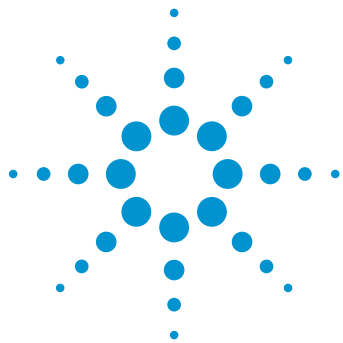




使用 Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱方法开发解决方案和 Agilent MassHunter Walkup 软件的液相色谱 Walk-up 系统

在同一液相色谱系统上可用多达八根色谱柱进行反应动力学试验、色谱柱筛选以及杂质检查

应用简报

药物开发

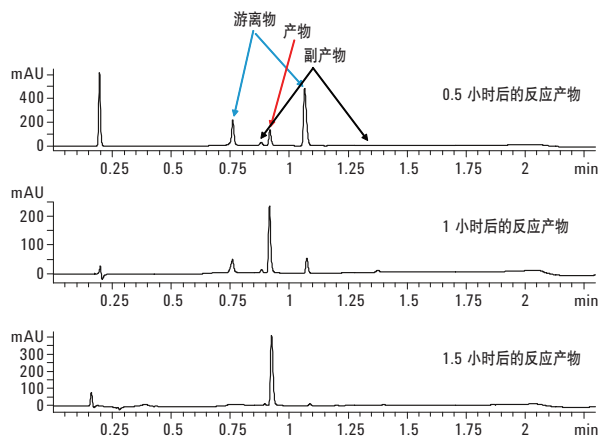
作者

Angelika Gratzfeld-Hüsken,
Michael Frank
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔德布隆

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。通常会有多个小组或单个用户开展不同的项目。在以下分析任务中，需要应用液相色谱和质谱联用技术：

- 实时反应监测
- 反应产物控制
- 进行制备型液相色谱分析前的色谱柱筛选
- 制备型液相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

前言

化学合成实验室的主要任务是合成新的化合物，比如能满足管理公司一定先决条件的新药、新农药或者新染料。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。化合物合成涉及反应监测、反应产物控制以及经制备型液相色谱纯化后的化合物的纯度检查。过去，通常用薄层色谱来完成这些任务；但是有了快速液质联用仪 (LC/MS) 后，化学家可以更快地获得结果，最重要的是，能够获得更多更深入的信息。这就是为什么越来越多的公司为其化学家们配备 LC/MS 系统的原因。

最近，化学合成实验室采用了无人值守 LC/MS 系统，这种系统可以让缺乏经验的用户轻松掌握该系统，能够以预设的色谱柱和色谱方法对所提交的样品进行分析，并且在运行完成之后通过诸如电子邮件的方式发送结果信息。在很多情况下，这些用户不熟悉 LC/MS 系统。因此，由超级用户监控 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。

通常会同时进行多个项目。因此，不同的用户组或单个用户需要进入正在运行的液相色谱系统。最重要的是，由于化合物的性质不同，不同的项目通常需要不同的分离选择性。所有这些任务都可以通过 Agilent 1200

Infinity 系列液相色谱方法开发解决方案和 Agilent MassHunter Walkup 软件来完成。该液相色谱系统最多能够使用不同长度及内径的八根色谱柱。超级用户可以为安装的色谱柱定义不同的分析方法，包括合适的柱平衡方法。另外，超级用户还可以为不同的用户组或单个用户设置不同的项目，并对不同的用户和用户组设置不同的使用权限级别。可以设置优先权；比如说，把反应监测样品设为最优先级，从而可以立即得到分析。在分析完成之后，可以通过电子邮件将报告发送给相应的用户。

在本文中，我们采用 Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱方法开发解决方案以及 Agilent 6140 单四极杆质谱和 MassHunter Walkup 软件，用于以下实验室环境：

- 三个用户组需要进入 LC/MS 系统
- 同时运行四个不同的分析项目

所有用户组需完成如下分析任务：

- 反应监测
- 反应产物的质谱鉴定
- 为反应混合物筛选色谱柱，以找到最适用于制备纯化的色谱柱
- 制备型色谱柱分离产物的纯度控制

实验部分

仪器设备

- Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱方法开发解决方案包含以下模块，固件版本为 A.06.10 或更高：
- Agilent 1290 Infinity 四元泵 (G4204A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 自动进样器温控 (G1330B)
- 两个 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)，分别带内置高压和低压色谱柱切换阀
- 方法开发阀工具包 (G4230B)：高压方法开发毛细管工具包，低扩散，用于短色谱柱
- Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)
- Agilent 6140 单四极杆 LC/MS 系统，带多模式离子源
- 几根 Agilent ZORBAX 超高压快速高通量 (RRHT) 1.8 μ m 柱
- Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版 (版本 C.01.05) 和 Agilent MassHunter Walkup 软件 (版本 C.01.00)

结果与讨论

LC/MS 系统说明

Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱方法开发解决方案包括与 1260 Infinity 或 1290 Infinity 液相色谱集成的两个或三个一组的柱温箱。一个带阀的柱温箱连接泵，将流动相送入不同的色谱柱。第二个带阀的柱温箱连接检测器，将来自分离柱的流动相送入检测器。在两个装有低扩散热交换器的柱温箱中，最多能够安装八根长度在 100 mm 以内的色谱柱（图 1）。

系统可以配置额外的溶剂选择阀，这种阀可安装在一个泵通道上，可以提供最多 15 种不同溶剂的选择。两个柱温箱组合具有四个独立的加热区，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。

MassHunter Walkup 软件说明

Agilent MassHunter Walkup 软件可以使用户实现“无人值守”样品分析，在输入样品信息、从方法列表中选择合适的方法并按系统指示放置样品之后，用户就可以返回实验室等待电子邮件发送结果。

根据用户的权限，可以允许他们在一定程度上修改所选择的方法，比如修改进样量或者进样次数。

超级用户负责进行系统的配置和管理，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

在本文所示实例中，系统设置有四种不同固定相的短色谱柱 (50 × 2.1 mm)：一根 100 × 2.1 mm 色谱柱，一根 150 × 2.1 mm 色谱柱。所有的色谱柱均填充 1.8 μm 的颗粒。

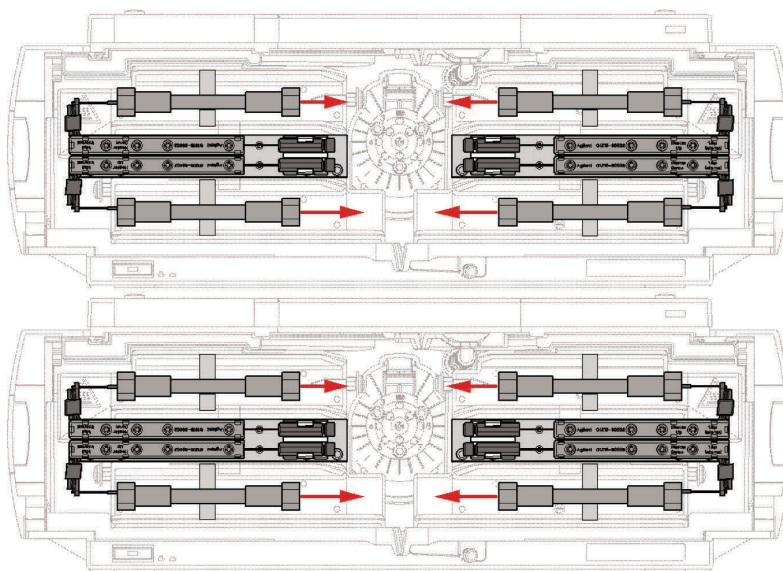


图 1. 最多可装八根色谱柱的 Agilent 1290 Infinity 柱温箱组合

超级用户的系统配置和管理

在 ChemStation 软件中为每根色谱柱设定一种色谱方法。这项任务必须由超级用户完成，仅该超级用户能够进入图 2 所示窗口。为了方便最终用户的使用，在使用时，MassHunter Walkup 方法的命名中含有表示用途的定义文字，在本实例中，命名为“fast kinetic”。在管理员菜单中，可以设置色谱方法以及平衡方法和色谱柱净化方法。在本例中，每根色谱柱均用与分析方法相同的色谱条件平衡。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，任何其他预设方法也可用于色谱柱的平衡。只有当分析方法发生改变时才会执行平衡方法。

完成了所有必要的输入后，便完成了 MassHunter Walkup 软件中的方法设置。在下一个窗口中，超级用户需要设定可以进入系统的用户组 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。

配置完系统后，用户即可开始上机操作并提交其样品。根据使用权限，填写必要的信息、选择方法和修改方法，按照系统的指令把一个或多个样品瓶放在指定位置，然后离开（图 3）。

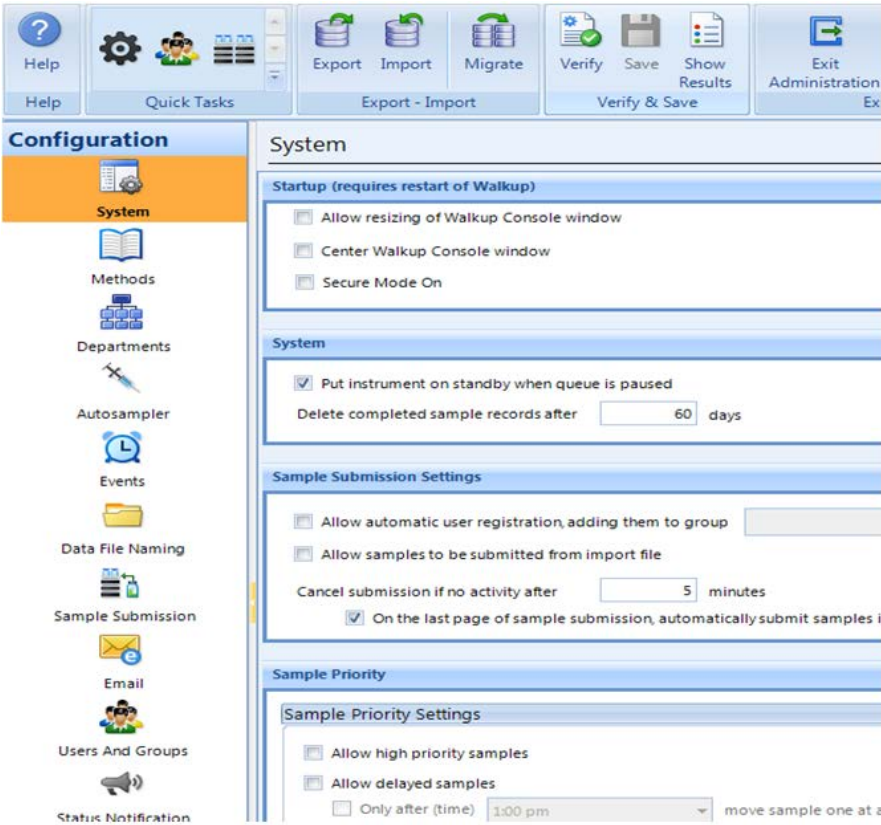


图 2. Agilent MassHunter Walkup 软件中，由超级用户进行色谱参数设置的窗口

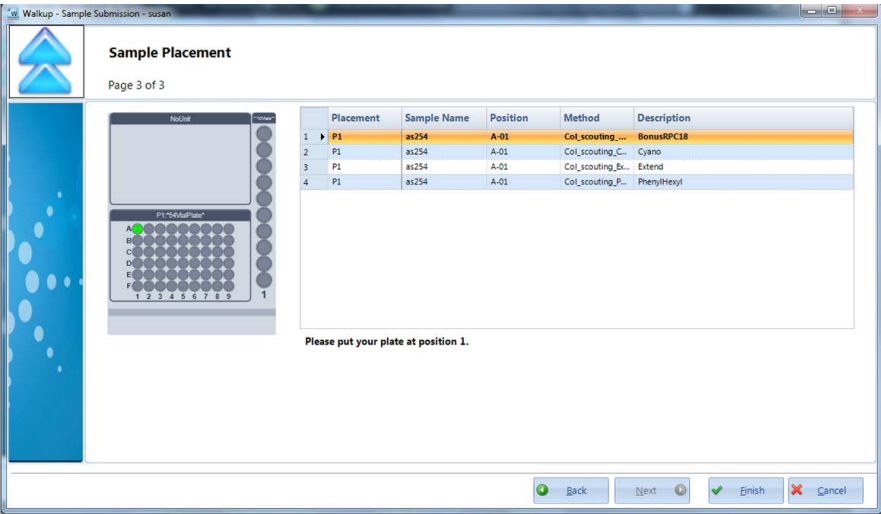


图 3. 用户提交色谱柱筛选的样品

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筛选的样品。他选择了四根不同选择性的色谱柱，以寻找最适用于样品制备纯化的色谱柱。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。分析完成后，用户可以得到每次运行的报告，然后决定哪根柱子最合适（图 4）。

色谱条件

色谱柱	2.1 mm 内径 × 50 mm, 1.8 μm, Agilent ZORBAX SB-C18, Agilent ZORBAX SB-CN, Agilent ZORBAX Bonus RP-C18, Agilent ZORBAX Eclipse Phenyl Hexyl
梯度程序	0.8 min 内流动相 B 比例由 5% 升至 85%，保持 1.5 min，以 0.8 mL/min 的流速用 5% 的溶剂 B 重新平衡色谱柱至 2.4 min

DAD 和 MS 检测器

在本例中，Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱是进行制备分析的最佳色谱柱，因为在该柱上主峰前和峰后的分离度比在其他三种色谱柱上的好。在制备分析中，选择了相同化学性质的色谱柱，即 ZORBAX SB-C18, 21.2 × 150 mm, 5 μm PrepHT870150-902。制备型 LC/MS 系统同样由 Agilent MassHunter Walkup 软件在无人值守模式下控制。

纯化完成后

在完成化合物的纯化并蒸干试剂后，将得到的流分再次由第一组的一位同事提交，在一根 150 mm 长的色谱柱上进行分析，以检查流分是否干净，是否在溶剂蒸发过程中发生热降解，如果不纯，查看尽可能多的杂质。

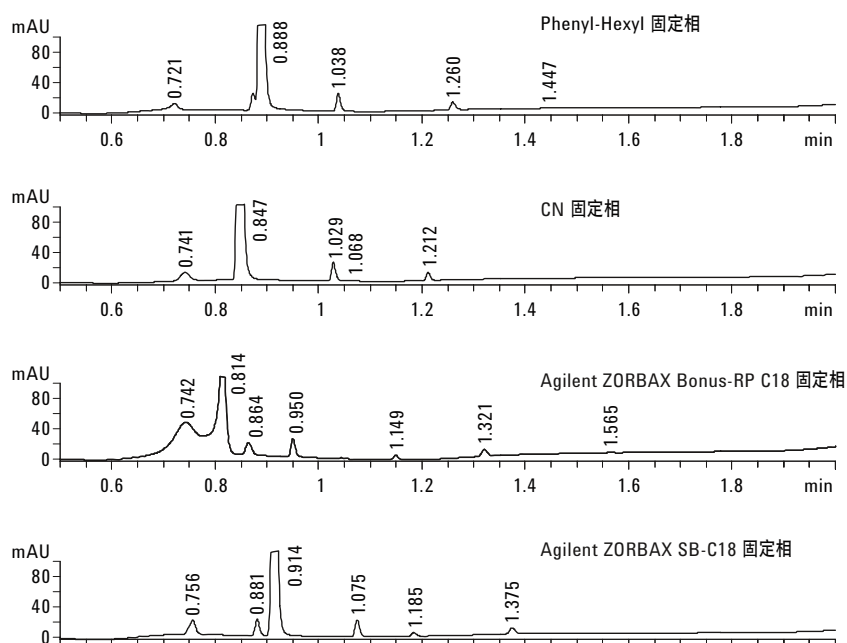


图 4. 为寻找最佳制备分析条件而进行的色谱柱筛选

图 5 左侧部分显示的是放置有样品瓶的样品盘。右侧列出了已经分析完的样品和待测的样品。在本例中，接下来要进样的是用于色谱柱筛选的样品。窗口的顶端给出了系统完成剩余运行估计需要的时间。用户可以估计大概多久能够得到结果。在分析完成后，用户可以通过电子邮件获得结果。

流分的纯度足够用于进行进一步的分析评估（图 6）。

色谱条件	
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm
梯度程序	8 min 内，流动相 B 的比例由 10% 升至 85%，该比例保留至 9 min，再以 10% 的溶剂 B 重新平衡至 11 min
流速	0.3 mL/min

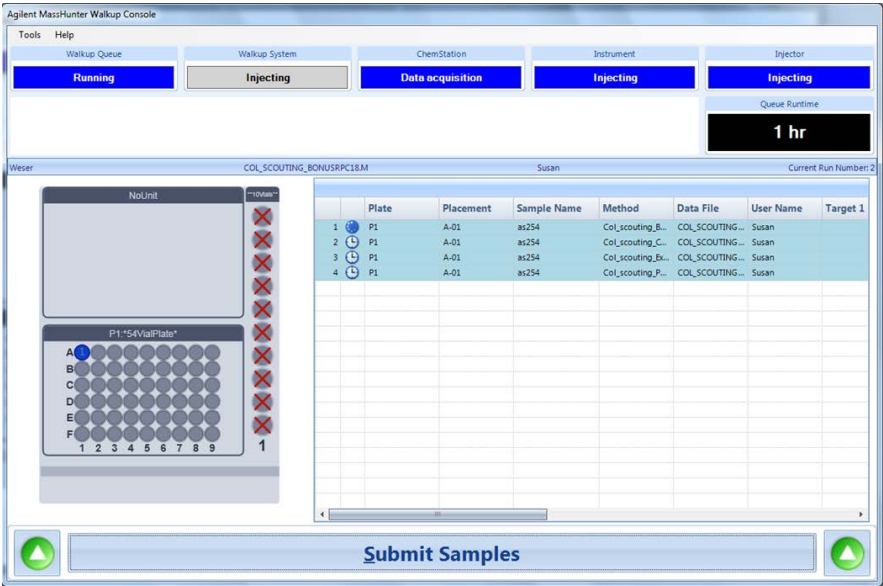


图 5. Agilent MassHunter Walkup 软件的监测窗口

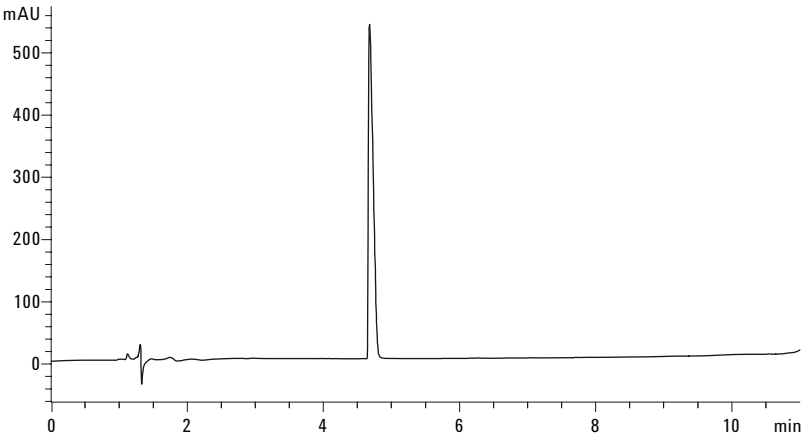


图 6. 制备纯化后的纯度检查

DAD 和 MS 检测器

第二组提交反应监测样品

与此同时，第二组的化学家在一个半小时内提交了多个样品，用于检测反应是否完成。为了及时得到结果，这些样品以最优先顺序进行分析。选择方法 Fast Kinetics，将这些样品设为第一优先权，在前一次运行结束后立即开始分析这些样品。动力学分析结果见图 7。

色谱条件	
色谱柱	Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 × 50 mm
梯度程序	1.5 min 内，流动相 B 的比例由 5% 升至 95%，该比例保留至 2.5 min，再以 5% 的溶剂 B 重新平衡至 3.6 min
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以用于检测是否生成了目标产物，并能得到一些副产品的质量数信息。图 8 为得到的质谱图。

目标产物在一个半小时内生成，收率较高。同时生成了两种副产物，有待进一步确证结构。

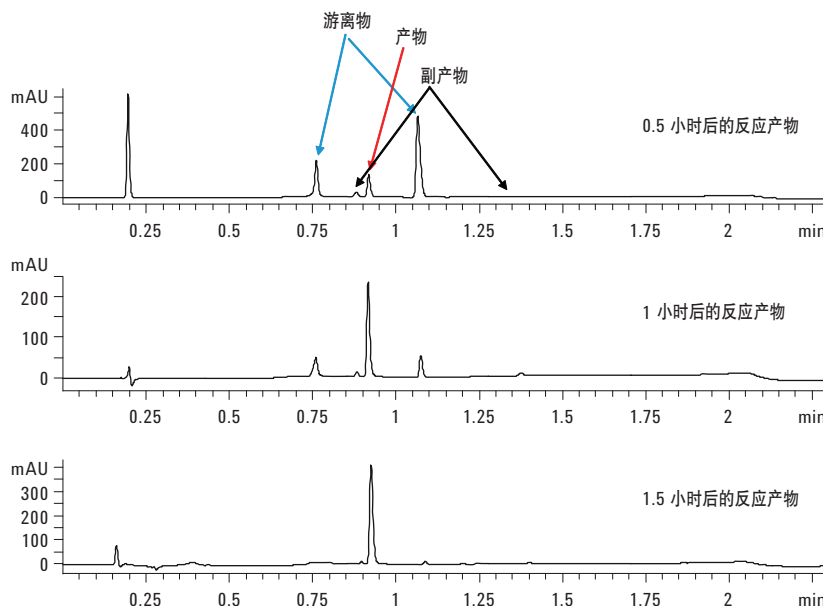


图 7. 反应动力学研究

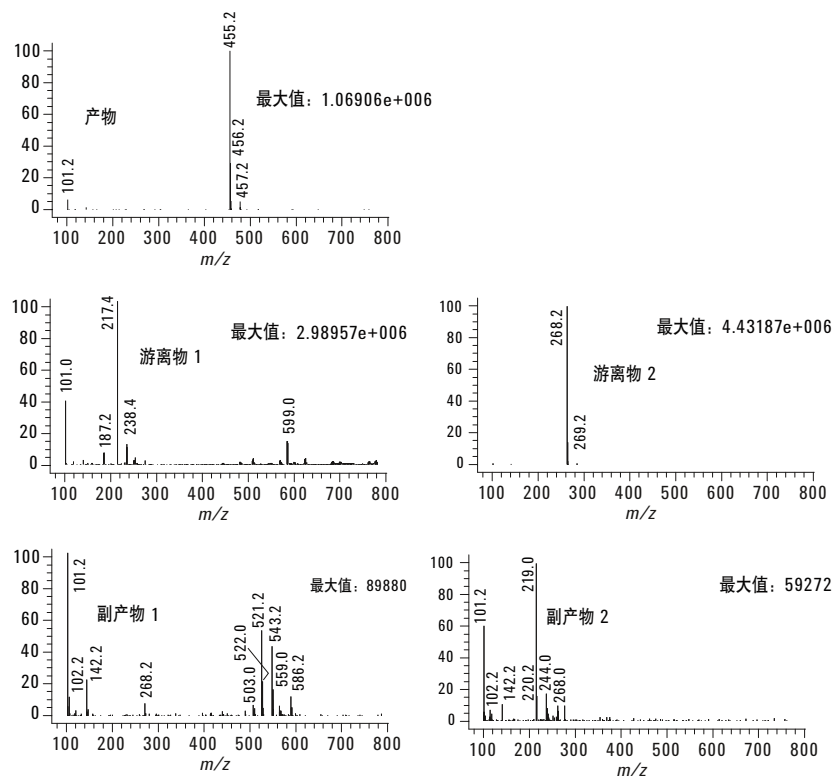


图 8. 提交样品的质谱图

第三组提交了用于控制反应产物的样品

第三组进入 LC/MS 系统，提交两种化合物反应生成的样品。得到的色谱图显示主峰的分离度很差。为了获得反应产物的有关信息，进行了 LC/MS 分析。图 9 的紫外色谱图中，显示了三到四个主要色谱峰和四个小色谱峰。另外还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、质量数为 450.4 的目标产物在 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，目标产物的收率很低。

结论

使用分析型和制备型 LC/MS 系统设置开放式的 LC/MS 环境提高了化学家的效率，使他们能够以最快的速度获得分析结果。这样，化学家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 Infinity 系统和 Agilent MassHunter Walkup 软件的联用，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，帮助化学家

提高工作效率。不同的用户组最多可以使用八根选择性或者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。

该系统为色谱柱筛选、反应监测以及制备纯化后的纯度检查提供了最佳条件。系统可以配置不同检测器，包括紫外和质谱检测器。MassHunter Walkup 软件可以按逻辑顺序方便地进行不同性质样品的测试。可以通过电子邮件发送报告。

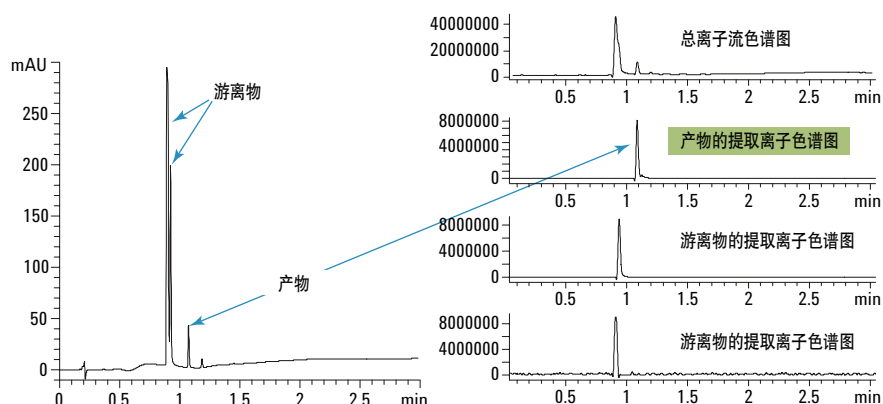


图 9. 反应混合物的紫外谱图、总离子流色谱图以及提取离子色谱图

www.agilent.com/chem/1200mds

本资料中的信息如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

2013 年 9 月 30 日，中国出版

5991-2868CHCN



Agilent Technologies