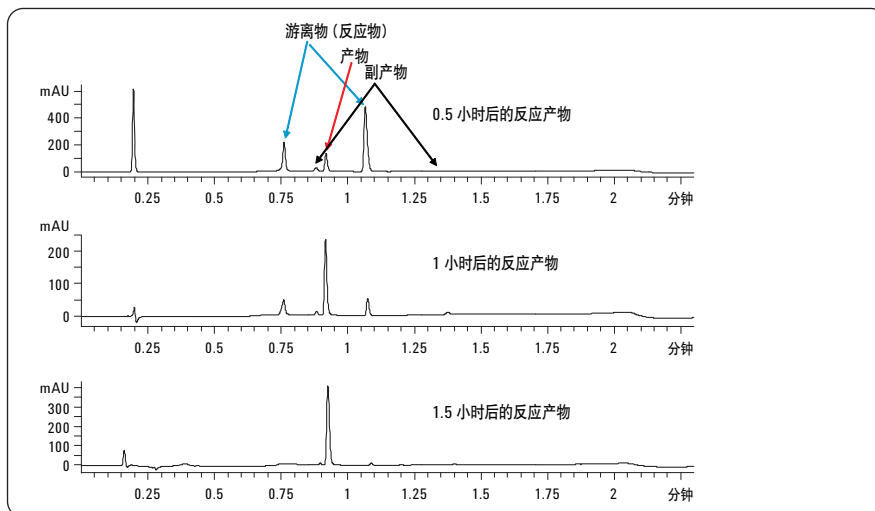
作者

Angelika Gratzfeld-Hüsgen

Michael Frank

Agilent Technologies

Waldbronn, Germany



摘要

在化学合成实验室，新化合物的合成涉及到不同的用户。通常，一些研究小组或个人用户需要同时运行不同的分析项目。在以下分析任务中，需要应用液相色谱-质谱联用技术：

- 实时反应监测
- 反应产物控制
- 进行制备液相色谱分析前的色谱柱初选
- 制备色谱分离产物的纯度分析
- 快速简便地进入正在运行的液相色谱系统
- 提供具有不同选择性的色谱柱
- 预设色谱方法
- 快速报告样品分析结果



Agilent Technologies

引言

化学合成实验室的主要任务是获得新的化合物，如新药物、新杀虫剂或新染料等，这些化合物应满足公司一定的前提。通常，要求按预定的结构进行合成，并且还需要对这样的结构进行一些修饰。化合物的合成涉及反应监测、反应产物控制、以及通过制备色谱纯化后的化合物的纯度检查。以前都是通过薄层色谱完成这些任务。有了快速液相色谱/质谱联用系统（LC/MS），化学家们能够更快地得到结果，更重要的是，能够得到更多更深层析的信息。这就是为什么越来越多的公司为他们化学家配备 LC/MS 的原因。

最近，无人值守 LC/MS 系统在这些方面得到了应用。它更便于经验不足的用户使用，能够以预定的色谱柱和色谱方法对所提交的样品进行分析，并在运行结束后用诸如 e-mail 等方式发送结果信息。许多情况下，这些用户并不熟悉 LC/MS 系统。因此，由超级用户负责监控 LC/MS 系统，设定色谱方法，保持 LC/MS 系统正常运行，并且在出错时能够重新启动系统。

通常情况下，有几个分析项目同时进行。因此，不同用户组或不同的个人用户需要进入正在运行的 LC 系统。更为重要的是，由于化合物的性质不同，不同的项目经常要求不同的分离选择性。

所有这些任务均能通过 Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案和 Agilent Easy Access 软件得到实施。这一液相色谱

系统最多能够使用不同长度和内径的 8 根色谱柱。超级用户可为已安装的色谱柱设定不同的分析方法，包括合适的柱平衡方法。超级用户还能为不同的用户组或个人用户设置不同的项目，并对不同的用户或用户组可以设置不同的权限。可以设置优先顺序，例如，把反应监测样品设为最优优先级，从而可以立即得到分析。分析任务完成后，可通过 e-mail 将报告发给相应的用户。

本文中，我们将 Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案与 Agilent 6410 单四极杆质谱仪和 Easy Access 软件用于下列实验室分析中：

- 三个用户组均需要进入 LC/MS 系统

- 同时运行四个不同的分析项目

所有用户组均进行以下分析任务：

- 反应监测

- 反应产物的质谱鉴定

- 用反应混合物进行色谱柱初选，寻找最适于制备纯化的色谱柱

- 制备色谱分离产物的纯度控制

实验部分

仪器

Agilent 1200 系列高分离快速液相色谱系统包含以下模块，固件版本为 A.06.10 或更高：

Agilent 1200 系列 SL 型二元泵，带脱气机

Agilent 1200 系列高效自动进样器 SL Plus

两个 Agilent 柱温箱 SL Plus，带有预装的驱动阀

方法开发阀工具包 (G4230B)：高压方法开发毛细管工具包，低扩散，适用于短柱

Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器 (DAD)

Agilent 6410 单四极杆质谱仪，带多模式离子源

多种 Agilent ZORBAX 快速分离高通量 (RRHT) 1.8 μ m 色谱柱

Agilent ChemStation B04.01，带 Agilent Easy Access 软件

结果与讨论

LC/MS 系统说明

Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案包括 2~3 个柱温箱 SL Plus 组合，与 Agilent 1200 系列标准液相色谱或快速分离液相色谱系统相整合[1]。一个柱温箱带有与泵相连的阀，可将流动相输送至不同的色谱柱。第二个柱温箱带有与检测器相连的阀，可以把正在运行的色谱柱中的流动相输送到检测器中。在两个装有低扩散热交换器的柱温箱组合中，最多能够安装八根长度在 100 mm 以内的色谱柱（图 1）。

该系统还能加装组合溶剂选择阀，装在一个泵通路上，可以提供最多 15 种不同溶剂的选择。两个柱温箱组合具有 4 个独立的加热区，可以设定不同柱温，这对需要较高柱温的特殊应用极为有利。

Easy Access 软件说明

Agilent Easy Access 软件允许用户在“无人值守”的情况下进行样品分析：输入样品信息，从列表中选择方法，按系统指令把样品放到正确的位置，然后就能回到他们的实验室等候结果 e-mail 了。[2,3]

根据用户的权限，可以允许他们修改所选的方法，如改变进样量或进样次数等。

超级用户负责进行系统的设置和管理，并确保系统正常运行，保证所有其他用户能够正常使用。

应用实例

本文所示实例中，系统配置有 4 种不同固定相的 50 × 2.1 mm 短柱，一根 100 × 2.1 mm 色谱柱，一根 150 × 2.1 mm 色谱柱。所有色谱柱的填料粒径均为 1.8-μm。

超级用户的系统设置和管理

在 ChemStation 软件中为每根色谱柱设定一种色谱方法。这项任务由超级用户完成，仅有该超级用户能够进入图 2 所示界面。Easy Access 软件的方法设置窗口中，ChemStation 方法显示为 CS 方法。为方便最终用户使用，easy access 方法的命名中含有表示用途的定义文字，例如“fast kinetic”。在说明栏内给出有关梯度的信息。在 CS Equilibration Method 项下，定义了柱平衡方法。本文的实例中，每根色谱柱均用与分析方法相同的色谱条件平衡。

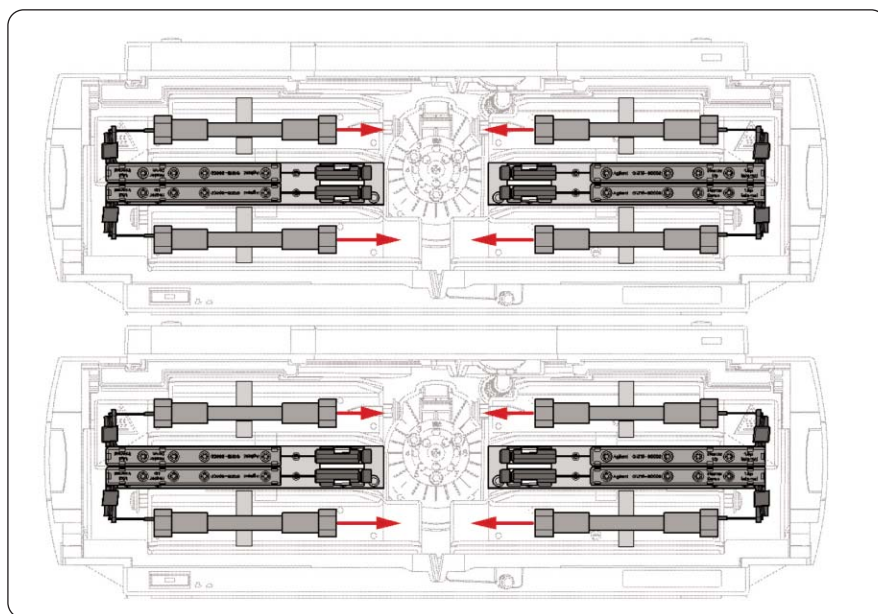


图 1
最多可装 8 根色谱柱的 Agilent 1200 系列柱温箱 SL plus 组合

图 2
Agilent Easy Access 软件中，由超级用户进行色谱参数设置的窗口

这样确保色谱柱已经处于实际梯度水平，并且实际的色谱图不会受色谱柱上残留物质的影响。但是对于同一色谱柱，任何其

他预设的方法也可用于柱平衡。只有当分析方法发生变化时，才会启用柱平衡方法。

完成了所有必要的输入后，结束 Easy Access 软件的方法设置。下一个窗口中，超级用户必须设定可进入系统的用户组 and 用户，同时设定权限，即允许他们对方法和其他参数进行修改的范围。

系统设置完成后，用户可以开始上机操作并提交样品。根据权限许可，输入必要的信息，选择方法，修改方法，按照系统的指令把一个或几个样品瓶放到指定位置，然后离开（图 3）。

第一组提交制备纯化样品

第一组的一位化学家提交了用于色谱柱初选样品。他选择了 4 根不同选择性的色谱柱，以寻找最适合对样品进行制备色谱纯化的色谱柱。把样品瓶放入样品盘中，以合适的平衡方法和运行参数在选定的色谱柱上开始分析。最终，用户得到了每次运行的报告，由此可以决定哪根色谱柱最为适用（图 4）。

色谱条件

色谱柱： 2.1 mm id × 50 mm, 1.8 μm, ZORBAX SB-C18, ZORBAX SB-CN, ZORBAX Bonus RP-C18, ZORBAX Eclipse PhenylHexyl
梯度： 0.8 分钟内流动相 B 比例由 5% 升至 85%，保持 1.5 分钟，以 0.8 mL/分钟的流速用 5% 的溶剂 B 重新平衡色谱柱至 2.4 分钟

DAD 和 MS 检测器

本应用中，Agilent ZORBAX SB-C18 柱最适合于制备分析，因为与其他三根色谱柱相比，它的主峰与前后色谱峰之间分离度最好。在制备分析中，选择了相同化学性质的色谱柱，即 21.2 mm id × 150 mm ZORBAX SB-C18, 5 μm, PrepHT 柱 870150-902。制备 LC/MS 系统同样由 Agilent Easy Access 软件控制，在无人值守的模式下运行。

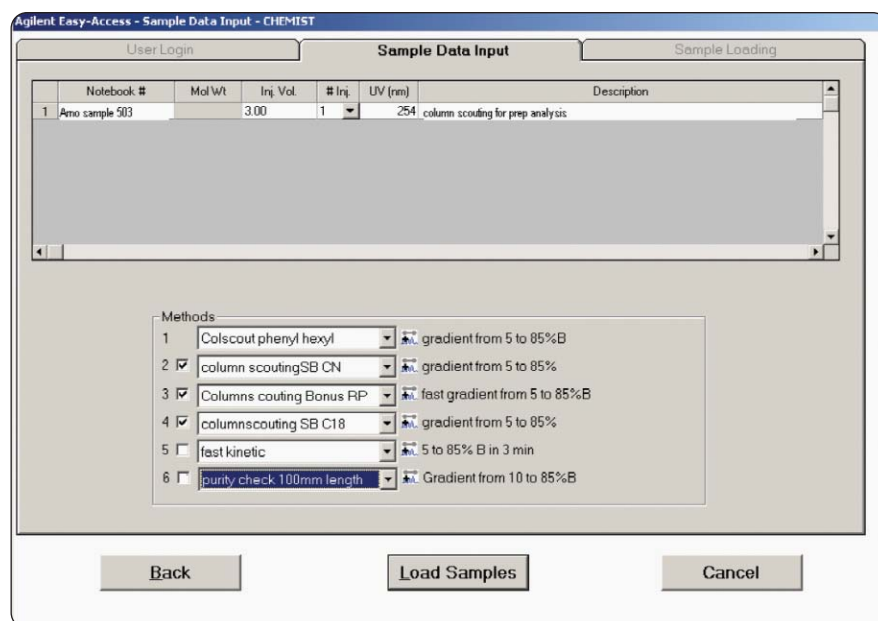


图 3
用户“Arno”提交色谱柱初选样品

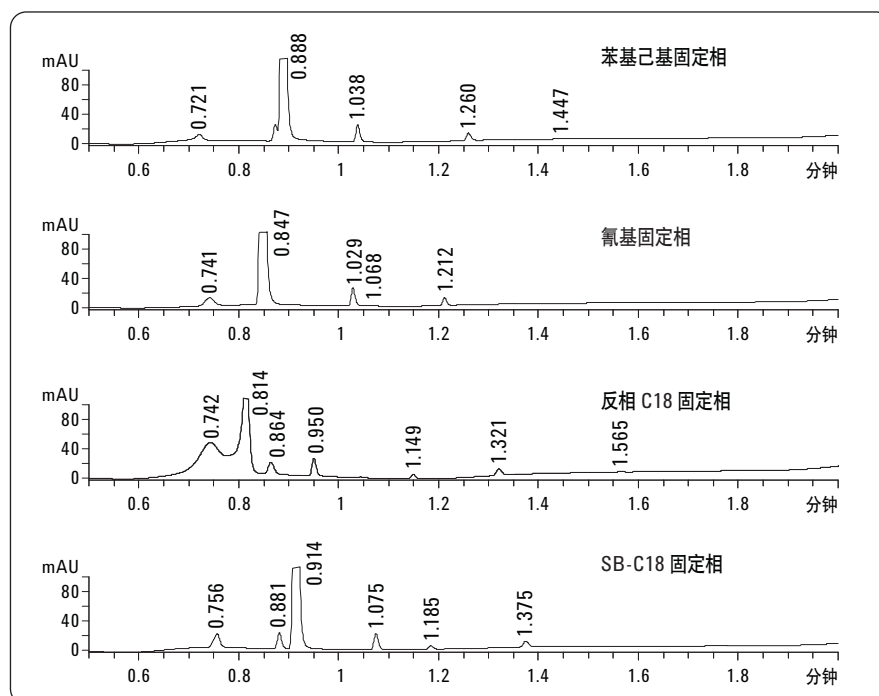


图 4
为寻找最佳制备分析条件而进行的色谱柱初选

纯化后

在完成化合物的纯化，并挥干溶剂后，所得到的馏分再次由第一组的一位同事提交，在一根 150 mm 的长柱上分析，以检查馏分是否干净，是否在挥干溶剂的过程中发生热分解，如果不纯，看看可能含有哪些杂质。

图 5 的左半部分显示了装有样品瓶的样品盘。右半部分列出了已完成分析的样品及待分析样品。本例中，即将进行纯度检查样品的分析。在屏幕的顶部显示了剩余的分析可能需要的时间。用户可以估算还有多久能够得到结果。分析结束后，用户通过 e-mail 获得结果。

馏分的纯度足够高，可以用于进一步的分析评价（图 6）。

色谱条件	
色谱柱:	2.1 mm id x 150 mm ZORBAX SB-C18, 1.8 μm
梯度:	在 8 分钟内，流动相 B 的比例由 10% 升至 85%，该比例保留至 9 分钟，再以 10% 的溶剂 B 重新平衡至 11 分钟
流速:	0.3 mL/分钟
DAD 和 MS 检测器	

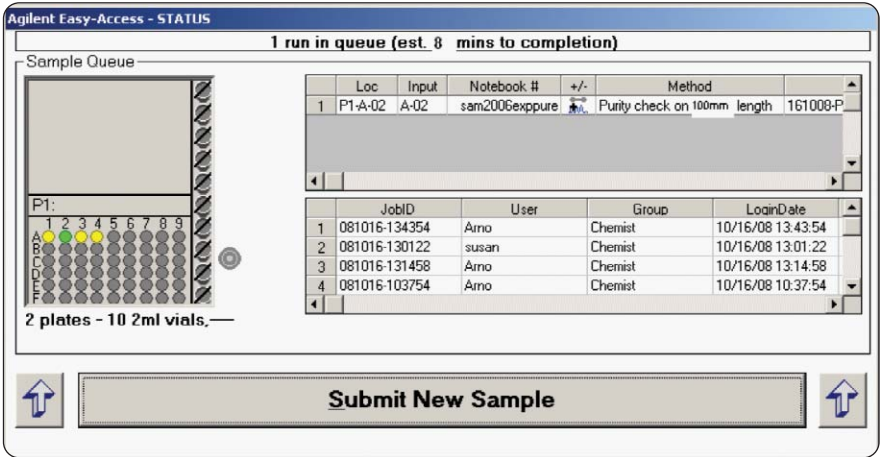


图 5
Agilent Easy Access 软件的监测窗口

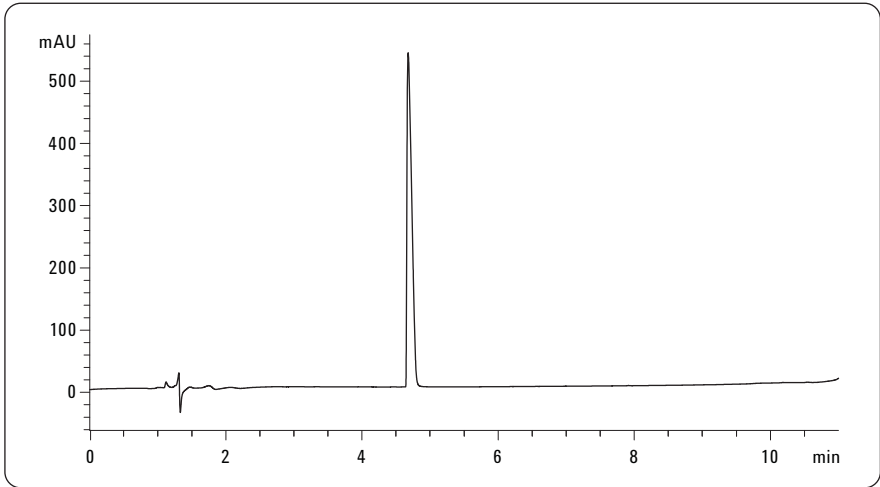


图 6
制备纯化后的纯度检查

第二组提交反应监测样品

与此同时，第二组的一位化学家在一个半小时内提交了一些样品，用于监测反应是否完成。为及时得到结果，这些样品以最优优先顺序进行分析。选择方法 Fast Kinetics，设置这些样品为第一优先级，然后在前一次运行结束后，立即开始分析。动力学分析结果见图 7。

色谱条件

色谱柱： 2.1 mm id × 50 mm ZORBAX SB-C18

梯度： 在 1.5 分钟内，流动相 B 的比例由 5% 升至 95%，该比例保留至 2.5 分钟，再以 5% 的溶剂 B 重新平衡至 3.6 分钟

流速： 0.8 mL/min

DAD 和 MS 检测器

除紫外色谱图外，扫描模式得到的质谱信号可用于检测是否生成预期产物，并得到一些副产物的分子量信息。图 8 为得到的质谱图。

预期产物在 1.5 小时内生成，收率较高。同时生成了两种副产物，有待进一步确证结构。

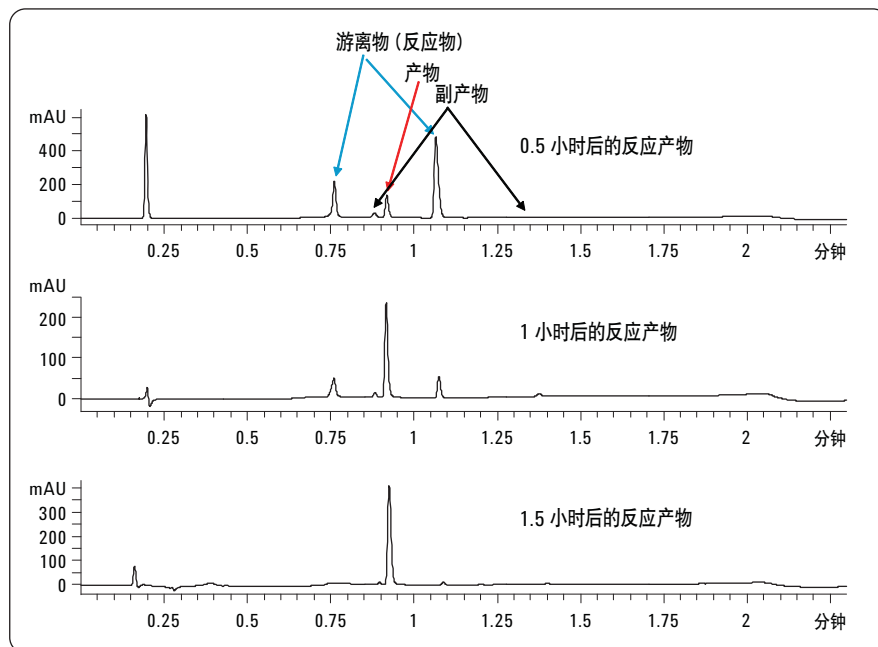


图 7
反应动力学研究

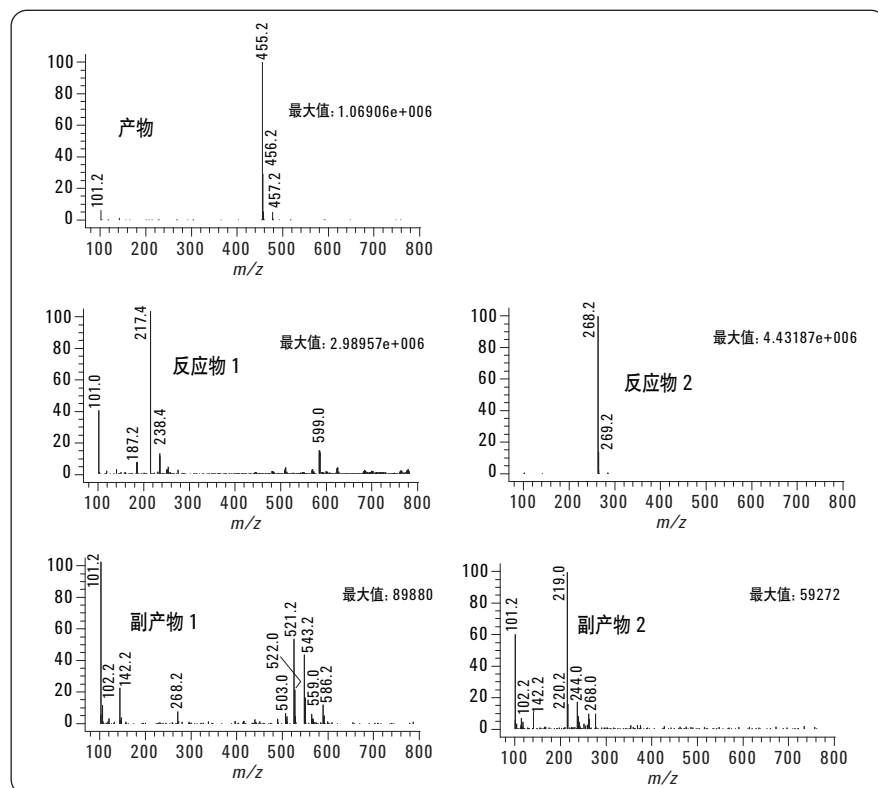


图 8
提交样品的质谱图

第三组提交对反应产物进行控制的样品

第三组进入 LC/MS 系统，提交两种化合物反应中得到的样品。色谱图显示主峰的分离度很差。应用液质联用分析得到反应产物的有关信息。图 9 的紫外检测色谱图中，显示了 3~4 个主要色谱峰和 4 个小色谱峰。同时，显示了扫描模式下的质谱检测得到的总离子色谱图和主峰的提取离子色谱图。保留时间 1.087 分钟、质量为 450.4 的反应产物在 2 小时后生成。

反应动力学显示反应速度相当慢，可能反应参数（如温度等）不适宜。因此，预期产物收率较低。

结论

包括分析和制备 LC/MS 系统在内的开放 LC/MS 平台的建立，提高了化学家的工作效率，使他们能够更快地得到分析结果。这样，化学家们无需在远程的分析实验室里等待，而可以继续他们的下一步工作。

通过 Agilent 1200 系列液相色谱方法开发解决方案和 Agilent Easy Access 的联用，在系统中加入了多种色谱柱和多个溶剂选择，使得这一系统更适合化学家的需求，

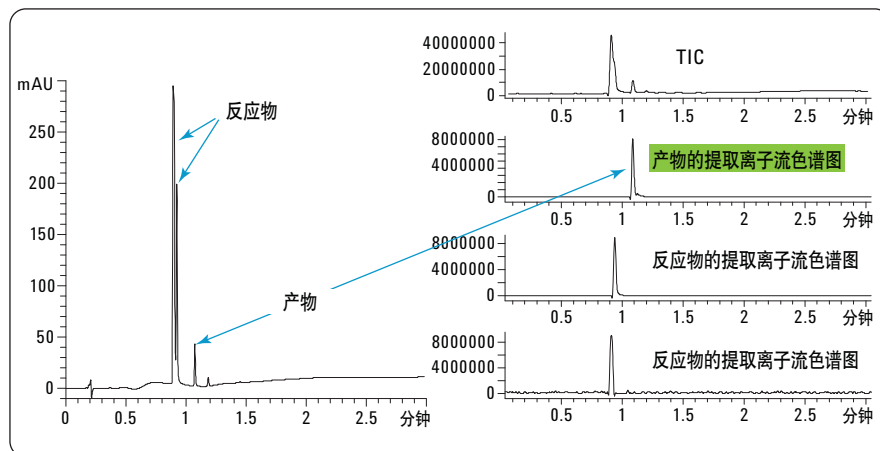


图 9
反应混合物的 UV 色谱图, TIC 和 EI

帮助化学家们提高工作效率。不同用户组最多可以使用八根选择性和分离性能不同的色谱柱，不管遇到何种分析任务，总能满足不同性质的化合物的分离要求，而无需更换任何硬件。

该系统为色谱柱初选、反应监测和制备纯化后的纯度检查提供了最佳条件。系统可配置不同检测器，如紫外和质谱检测器。Easy Access 软件可以按逻辑顺序方便地进行不同性质样品的测试。可以通过 e-mail 发送报告。

参考文献

1. A.G. Huesgen, "Agilent 1200 Series LC method development solution – Automated method development with up to eight columns." Agilent Technical Note 5989-9338EN, **2008**
2. W. Duncan, D. McIntyre, "Increasing productivity with LC/MS Easy Access software." Agilent Technical Note 5988-5525EN, **2002**
3. D. McIntyre, "Continuous Operation of a High Throughput LC/MS System in a Walk Up Environment." Agilent Technical Note 5989-6714EN, **2007**

www.agilent.com/chem/1200mds

© 安捷伦科技公司，2009
2009 年 2 月中国印刷
5990-3358CHCN



Agilent Technologies