

制备型液相色谱纯化策略

作者

Ron Guilliet、Sami Chanaa
和 Lakshmi Subbarao
安捷伦科技公司
Wilmington, DE

前言

制备型液相色谱 (LC) 是一种强大技术，用于对混合物中一种或多种目标化合物进行分离或纯化。现在已经逐渐成为药物发现和研发实验室的主要纯化模式，用于反应净化、天然产物纯化和杂质分离，以及其它用途。多数情况下，制备型液相色谱首先从分析级别的分离开始，确认样品中目标化合物的状况。一旦分离方法建立之后，需要根据纯度、回收率和制备通量等方法进行优化，然后再放大至制备级别。

在本篇白皮书中，安捷伦介绍了从分析级放大至制备型液相色谱的关键步骤概况。应用本文所述的色谱基础理论和数学公式，能够确保帮助您可预测地且无缝地过渡至半制备型纯化。

选择正确的分离模式和固定相

色谱工作人员面临的第一个任务就是选择合适的色谱或分离模式。这取决于目标溶质的化学和物理特性。常用色谱模式的说明如表 1 所示。

优化分离：流动相

流动相的选择取决于：

- 优化分离的选择性
- 溶剂纯度（低浓度的非挥发性污染物会增大基线噪音）
- 检测类型（紫外透光度，MS 兼容性）

- 挥发性（可以轻松地从分离馏分中去除）
- 粘度（高粘度会引起高反压）
- 组分的溶解性（样品在流动相中的溶解度）
- 成本

表 1. 常用的色谱模式

反相	正相	离子交换	体积排阻	手性
大部分有机化合物	脂类 例如油、脂肪和脂质	离子，例如酸、碱、多肽、蛋白质和核酸	聚合物，包括蛋白质和核酸	对映异构体
含有甲醇或乙醇和添加剂的水性混合物	有机溶剂	水相缓冲液，离子化溶液	水相缓冲液，有机溶剂	水相或有机溶剂

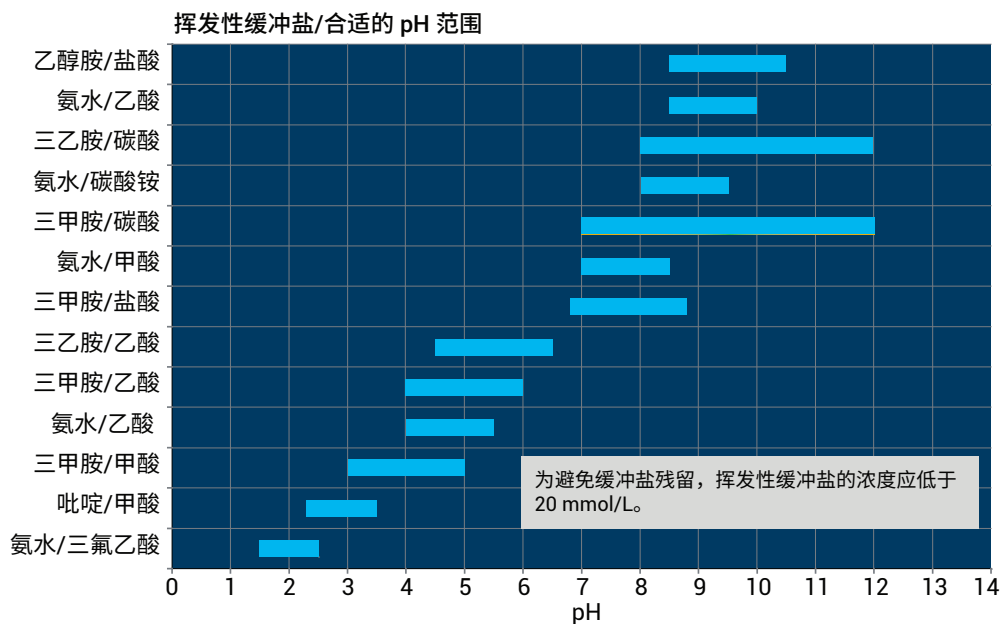


图 1. HPLC 中常用的挥发性缓冲盐

优化通量：样品量和过载类型

在使用制备型液相色谱时，使色谱柱过载以增大通量是常见做法。过载会导致峰从高斯分布变为更偏向三角形的形状。然而，不合理的过载使用会引起与杂质共洗脱或分析物从溶液中沉淀出来。上样量研究可以用于确定合适的样品量。在分析柱上进行这些研究可以节省宝贵的样品，同时最大程度降低溶剂的消耗浪费。

有两种色谱柱过载方式：

- **浓度（质量）过载：**我们将几个浓度递增的样品溶液以相同进样体积进样至色谱柱，从而确定允许的进样最大浓度。应该采用不会引起分裂峰（样品沉淀的标志）或共洗脱的最高浓度
- **体积过载：**如果样品溶解度很低，推荐采用体积过载的方法。将相同样品以递增的体积进样。应该采用不会引起共洗脱的最大体积

也可以将两种方法结合。从操作的角度上来说，无论通过蒸发还是冻干，浓度过载时从收集到的馏分中需要除去的溶剂量更少，一般比体积过载更适用。

这些从分析级色谱分离研究的结果，可以用于确定制备级可能的载样量。

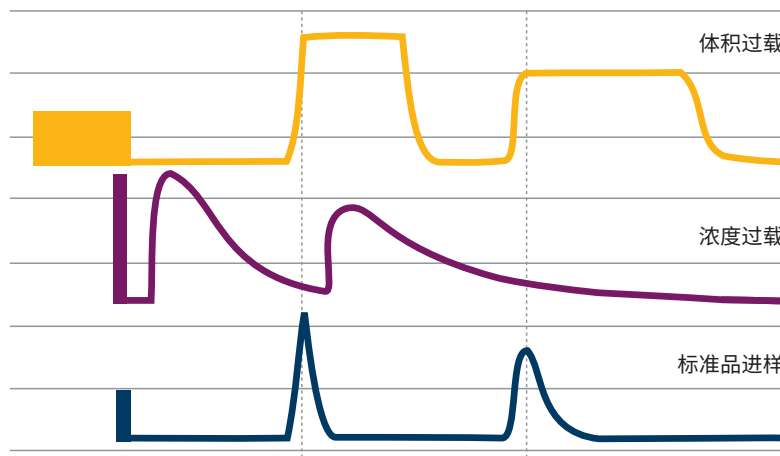


图 2. 体积过载和浓度过载的峰形

方法放大

纯度、回收率和通量是评价制备型运行结果的三个重要参数。由于这些参数是相互关联的，所以优化制备型方法时无法同时兼顾三个参数。最重要的优化参数取决于应用。

如图 3 所示，色谱图 1 显示出制备型 HPLC 运行高通量的能力，但是两个化合物的分离较差。也许可以获得每个化合物中一些高纯的馏分，但其回收率即产率会相当低。色谱图 2 的峰完全分离，能够使两化合物具有高纯度和高回收率，但是通量较低。色谱图 3 以综合三个参数后的优化制备型 HPLC 运行。

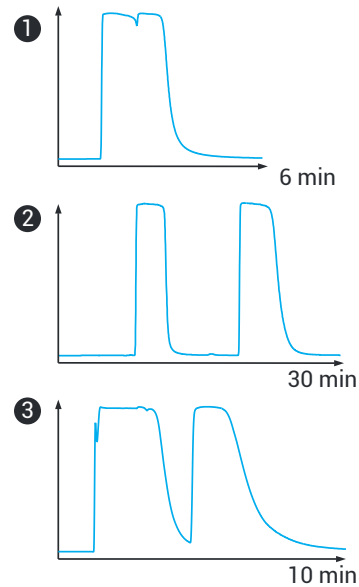
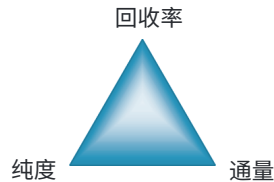


图 3. 制备型 HPLC 的目标

简单快速地实现从分析型到制备型的线性放大，依赖于分析柱和制备柱都填充了相同类型的固定相和同样尺寸的颗粒。可以通过以下三个步骤实现：

1. **改善分析条件：**确定正确的分析筛选条件，例如 pH、流动相和固定相，并且优化分离度
2. **最大程度提高上样量：**确定分析柱的上样量时，增加进样量直至达到分离度限值

3. **计算并应用线性放大公式：**从小内径色谱柱（分析型）转为大内径色谱柱（制备型）时，必须放大流速和进样体积这两个参数。所有其它参数（例如填料粒径、固定相和流动相）必须保持不变

$$f_{p,P} = f_{a,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

此处：

$f_{a,A}$ = 分析型色谱柱流速
 d_p = 制备型色谱柱内径
 d_A = 分析型色谱柱内径

公式 1. 放大到制备型流速

我们可以利用公式 1 和公式 2 计算流速和进样体积这两个线性放大因素。

在正确应用这些放大因素的基础上进样，能够确保可预测且无缝地过渡至半制备型纯化。

$$V_{inj,P} = V_{inj,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

此处：

$V_{inj,A}$ = 分析柱进样体积
 d_p = 制备型色谱柱内径
 d_A = 分析型色谱柱内径

公式 2. 放大到制备型进样体积

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018
2018 年 5 月 1 日，中国出版
5991-9229ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

 **Agilent**
Trusted Answers