



从分析条件筛选至馏分重新分析的制备 色谱自动化工作流程解决方案

配有安捷伦自动纯化软件的 Agilent 1260 Infinity 制备型
LC/MS 纯化系统

技术概述

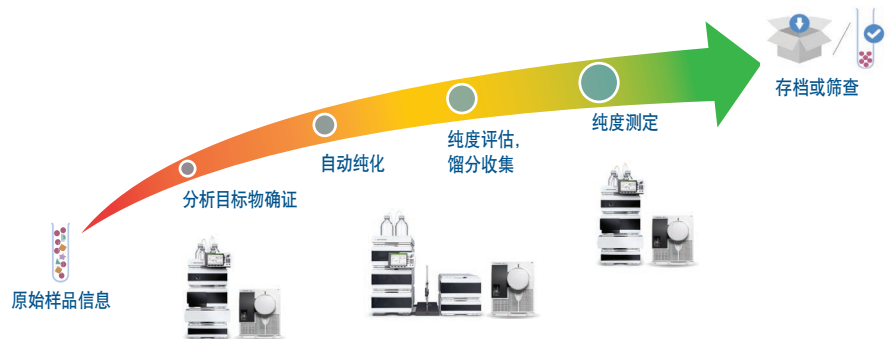
作者

Pierre Penduff
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, 德国

摘要

对于经过漫长而复杂的合成过程所得到的有价值的产物或产物库，纯化是一个非常重要的过程。安捷伦自动纯化软件引进了开放式解决方案进行物质分离，并且能够利用自动化聚焦梯度简化纯化前后的步骤。

本技术概述将说明从原始样品分析条件筛选提交至纯目标产物的存档或筛查需遵循的简单步骤。例如，使用自动纯化软件通过 Agilent 1260 Infinity 制备型 LC/MS 纯化系统纯化所含目标峰与杂质峰发生重叠的纯化样品。本次纯化所得纯目标化合物的回收率为 88%，较标准纯化方法节省了 40% 的溶剂和运行时间。



Agilent Technologies

前言

在合成化学领域，纯化工艺的自动化是研究小组提高工作效率的关键之一。将分析型系统上进行的化合物分离放大至制备液相色谱系统时，需要进行分析柱的优化步骤。这一步骤涉及了目标化合物分离的梯度方法开发，并且需要在纯度、通量和时间之间达到最佳平衡。从这些角度来看，聚焦梯度分析可为目标化合物纯化提供最佳的解决方案。为提高精细聚焦梯度分析的性能，用户必须具备良好的制备液相色谱及方法开发的知识（关于从分析到制备的放大工艺的更多详细信息，请参阅安捷伦技术概览 5991 2013EN¹）。

安捷伦自动纯化软件结合了聚焦梯度的卓越性能和自动化的制备色谱工作流程。该软件系统附加到安捷伦 OpenLAB CDS Chemstation 中，为用户提供了开放式的系统权限。

出于此目的，软件提供了两种不同的用户模式：

- 在专家 (Expert) 模式下，用户可轻松选择使用默认的自动纯化设置或使用定制化的方法设置
- 在简单制备 (Easy-Prep) 模式下，操作员按照已定义的简单易用的用户界面执行操作

在简单制备模式下所用的方法只能完全由管理者进行管理和定制。

本技术概览通过简化的操作员视图介绍了在简单制备模式下的纯化步骤。

实验部分

仪器

分析型

Agilent 1260 Infinity 二元 LC/MS 系统包含：

Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G1312B)

Agilent 1260 Infinity 高性能脱气机 (G4225A)

Agilent 1260 Infinity 高性能自动进样器 (G1367E)

Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)

Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315C)，配有标准流通池 (G1315C#018) Agilent 6140 单四极杆质谱仪

制备型

Agilent 1260 Infinity 制备型 LC/MS 纯化系统包含：

Agilent 1260 Infinity 制备型泵 (G1361A, G1391A)

Agilent 1260 Infinity 制备型自动进样器 (G2260A)

Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G1315C)，配有石英流通池，光程 0.06 mm (G1315C#026)

Agilent 1200 系列色谱柱组合架 (G1383A)

Agilent 1260 Infinity 馏分收集器 PS (G1364B)

Agilent 6120 单四极杆质谱仪

色谱柱

Agilent ZORBAX RRHT StableBond SB-C18 柱，2.1 × 50 mm，1.8 μm (825700-902) 包含：

Agilent ZORBAX RRHT 卡套柱卡套，50 mm (820555-901)

Agilent ZORBAX Prep HT SB-C18 柱，21.2 × 100 mm，5 μm (870100-902) 及柱接头 (820400-901)

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation，LC 和 LC/MS 系统版，C.01.05 版 [40]

附加的安捷伦自动纯化软件，A.01.01 版

溶剂和样品

溶剂 A：水 + 0.1% 甲酸

溶剂 B：乙腈 + 0.1% 甲酸

分析型和制备型系统所运行的纯化混合物：类似药物的样品混合物

所有试剂均为液相色谱级，不需脱气。新制超纯水来自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (EMD 密理博，比勒利卡，马萨诸塞州，美国)。

色谱和质谱条件

分析型普通梯度方法

流速	0.800 mL/min
柱温	40 °C
2% B 等度保持 0.2 min	
在 4 min 内, 梯度从 2% 上升至 98%	
98% B 冲洗 0.8 min	
进样量	0.5 µL
UV 波长	230 nm, 带宽 40 nm, 无参比

制备型聚焦梯度方法

自动化聚焦梯度	从分析条件筛选运行中实时产生 通过分子式/质量数识别预期化合物
流速	29.3 mL/min (由自动纯化软件自动设置的流速)
进样量	350 µL
UV 波长	230 nm, 带宽 40 nm, 无参比

质谱条件

扫描/碎裂参数

API-ES 电离模式, 正/负切换	
循环时间百分比/极性	50.00 %
扫描质量范围 (正和负模式)	125–725
碎裂电压	70
EMV 增益	1.0
阈值	150
步长	0.20

MSD 雾化室

干燥气温度	350 °C
干燥气流速	12.0 L/min
雾化器压力	50 psig
四极杆温度	350 °C
毛细管电压 (+)	3500 V
毛细管电压 (-)	3000 V

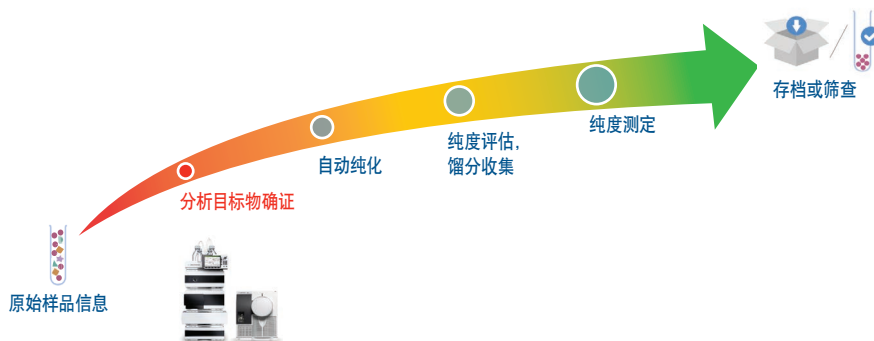
结果与讨论

分析目标物确证

创建任务

通过任意一种安捷伦分析系统（如 1260 Infinity 二元 LC/MS 系统）监控并确定反应结束后，提交样品进行纯化。自动化软件的简单制备用户界面分为两个不同的部分：任务进度部分和任务配置及结果部分（图 1）。

在任务进度部分，用户可用批次名称或序列名称创建任务以保存任务结果（分析和制备色谱运行），例如保存于工作组文件夹中。本任务采用组合系统创建，一种用分析型系统运行，一种用制备型系统运行。



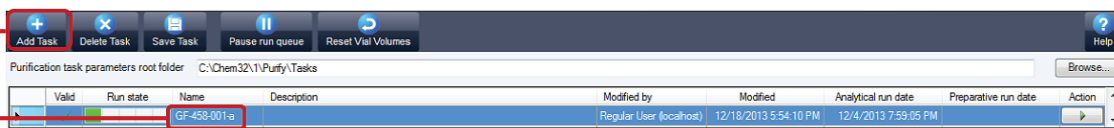
然后，组合结果在任务配置及结果部分的系统选择选项卡项下显示并汇总。各系统说明包括预设的特征参数，如驻留体积、色谱柱性能指标、流速、UV 和 MS 之间的延迟时间或检测器至馏分收集器之间的延迟时间。

这种系统选择为管理员指定了预设制备梯度洗脱程序，该梯度程序需要用于特定的放大工艺。

在本文的示例中，为纯化工艺指定位于实验室 2 的 1260 Infinity 二元系统和 Open-Access 1260 Infinity 制备型 LC/MS 系统的系统特征。考虑到放大工艺的不同参数，根据系统的组合结果生成了梯度洗脱程序。

任务进度部分

1. 创建任务



2. 批次/任务名称

任务配置及结果部分

3. 系统选择视图

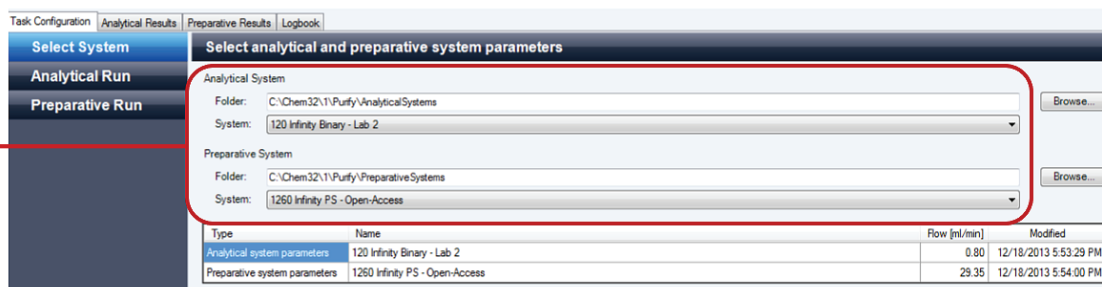


图 1. 安捷伦自动化软件简单制备用户视图下的用户界面

分析目标物确证

分析运行选择和制备任务提交

为了完成任务提交，用户需在分析数据根文件夹下浏览分析结果并指定制备样品盘位置和进样量。

分析型质谱数据提供了目标峰识别所需的信息。通过提取目标化合物的离子色谱图，软件自动识别目标峰以便于制备型分析的运行。

分析数据的色谱条件表征了目标峰的洗脱。针对这个洗脱区域生成制备梯度。

从任务进度部分将制备任务提交至运行队列。在这一步骤中，根据管理员确定的用户权限，简单制备用户可提交任务并查看自动峰识别或直接启动纯化工艺。

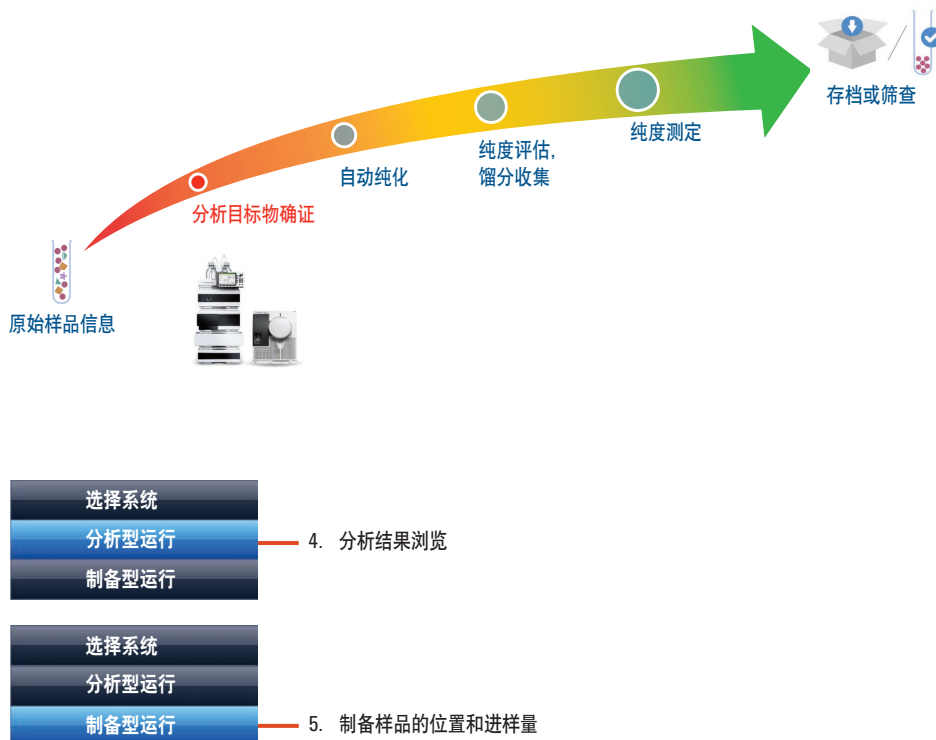
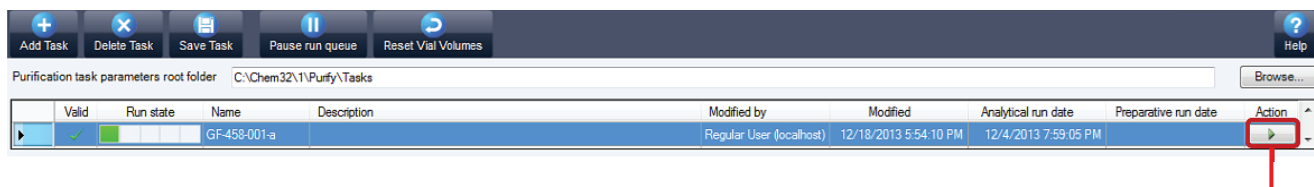


图 2. 分析数据选择和制备样品的位置及进样量



6. 制备任务提交，以用于：
- 纯化前进行复核
 - 无需复核直接进行纯化

图 3. 制备任务提交

自动纯化

从分析运行查看目标峰和梯度（可选）

如果允许简单制备用户查看目标化合物自动识别，分析色谱图将突出显示识别的目标峰，如图 4 所示。若突出显示的峰与预期的目标化合物不匹配，可手动指定其他目标峰。

然后，梯度程序将自动更新至目标物的新洗脱区域并变更用于制备运行的自动梯度程序（图 5）。

根据系统特征和目标峰的洗脱区域生成聚焦梯度，以提高对目标峰的色谱选择性并缩短制备运行的运行时间（图 5）。

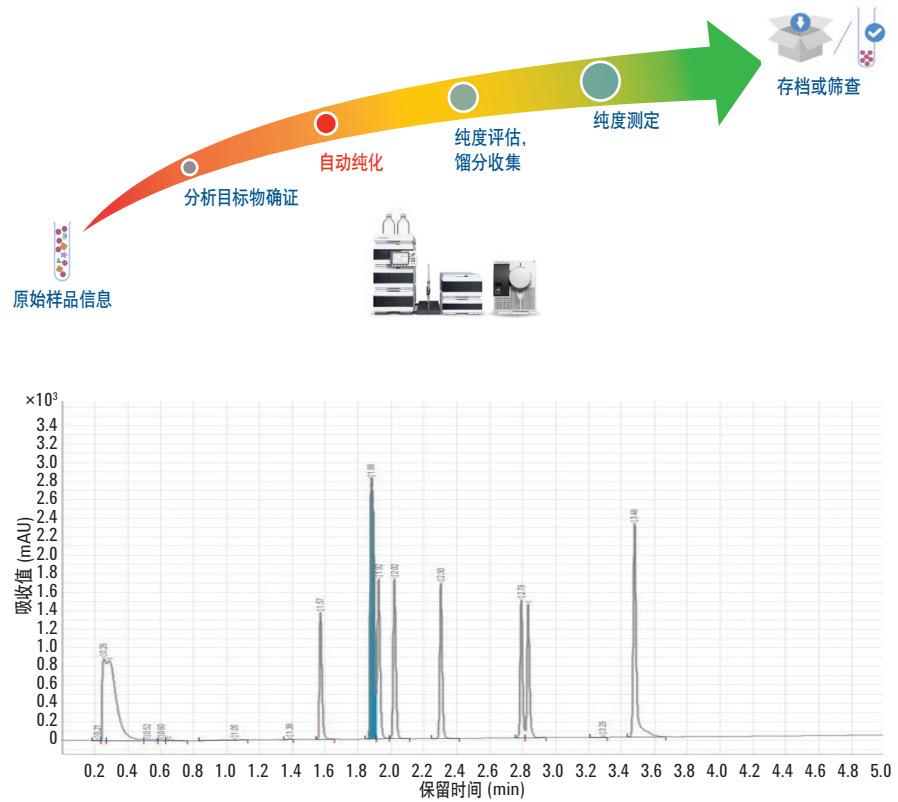


图 4. 通过分析数据和目标物质量数自动识别目标峰

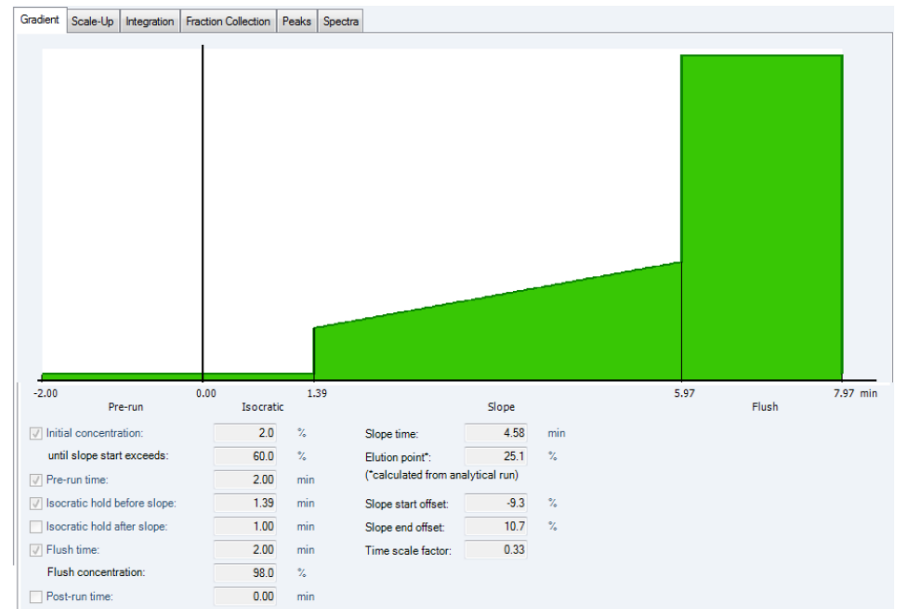


图 5. 根据目标峰洗脱自动生成聚焦梯度

自动纯化

制备运行查看

纯化运行提交并执行之后，可在任务配置及结果部分查看汇总的制备结果（图 6）。该选项卡显示：

- 制备样品在自动进样器托盘的位置（左上方）
- 收集馏分的位置及其原始样品混合物附属物（右上方）
- 所选样品混合物纯化的制备色谱图（左下方）
- 所选馏分的平均质谱数据（右下方）

可将此信息输出，例如用于馏分收集或重组样品位置以进行馏分重新分析。

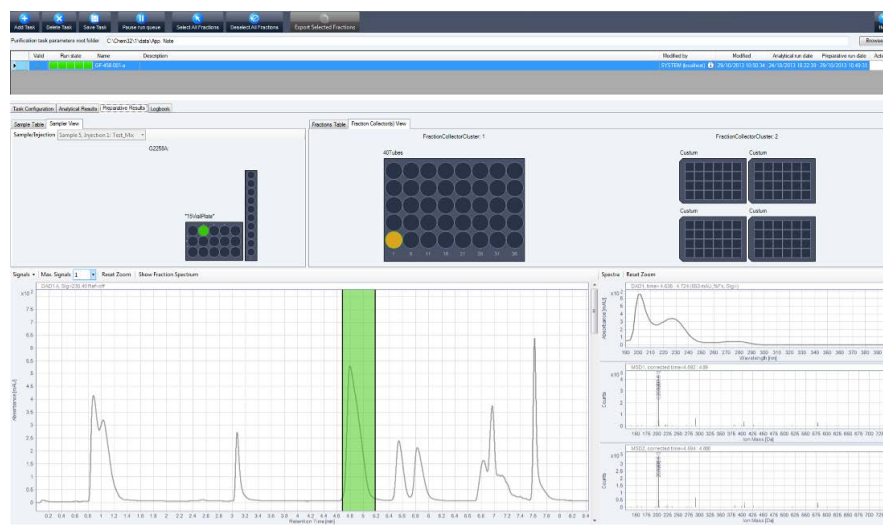
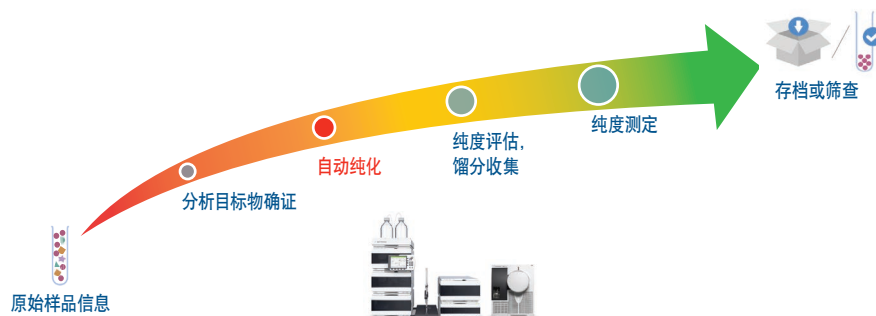


图 6. 制备结果查看

馏分纯度评估和收集

所选馏分的制备结果数据和平均质谱数据对选择用于馏分收集、溶剂蒸发，条件筛选或生物筛查的馏分提供了良好的评估。

在本示例中，馏分的质谱数据结果如图 7 所示。

纯化结果选项卡为输出所选馏分至液体处理器或分析型 LC 系统提供了简单的方法（图 8）。

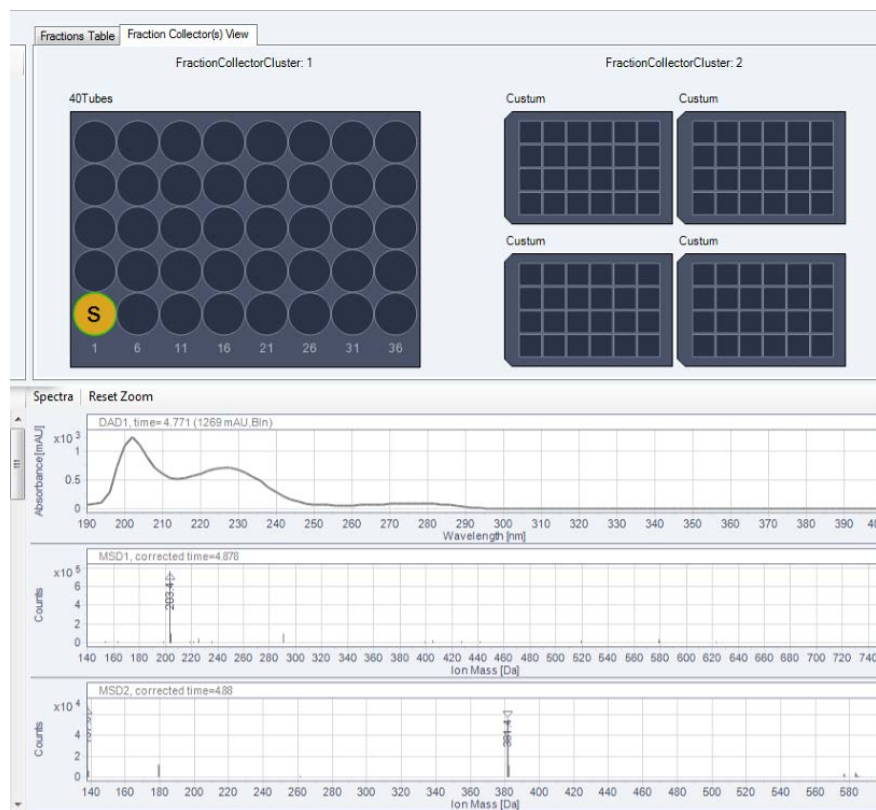
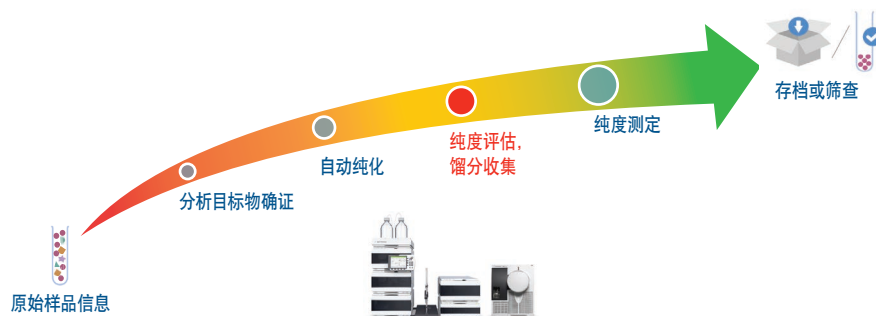


图 7. 所选的收集馏分和平均谱图数据

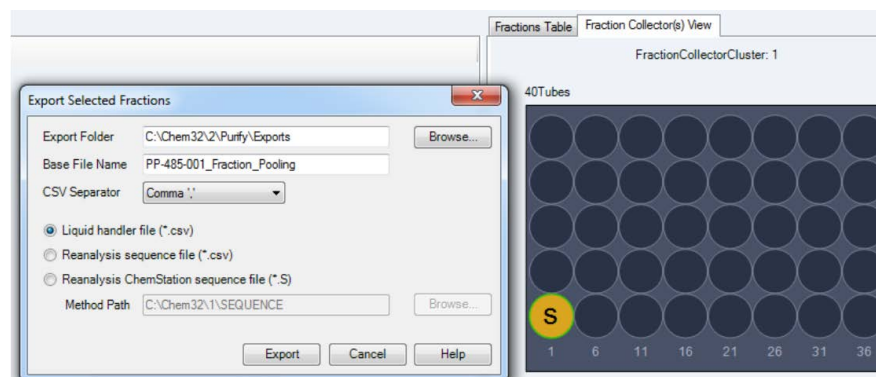


图 8. 输出所选馏分（标记 S）进行馏分收集和馏分重新分析

纯度测定

纯化完成后，利用 1260 Infinity 二元 LC/MS 系统对收集的馏分进行重新分析。在本纯化示例中，54 mg 纯目标产物所对应的粗制混合物经纯化之后，纯目标化合物的回收率达 88%（图 9）。

结论

附加的安捷伦自动纯化软件与安捷伦 OpenLAB CDS ChemStation 版联合用于 LC 和 LC/MS 系统分析，可提供自动化的解决方案以实现更高通量。

利用自动实时生成的梯度，根据预期产物的目标质量数或分子式自动识别目标峰从而提高色谱选择性。因此，优化的纯化方法可缩短运行时间，并减少了 40% 的溶剂消耗量。

此外，借助自动纯化软件的简单制备模式，不再需要进行制备方法开发，使得该纯化系统可面向具有不同色谱经验的非专业用户。

本技术概览展示了如何使用 Agilent 1260 Infinity 制备型 LC/MS 纯化系统纯化 54 mg 目标化合物，所得回收率为 88%，纯度 100%。

参考文献

1. Penduff, P., Analytical to Preparative HPLC Method Transfer: An easy way to scale up from to preparative using focused gradients (HPLC 方法从分析型向制备型转移：利用聚焦梯度从 UHPLC 放大至制备 HPLC 的简单途径)，安捷伦科技技术概览，出版号 5991-2013EN，2013

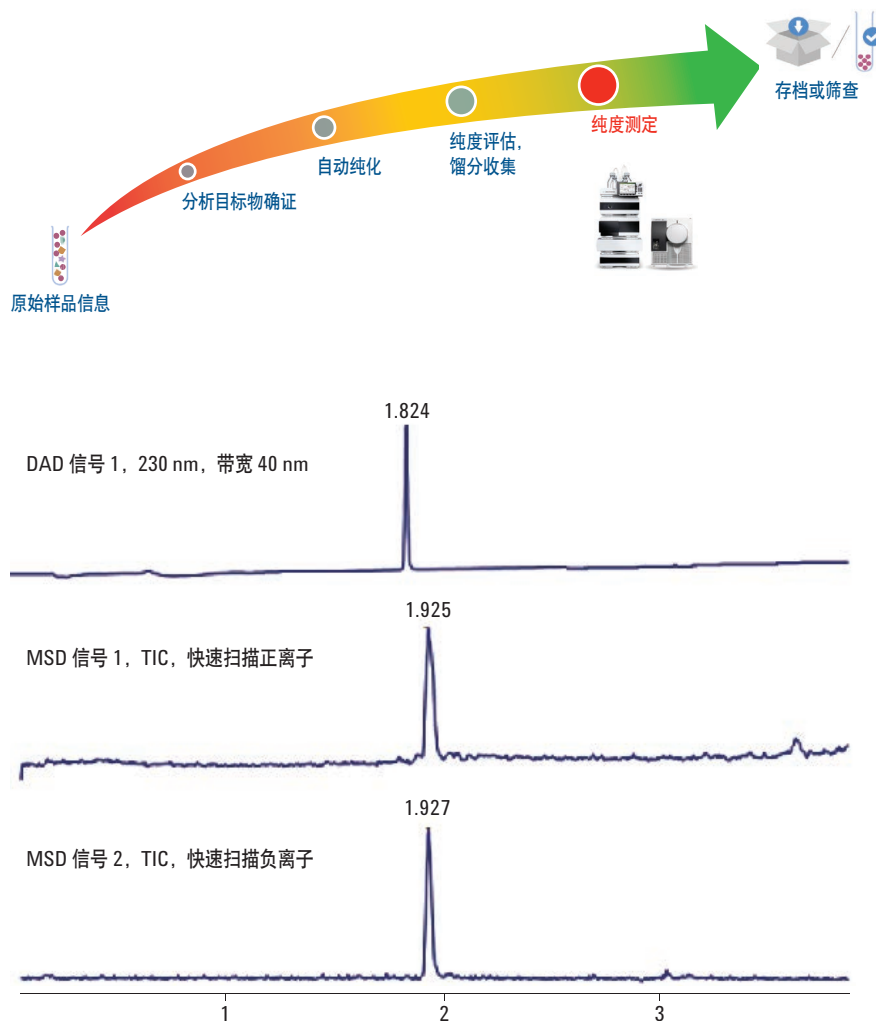


图 9. 采用 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 对收集的馏分进行数据分析

www.agilent.com/chem/cn

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，2014
2014年3月1日，中国印刷
5991-4115CHCN

