

制备色谱系统应用文集



前言

制备色谱是一种用于从混合物中分离目标化合物的技术，是很多研究领域和生产过程必不可少的分离和纯化手段。与传统的纯化方法（如蒸馏、萃取、重结晶等）比较，制备色谱是一种更有效的分离方法，因此被广泛应用在样品和产品的提取和纯化上。

从功能与使用方向上来说，制备色谱是色谱系统一个重要的应用领域，以分离并纯化最终获得目标组分为目的，同利用色谱手段进行定性定量分析有显著的不同。随着色谱技术的发展，包括经典柱色谱法在内的用于制备分离的色谱手段还包括：制备薄层色谱、中低压制备色谱、高压制备色谱、高速逆流色谱、模拟移动床色谱、制备气相色谱、超临界流体色谱等。其中高压制备色谱，又称高效液相制备色谱，其伴随液相色谱技术发展和仪器更新，得到了更广泛的应用。相较于分析型高效液相色谱关注于分离效率和分离效果等因素外，制备型高效液相色谱同时需要考虑目标产物的产率和纯度的，因此合理的馏分收集方式和手段也是制备型高效液相色谱重要的单元组成和重要参数。

作为液相色谱尤其是制备液相色谱有益补充手段的超临界流体色谱（SFC），以超临界流体为流动相，具有类似于气体的低黏度，如液体的溶剂化能力，同时具有扩散系数大等特点，尤其是以无毒且易获得的二氧化碳作为主要流动相组成的超临界二氧化碳流体制备色谱，广泛的应用于手性化合物拆分领域，另外对于中等极性物质的分离，多数情况下需要添加少量改性剂如甲醇等，来增强流动相的洗脱能力。同时通过精细的系统压力控制，来控制 and 调节超临界流体的密度，进而影响洗脱能力来达到目标物的有效分离。馏分收集不同于制备液相色谱，气液分离装置的运用是超临界流体色谱实现高回收制备的一项关键因素。

岛津是全球知名的分析测试仪器、医疗器械及工业设备的制造厂商，自 1875 年创业以来始终坚持“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研满足社会需求的科学技术，开发生产具有高附加值的产品。并以实现“为了人类和地球的健康”这一愿望作为公司的经营思想，以光技术、X 射线技术、图像处理技术这三大核心为基础，不断革新，不断挑战，一如既往地科学技术发展做出贡献。特别是在 2002 年岛津制作所的田中耕一荣获诺贝尔化学奖，开创了岛津研究人员获奖的先河。

作为液相色谱主流供应商，岛津从 20 世纪 60 年代开始进行液相色谱研发，至今已经走过 50 多年。数十年的耕耘，让岛津液相色谱在分析仪器领域获得良好的市场占有率和客户口碑。不断通过技术革新和产品迭代，岛津液相色谱系统全面进入 LC-40 时代，在制备液相色谱方向，新设计的液体处理器 LH-40 和馏分收集器 FRC-40 让目标组分的收集更简单和高效。同时，在 2015 年岛津推出超临界流体萃取-色谱联用系统（Nexera UC）的基础上，2019 年推出了首款制备型超临界流体色谱，成为中低机型小分子化合物分离纯化尤其是手型化合物拆分领域有力武器，作为制备液相色谱的补充，丰富和完善了岛津制备色谱系统构成。

为服务广大制备色谱尤其是制备液相色谱和制备型超临界流体色谱用于学习和了解岛津相关仪器的操作及应用，特整理近期岛津相关制备色谱类应用报告，从制备方法开发到制备液相色谱和超临界色谱应用，以及制备色谱中的二维技术和特殊进样方式等应用案例，编辑成册。本文集仅供有关人员学习交流使用，不用于任何商业用途。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心

目 录

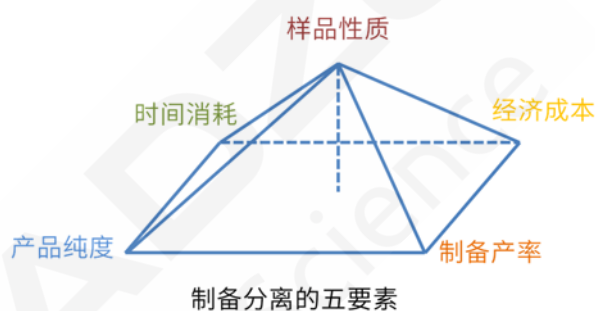
第 1 章 制备色谱概要	1
第 2 章 岛津制备色谱系统	4
第 3 章 制备色谱系统应用文集	8
3.1 从分析方法开发到制备分离	9
中药车前子中有效成分的液相分析到制备纯化	10
Nexera Prep—完整高效的分析制备双流路系统	15
蛋白质从纯化到评估的无缝化流程	18
3.2 常规半制备或制备色谱的应用	21
LC-20AP 制备液相色谱在合成异构体分离中的应用	22
LC-20AP 制备液相色谱进行药物稳定性考察的应用	25
LC-20AP 制备液相色谱对原料药中相关杂质的制备分离	27
LC-16P 同时分离纯化大豆提取物中三种大豆异黄酮	29
LC-16P 分离纯化绿茶提取物粗品中的茶氨酸	34
LC-16P 用于全合成中间体 2,4,5-三氯嘧啶类化合物的纯化	39
3.3 复杂组分或低含量组分纯化	43
质谱引导型制备液相色谱在新药研发中的应用	44
质谱引导型制备液相用于药物杂质的鉴定及分离	47
PDA-ELSD 触发的制备液相系统对草药全组分制备收集	52
循环制备模式的应用于羟苯丙酯异构体分离	56
3.4 绿色环保新概念-超临界流体制备色谱的应用	59
Nexera UC Prep 应用于合成原料药的分析和制备	60
重叠进样功能在手性化合物拆分与纯化中的应用	65
重叠进样和峰纯度检测功能在旋光异构化合物分离中的应用	70
药品成分的高效纯化方式	75
有机发光二极管材料的制备纯化	79
3.5 制备分离的特色技术	84
ASAPrep-药物研发过程中新合成化合物纯化工作流程的优化	85
Prominence UFPLC 用于布洛芬及其有关物质的分离纯化	88
具有自动切换稀释进样功能的高通量制备液相色谱	92
附录 1 使用 LH-40 液体处理器优化制备流程	96
附录 2 液体处理器 LH-40 基本操作	99
附录 3 馏分收集器 FRC-10A 基本操作	105

第 1 章 制备色谱概要

制备色谱是一种用于从混合物中分离目标化合物的技术。该技术利用色谱的优异分离性能纯化目标化合物。当今，随着有机合成、新药研发、天然产物研究、生化等领域对高纯度组份的需求不断增加，制备型色谱仪应用的领域也在迅速的扩大发展。目前，实验室级别的制备色谱主要用于：有机合成目标物的分离纯化，中药及天然药物中活性成分的分离纯化、化学药物杂质的制备、手性化合物的拆分、蛋白质纯化等领域。

制备色谱主要类型，依据分离原理一般分为制备薄层色谱、经典柱色谱、低压及中压制备色谱、高压制备色谱、高速逆流色谱、模拟移动床色谱、超临界流体色谱等。随着技术的发展和产品的革新，自动化程度越来越高的收到用户更多的选择。

与分析型色谱系统使用目的不同，使用制备色谱主要是为了通过色谱分离的手段获取一定纯度和质量的目标化合物。围绕这一目标开展的制备分离或者制备纯化工作，往往需要考虑产品纯度、制备产率、经济成本、时间消耗几个方面的影响和制约，这几个因素又同待分离的样品性质有很大关系。样品性质，一般认为包括样品组成、相态、浓度、溶解程度、pH 等理化性质以及样品价值等需要考虑的因素。产品纯度是实验设计时需要考虑的关键因素，虽然说纯度越高越好，但是综合考虑产量、成本、时间等因素，能达到后续使用的需要即是最佳方案。一般情况下，天然产物能达到 70%就可进行初步鉴定；多步化学反应中，一些中间产物的纯度在 80%左右即可满足后续投料要求；核磁及红外测试的样品纯度需求相对较高，需达到 95%；如果是用于定性和定量分析的标准品或对照品，则最好纯度能在 99%以上。制备产率受到产品性质的影响，进一步反映在所选择的制备纯化手段、方法和设备上，最终通过实际分离效果体现。耗材成本中流动相和色谱柱是除仪器投入外较大的经济支出项目，而这两者中流动相的消耗和使用往往会被初次使用或接触者所忽视，而想通过降低流速和“节省”流动相的方式是不可取的，既延长了分离时间又损失了柱效而影响纯度和产率。分离方法的开发和优化、目标产物量、所选仪器通量等因素又对时间消耗产生直接影响。所以对于制备色谱的选型及后续方法的开发，需充分考虑各种实际因素的相互影响和制约，各因素平衡性的考虑显得较为重要。



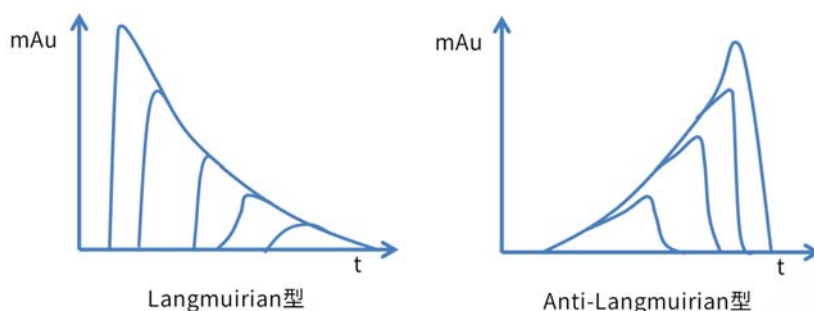
色谱法研究的基本点为混合物的有效分离。依据色谱法分离度公式，柱效、容量因子和分离因子都是分析效果的影响因素。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

由于制备色谱进样量大，使得样品在流动相中的浓度于样品在固定性中的浓度比例不再呈正比例关系，体现非线性色谱的特点，故分离因子，柱效和容量因子没有上述的等式关系，但是这几个参数依然是指导色谱峰条件优化、改善分离效果的努力方向。

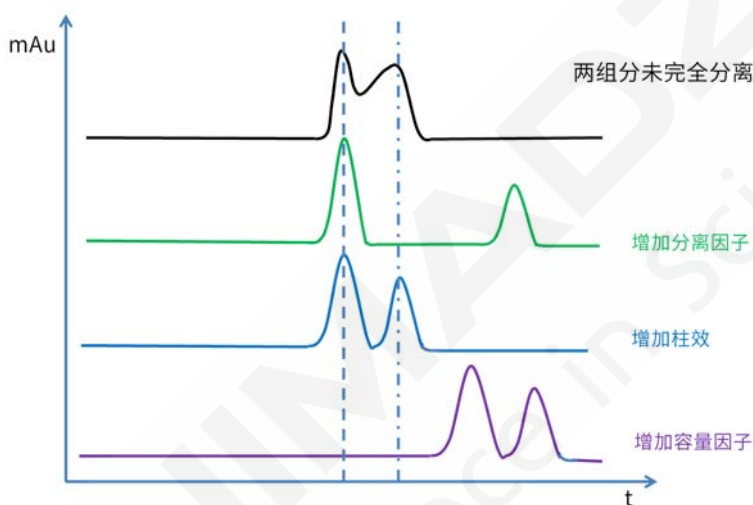
对于非线性色谱，其色谱行为特点主要表现为：1) 色谱峰流出峰形不对称；2) 色谱峰的保留时间会随样品量的大小而发生变化；3) 色谱峰的高度和样品量的大小不呈正比例关系。综合表现为色谱峰“拖尾”或“伸舌”，使得色谱峰谱带变宽，色谱柱效降低。以上在制备色谱中经常出现的现象对于方法开发的准确把握和改善方向具有指导性，虽然高柱效对于分离效果的提升至关重要，但如果忽视此类现象而一味追求

对称的色谱峰型和高分离度，则会造成经济成本和时间消耗的增加，增大了费效比。



两种制备色谱峰型随进样量增大变化而产生的峰形改变

那对于制备色谱而言，分离效果的提升，需要从哪些点考虑呢？实际上如前所述，通过增加分离因子、增加柱效和增加容量因子，是目的相同而手段不同的考虑方向。



改变不同因素对分离效果的影响

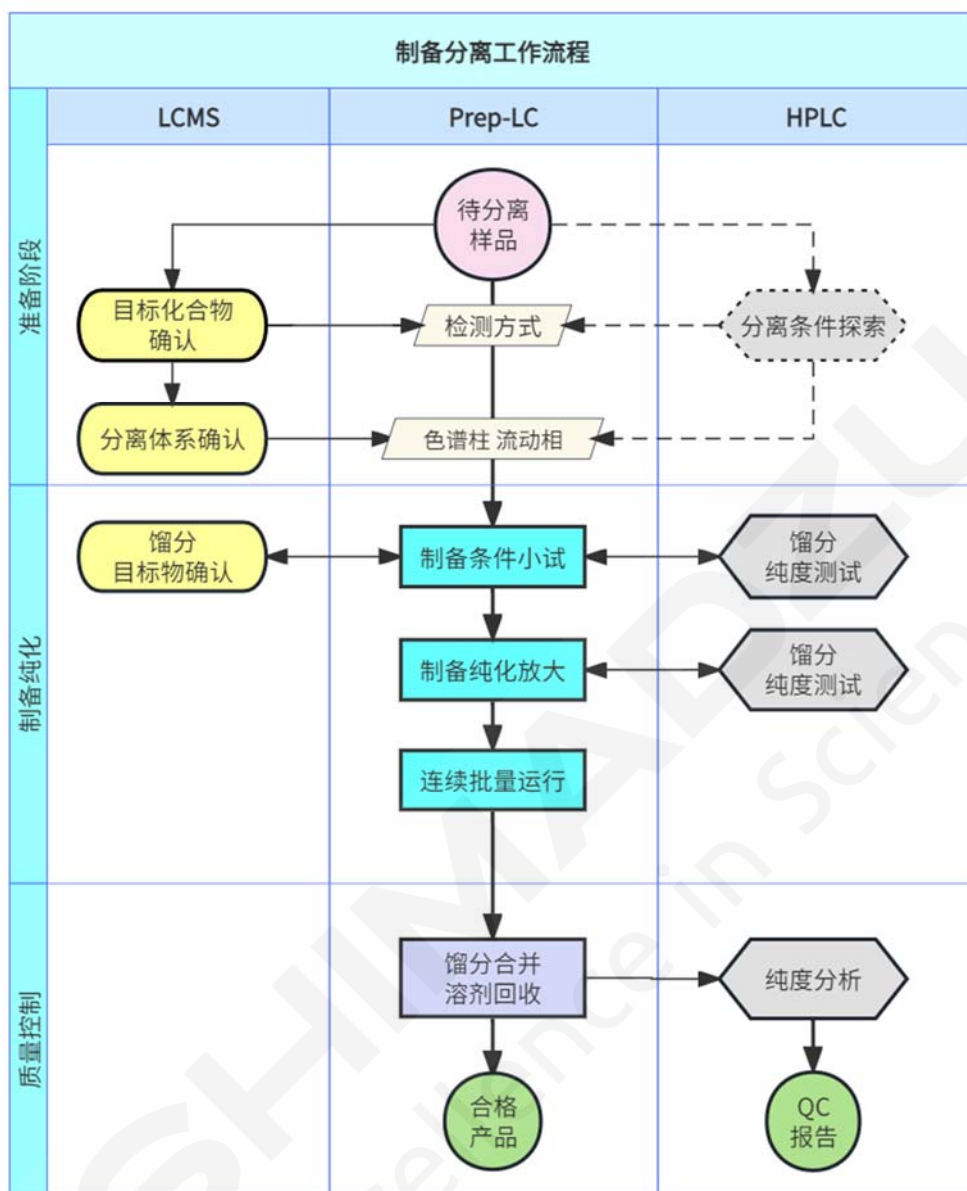
从理论效果来看，分离改善的方向主要考虑：

1. 分离因子在分离效果改善中最重要。一般来说，在样品性质不变的前提下，分离因子取决于色谱固定相和流动相的性质。具体化则表现为对于某个样品分析效果不佳时，通过更换色谱柱或者流动相可能给带来较大的效果改变。例如反相制备液相色谱分离纯化中，同样是 C18 反相色谱柱，由于其键合方式、封端类型等不同造成分离选择性的差异；对于流动相而言，有机相种类、水相 pH 值、盐浓度等不同也能造成选择性显著差异。

2. 让色谱柱发挥合适的柱效。非线性色谱条件下，当色谱柱严重过载时，色谱柱的柱效将会类似指数下降，直到无分离能力。探索合适的上样量是制备色谱方法开发中的重要步骤，通过多次尝试在合适柱效和分离效率中找到平衡点，便于批量化制备纯化的开展。柱效受到样品本身理化性质影响，同时固定性、流动相和色谱柱本身情况均会体现到柱效的优劣。

3. 容量因子的作用有限。容量因子的增加以时间和大量的溶剂消耗为代价，除非是价值很高的物质的制备，否则不建议采用增加容量因子的办法。容量因子一般控制在 1-5 可获得良好的效果，容量因子 $k > 10$ 时对分离贡献不大，但分析时间将大大延长。减小死体积和降低流动相洗脱力可以提高容量因子。

根据前面提到的几点影响因素可以看到，制备色谱的分离纯化方法开发，不会也不能是一蹴而就，高效和经济的分离制备工作离不开必要的硬件构成、合理的方法探索以及准确稳定的运行。



制备分离 workflow 中的“三个机种”和“三个过程”

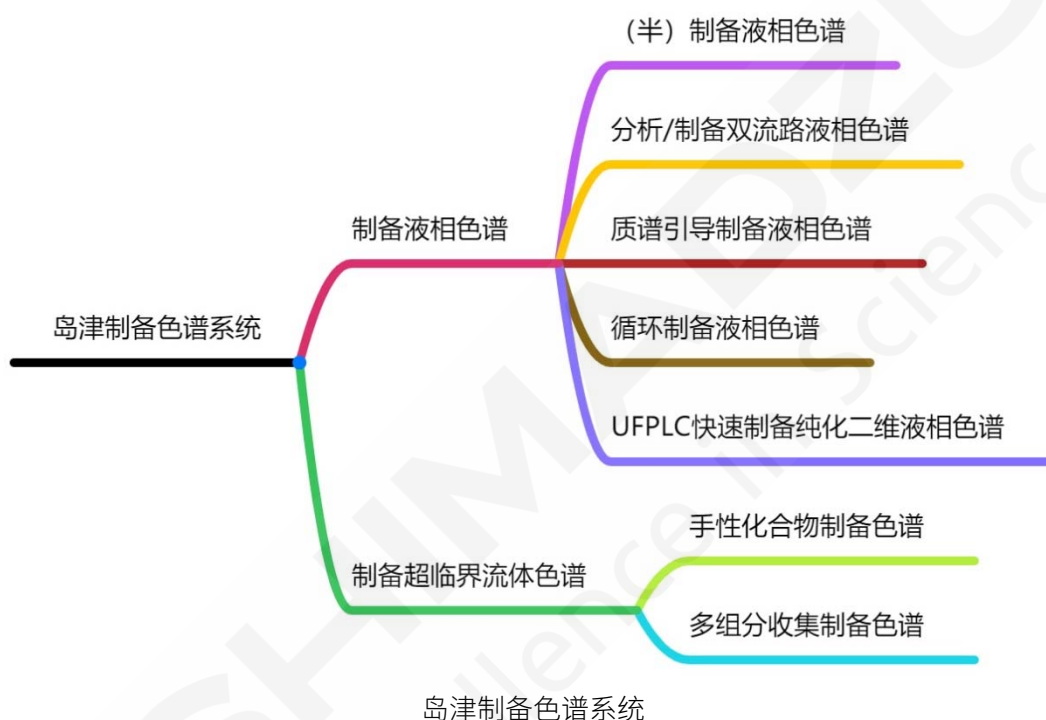
上图展示了 CRO 行业常用的一种制备纯化工作流程，以待分离样品的“准备-实施-检查”步骤和对应仪器设备配置为例，简单介绍获得一个合格产品的制备纯化过程。可以看到除了主要负责制备纯化的制备液相色谱外，LCMS 和 HPLC 在整个工作流程中也是必不可少的组成单元，为制备方法的开发和目标馏分的准确度和质控提供重要保证。同时，多款仪器的协同工作对操作的便利性、规范化、系统化、数据的完整性都有一定的要求，完整的硬件方案可为实验室制备分离工作的开展提供重要保障。

【参考文献】

袁黎明. 制备色谱技术及应用[M]. 北京：化学工业出版社，2012

第 2 章 岛津制备色谱系统

岛津研究开发液相色谱仪已超过 50 年的历史，是目前全球最大的液相色谱及相关产品的专业生产厂家之一，包括常规高效液相色谱、一体机液相、超高效液相色谱和多种制备液相色谱系统等，其中制备液相系列具有覆盖范围广、智能、灵活、高通量等显著优势，在中国国内拥有大量的用户。同时伴随技术的革新和产品拓展，岛津在 2015 年推出超临界流体色谱（SFC）之后，又于 2019 年发布了制备型超临界流体色谱（Prep-SFC），丰富了制备色谱产品线，可为客户在反相色谱、正相色谱和超临界流体色谱方面提供完整的系统化制备色谱体系。



制备液相色谱

制备型液相色谱是一种用于从混合物中分离目标化合物的技术。该技术利用高效液相色谱（HPLC）的优异分离性能纯化目标化合物。输液泵的最大流速决定着系统可以配套使用的色谱柱规格，进而影响单次上样量和分离效率；进样器的最大进样量决定了单次分析的上样能力；馏分收集单元直接影响了制备分离的效果和效率，同时该单元还决定了连续运行时的处理通量。检测器是目标峰识别的馏分收集信号产生的来源，常规使用紫外可见检测器（Uv-vis），对于一些由于化合物结构而无或弱紫外吸收的化合物，可以考虑示差折光检测器（RID）、蒸发光散射检测器（ELSD）以及质谱检测器（MS）。Nexera Prep 是岛津新型制备液相色谱系列，包含多种硬件选择以满足不同使用需求的应用场景。

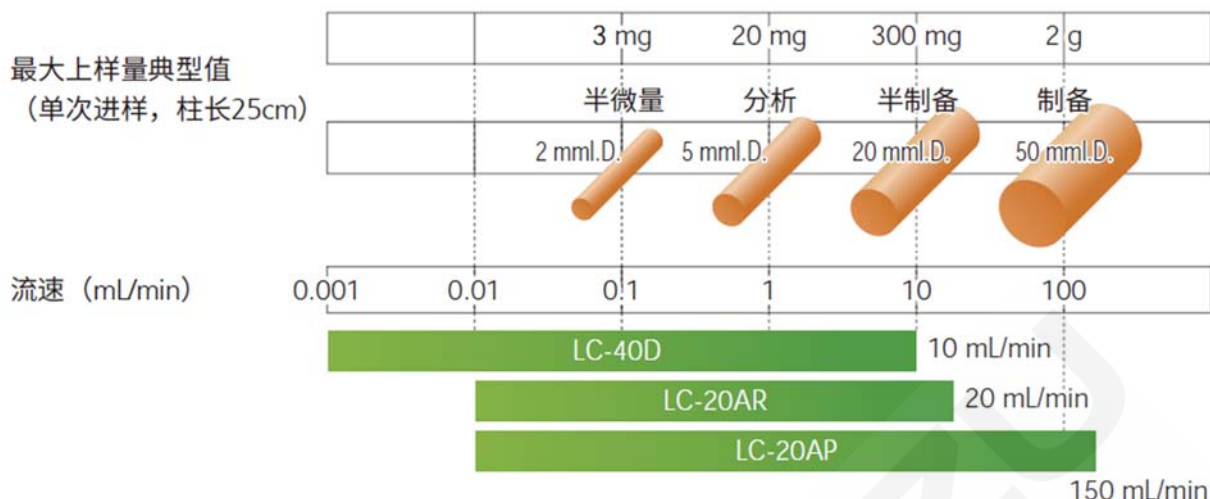


表 Nexera Prep 系统可供选择的主要单元及性能特点

单元	型号	特点
输液泵	LC-40D	最高流速 10 mL/min, 满足日常分析到半制备所需的流量输送需要。
	LC-16P	最高流速 25 mL/min, 满足日常分析到半制备所需的流量输送需要; 可以加装循环阀组件实现循环半制备。
	LC-20AR	满足最高流速 20 mL/min 半制备需要; 可以加装循环阀组件实现循环半制备。
	LC-20AP	最高流速 150 mL/min, 满足半制备到制备规模需要; 可配置 FCV-200AL 实现低压梯度洗脱。
进样器	SIL-16P	单次最大进样 5 mL; 具有多种预处理功能
	SIL-10AP	单次最大进样 5 mL;
	LH-40	进样和馏分收集集成于一个单元; 单次最大进样 20 mL; 兼容多种不同深度进样容器; 最大可 6 个 LH-40 联用提高处理能力。
检测器	SPD-40/M40	制备色谱常用检测器, 配备专用流通池
	RID-20A	用于无紫外吸收物质的检测
	ELSD-LT III	用于无紫外吸收物质的检测
	LCMS-2020/2050	提供 TIC、MIC、MC 信号输出用于目标物监测和信号触发
收集器	FRC-10A	最大允许流速 150 mL/min; 18 mm O.D.收集管最大容量 64 pcs;
	FRC-40	最大允许流速 150 mL/min; 18 mm O.D.收集管最大容量 216 pcs; 最大可 6 台 FRC-40 同时接入使用; 可选多种收集容器
	LH-40	进样和馏分收集集成于一个单元; 最多可连接 5 台 FRC-40 联合使用

进样器还可以根据需要选择 Rheodyne 3725/7725 系列

当选择两种检测器联用, 尤其是并联使用 ELSD 或者 MS 时, 需要根据制备色谱流速选择合适的分流阀, 有可选比例的主动式分流阀和固定比例的被

动式分流阀两种三个型号供选择使用。



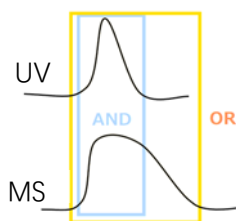
Nexera Prep 制备液相色谱



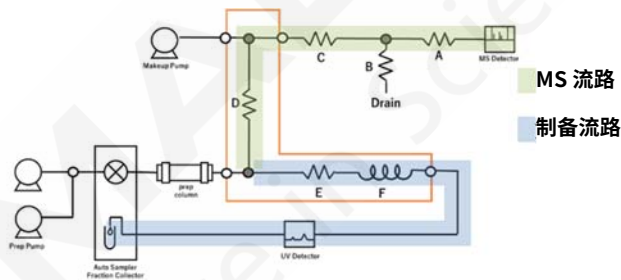
质谱引导制备液相色谱

质谱引导制备液相色谱

对于 UV 信号弱或者含量少的高价值目标物，可以采用质谱信号作为收集触发信号进行制备色谱的分离和收集过程。这里需要说明的是，使用了质谱进行监测，一般情况下能够达到相较于紫外信号更加灵敏的收集效果，进而在回收率上有更好的体现，然而是否能够实现目标物与杂质的分离，还是由色谱柱-流动相这一分离体系其关键作用。Nexera Prep 系统提供化合物的 MS 信号和 UV 信号，可以根据色谱峰的分离和重叠情况，进行单一信号触发或逻辑关系信号触发。



采用逻辑关系 (AND/OR) 触发收集效果图

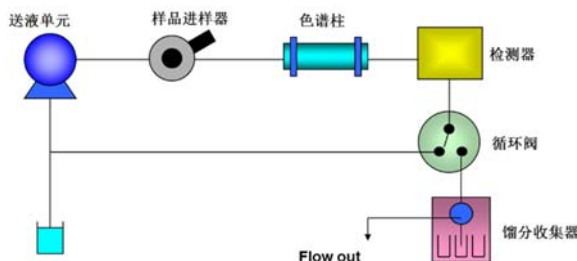


质谱引导制备液相色谱流路示意图

循环制备色谱系统

制备 HPLC 可实现其他分离无法比拟的高速分离，尤其要提高峰的分离度时，可使用“循环制备”法。循环制备是把分离的样品送回到泵的入口侧，再次注入同一个色谱柱并且能够循环多次分离以提高分离效果的一种手法。在立体异构体、非对映异构体，高分子化合物等物质的分离纯化中有较多应用。针对此类物质，常规分离方式常常只能对此类化合物达到部分分离，使用更长的色谱柱或串联多支色谱柱可以在一定程度上改善分离度，但此策略又受制于较高反压的限制。

循环制备 HPLC 工作在等度模式下，把握合适和循环开始和结束时间，以及适当的循环次数对制备纯化成功至关重要。可选配 Recycle-Assist 操作软件轻松解决这个问题，为循环半制备系统的初学者提供简单可靠的做循环制备的操作环境。



循环制备系统及其流路示意图

高通量制备色谱系统

通过组合化合方式，在一次实验中可以获得大量具有相同母核而不同官能团的化合物，这样大批量的分子多样性群体，即为化合物库（compound library）。由于具有相同的主体结构，一般情况下一个化合物库中的化合物往往具有相似的色谱保留行为，这对分离纯化来讲是个提高工作效率的好机会。使用高通量的进样器和馏分收集器，基于稳定的色谱系统即可高效完成无人值守的批量运行。



高通量制备色谱系统

超临界流体制备色谱系统

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)尤其是以超临界 CO₂ 为主要流动相的分析分离体系，因具有分析速度快、立体选择性好、分离效率高、溶剂消耗少，并且具有环境友好、廉价易得、馏分后处理简单等特点，在包括手性药物在内的光学异构体分析和拆分中具有重要作用。同分析型 SFC 相比，制备型 SFC 不仅是所有色谱组件进行了相应的放大，最主要的区别在于分离规模和目的的不同，表现在固定相、时间和原料的最大化利用。当需要多次进样来处理某个样品时，常常使用重叠进样方式来实现，利用 SFC 等度分离过程中，完成前一次运行之前注入第二次样品溶液的方法使生产量和生产率最大化。



Nexera UC 手性筛选系统和 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

第 3 章 制备色谱系统应用文集

岛津制备色谱系统包括制备液相色谱系统和超临界流体制备色谱系统，涵盖了从有机合成产物纯化、天然产物分离、手性化合物拆分、生物大分子分离等主要应用方向和行业应用领域。

由于制备色谱是一种用于从混合物中分离目标化合物的技术，不同于分析型色谱通过分离色谱峰的效果而注重于定性和定量的准确定，前者对非线性色谱范畴内的色谱柱选择、对应流速设置，已经对应的进样量非线性放大，多重收集方式运用等为着重考虑要素。基于此，为服务广大制备色谱尤其是制备液相色谱和制备型超临界流体色谱用于学习和了解岛津相关仪器的操作及应用，特整理近期岛津相关制备色谱类应用报告，从制备方法开发到制备液相色谱和超临界色谱应用，以及制备色谱中的二维技术和特殊进样方式等应用案例，编辑成册，汇编为本部《制备色谱系统应用文集》。

本文集涵盖制备液相色谱和制备超临界流体色谱两种主要机型，共分为五个章节详细介绍了制备色谱常见的应用方式和主要应用领域的操作与使用案例。其中，第一章介绍了从分析方法开发到制备分离方法建立，分别通过三个应用案例从中药、合成化合物和蛋白质的分析到制备方法开发，说明了液相分析与制备的不同之处和关联之处，帮助用户建立制备色谱分离纯化的思路。第二章主要介绍应用场景和应用面最多的半制备/制备液相色谱的应用，介绍两款岛津在售主流产品 LC-20AP 和 LC-16P 系统在不同领域的应用案例。第三章为复杂组分或低含量组分的纯化，属于制备色谱应用中操作难度较高的一种场景，此时多考虑使用相较于常规制备液相色谱更高端的设备，如增加通用型检测器-蒸发光散射检测器 (ELSD) 或者质谱 (MS)，借助并联接入系统的第二检测器的特殊功能，实现原本弱紫外吸收或微量含量物质的纯化与收集。第四章介绍的超临界流体制备色谱 (Prep-SFC)，Prep-SFC 技术主要应用场景为手性化合物的拆分，其中重叠进样功能的实现，可以极大程度的提高工作效率和降低使用成本。另外，针对中小极性多组分化合物的分离纯化，岛津超临界流体制备色谱 (UC Prep) 系统同时提供了一种多组分收集 (Multi-fraction) 类型可以满足此类应用的需要。第五章介绍了岛津在制备色谱领域的新技术和新方法，如通过自动化的 ASAPrep 系统完成从分析方法转移到制备方法的评价，最终确定合理制备方案；由于使用二维色谱手段，实现目标组分分离-捕集-纯化-收集过程，去除制备色谱流动相中添加剂对产物的不利影响等案例。

本部分共计收录 20 篇应用文章，来源于岛津分析中心应用研究课题、与合作客户共同研究成果及岛津全球应用开发中心应用案例，立足实际应用，展示相关产品功能和参数，以飨读者。

3.1 从分析方法开发到制备分离

常规的工作流程看，使用高效液相制备色谱对化合物进行成功的分离，一般要经过色谱分析方案探索、分离制备小试、规模放大测试和连续批量运行等过程。通常在制备分离小试及规模放大的过程中还需要进行目标馏分的质控，确保从分析到制备过程方法转移有效，整个过程可控。

基于色谱原理中色谱柱截面积同流动相线速度及进样量的关系，以及经济高效的需要，制备色谱在流动相消耗量及样品进样量上，和分析型色谱有数十倍、百倍和甚至更大的差距。在这种情况下，对于制备分离方法的开发，不能也不建议直接在制备色谱上进行，以免造成样品和流动相的大量无意义的消耗。采用与制备色谱同款或者填料性质相近的分析型色谱柱和对应流动相体系，进行分离方案开发则很有必要。因此，从分析方法开发到制备条件确定过程，需要考虑的环节包含，色谱柱和流动相体系的选择，目标峰与周边杂质分离效果，收集方式与收集参数，重复制备的次数，溶剂回收的手段等。

反相色谱由于良好的分离效果和相对稳定的分离状态，加之丰富的填料来源而广受高效液相色谱分析-分离相关工作者的青睐，其中又以十八烷基硅烷键合相作为填料的 C18 色谱柱应用更为广泛，配合水相-甲醇（或乙腈）为主的有机相溶剂体系，可以完成大多数化合物分离的需要。在制备色谱使用中，考虑到后续溶剂回收和产物利用，往往使用挥发性酸、碱或者盐作为流动相添加剂用以改善分离效果，0.1%体积比的甲酸或三氟醋酸是常用的酸性添加剂，其中三氟醋酸由于具有较强酸性和离子对试剂特性，使得其在 HPLC 分离过程中对改善峰形和调节保留具有良好的效果而使用广泛，但是考虑到溶剂回收时的三氟醋酸的残留情况，在方法开发阶段的流动相选择需纳入考虑。不同于分析型 HPLC 专注与良好分离度和稳定的保留行为，制备色谱在分离度满足需求的情况下，更多考虑单次进样所能承载的上样量，经济高效的做法是让色谱工作在过载情况下。此时，色谱峰由于体积过载或者质量过载往往呈现不同的变形，色谱峰面积与进样量也呈非线性方式变化，所以方法开发过程中对于进样量的放大尝试是个相对重要的过程，确定最大进样量后连续多次重复运行，或者采用重叠进样模式，可连续、稳定实现大规模样品的分离纯化。馏分收集单元是制备色谱的特殊配置，现代新型馏分收集装置具有良好的自动化特点和多样化的收集模式，同时也有可以集进样和收集一体集约化工作站，也可以多台收集单元串联来提升收集通量的组合，在很大程度上提高了工作效率，另外质谱、ELSD 等通用型检测器的并联接入，让由于结构差异带来检测信号差异的化合物也能获得良好分离与收集，丰富了制备色谱的手段。溶剂回收在过去往往独立与制备纯化过程而单独操作，随着自动化程度提高和绿色化学理念的深入，如何通过仪器完成添加剂的去除、低耗能溶剂回收、甚至减少有机溶剂使用等课题——获得攻破，借助二维色谱的分离-捕集-纯化-收集的过程，以及超临界流体色谱的方式已经能够实现。

本节中，以中药材分析-分离制备方法开发，双流路系统制备纯化和蛋白样品分离纯化为例，初步介绍岛津制备色谱产品的基本使用场景。

中药车前子中有效成分的液相分析到制备纯化

摘要：本文以色谱分析-分离制备中药车前子的有效成分为例，详细探讨了LH-40的功能与特点。实验采用反相液相色谱，使用C18色谱柱与0.3%乙酸水溶液-甲醇条件，以紫外信号触发馏分收集，结果显示样品重现性好、回收率高，实现了中药车前子的快速分析和制备纯化的目的，LH-40可用于中药等复杂样品中有效成分的准确制备。

关键词：LH-40 中药车前子 制备分离

制备液相色谱系统主要是对产品的单体进行提取和纯化，即分离、收集一种或多种色谱纯物质。随着合成、生化和制药等领域对高纯度组份的需求不断增加，制备型液相色谱仪应用的领域也在迅速的扩大发展。

LH-40 液体处理器 (Liquid Handler) 同时兼具“自动进样器”和“馏分收集器”两种功能,作为馏分收集器,其与 FRC-40 相同,具操作简单,使用灵

活,空间节约以及高通量等特点;作为“自动进样器”,其进样体积最大可达 20 mL,可复测已接收馏分的纯度,也可通过液面探测技术自动判断样品瓶中液面高度避免空针进样。

本文利用岛津液相色谱系统结合新型液体处理器 LH-40 建立了针对中药车前子的快速分析和制备纯化的方法,以提升分析和制备效率。

实验部分

仪器

本实验采用岛津高效液相色谱仪,具体配置为:

输 液 泵 : LC-40D XR (含 LPGE)
柱 温 箱 : CTO-40C
自动进样器 : SIL-40C XR、LH-40

系 统 控 制 器 : SIL-40
检 测 器 : SPD-40V/SPD-M20A
液 体 处 理 器 : LH-40

- > 收集器 + 自动进样器
- > 自动设置峰判定条件
- > 自动生成制备参数
- > 自动计算延迟时间
- > 完善的交叉污染抑制功能
- > “样品拯救功能”
- > 支持液面检测功能



图 1. LH-40 及其主要特点

1.1 分析方法转换为制备方法

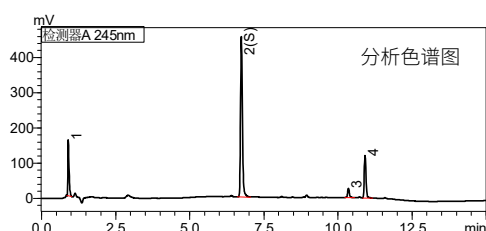
制备分离前先做样品分析,供试品溶液参照《YBZ-PFKL-2021024》国家药品标准制备,减压浓缩超纯水复溶后,经0.22 μm滤膜过滤,LC进样分析。

中药样品 LC 分析条件

仪 器 : Nexera LC-40D XR 四元低压梯度系统

表 2. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0	Pump	B.Conc	5
4.6	Pump	B.Conc	5
18.6	Pump	B.Conc	60
22.2	Pump	B.Conc	5
35	Controller	Stop	



$$* \text{制备柱上柱量} = \text{分析柱上柱量} \times \left(\frac{d2}{d1}\right)^2 \times \frac{L2}{L1}$$

$$\text{制备柱流量} = \text{分析柱流量} \times \left(\frac{d2}{d1}\right)^2$$

d1: 分析柱内径; d2: 制备柱内径;

L1: 分析柱柱长; L2: 制备柱柱长

分析方法转化为制备方法

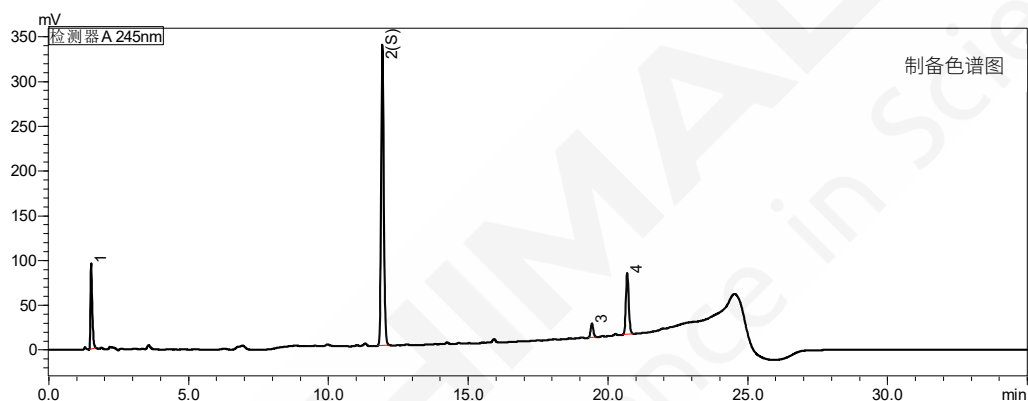


图 3. 车前子中有效成分的色谱图

[峰 2 (S): 京尼平苷酸; 峰 3: 毛蕊花糖苷; 峰 4: 异毛蕊花糖苷]

2. 结果与讨论

2.1 进样体积考察

将供试品溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后进入制备液质系统, 使用 LH-40 作为自动进样器, 进样量分别为 10 μL 、30 μL 、100 μL 和 400 μL , 考察进样体积对分离的影响。分析结果显示随着进样体积的增大, 极性大出峰早的化合物保留时间明显后移, 因此在方法放大实验时要特别关注进样体积放大倍数对化合物保留时间的影响; 以 S 峰为例, 随着进样体积的增大, 理论塔板数、拖尾因子、分离度均减小, 但各峰峰形良好, 且分离度均大于 1.5, 可满足制备液相系统的分离要求。为加快分离的时间、提高制备的效率、满足规模制备纯化要求, 因此选择进样量为 400 μL 时进行馏分收集。

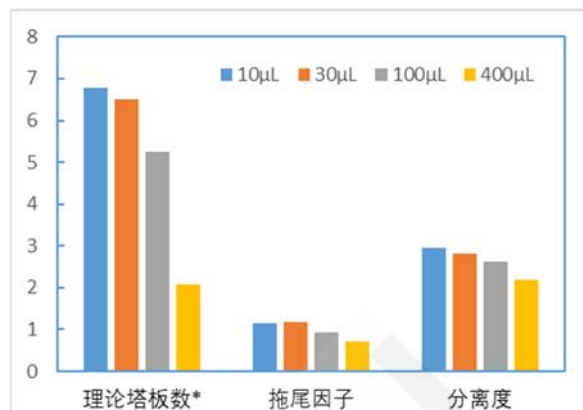
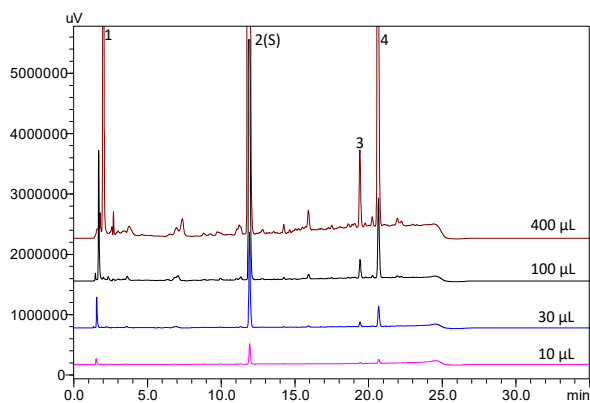


图 4. 不同进样体积对色谱分离的影响
(为便于结果对比和展示, 右图中*理论塔板数=实测理论塔板数/10000)

2.2 重复性考察

实现确定条件下的稳定重复进样-分离-收集过程, 对制备分离的成功具有重要意义, 尤其对于连续批处理型工作方式来说, 是实现无人值守自动化运行的重要保障。LH-40 具有液面检测功能, 能够智能检测液面高度并跳过剩余样品量不足的样品瓶。此外, LH-40 可在检测到样品瓶内样品量不足后停止吸液, 可有效避免样品瓶内样品量较少时, 可能会出现吸样不足, 导致峰面积下降、重现性不佳的问题。



类型	信息
信息	开始批处理分析。
警告	停止数据采集。
错误	液面检测进样针未检测到液面。将跳过分析。
信息	结束批处理分析。

图 5. LH-40 液面检测功能

供试品溶液连续进样 5 次, 进样量 400 μL, 用于考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 3 所示。结果显示, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.021~0.232%和 0.054~0.385%之间, 仪器精密度良好。

表 3. 重复性测试 (n=6)

#	峰 1		峰 2 (S)		峰 3		峰 4	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	1.963	30559935	11.979	69580382	19.407	8771564	20.688	40997212
2	1.954	30672457	11.988	69756086	19.410	8777789	20.696	40988672
3	1.954	30412423	11.979	69739231	19.405	8767105	20.688	41024686
4	1.963	30416215	11.971	70007466	19.400	8767098	20.679	40953935
5	1.963	30487989	11.979	69913159	19.408	8767014	20.688	41340424
AVG	1.959	30509804	11.979	69799265	19.406	8770114	20.688	41060986
RSD/%	0.232	0.358	0.049	0.237	0.021	0.054	0.028	0.385

2.3 制备样品的纯度分析

将分离后的馏分再进样进行纯度检测, 采用面积归一化法对结果进行定量分析, 其中收集馏分 1、馏分 2、馏分 3、馏分 4 的纯度均大于 99%。

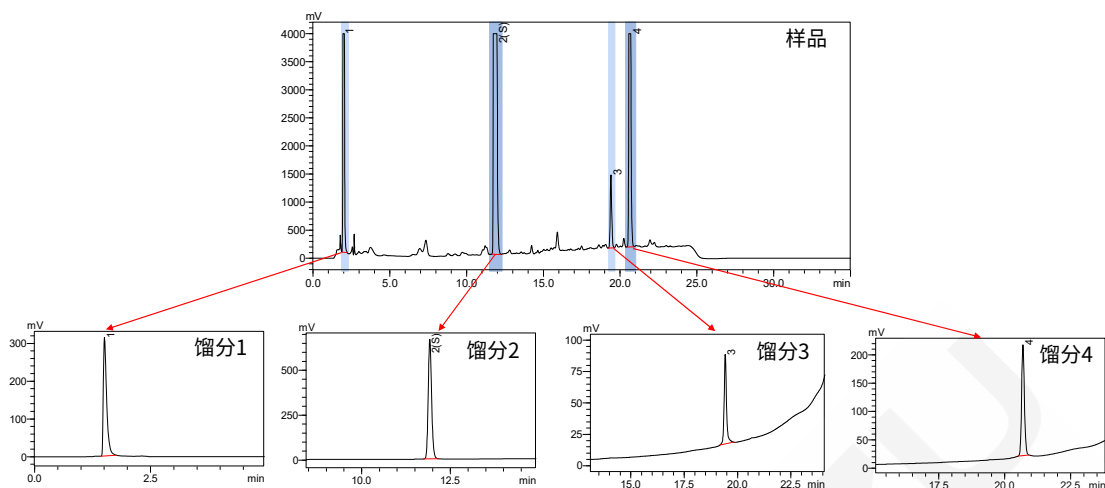


图 6. 各馏分色谱图

2.4 制备样品回收率考察

针对 S 峰进行制备回收率考察，结果如下表 5 所示，制备回收率为 97.56%，且纯度合格，满足要求。

表 5. S 峰回收率

名称	面积	回收率
Initial	5149979	N/A
Fraction	5024354	97.56%

注：回收率=Fraction 面积/Initial 面积 * 100%

Initial: 取供试品溶液 400 μ L 定容至 1mL，进样 30 μ L

Fraction: 色谱峰 2 馏分定容至 1mL，进样 30 μ L

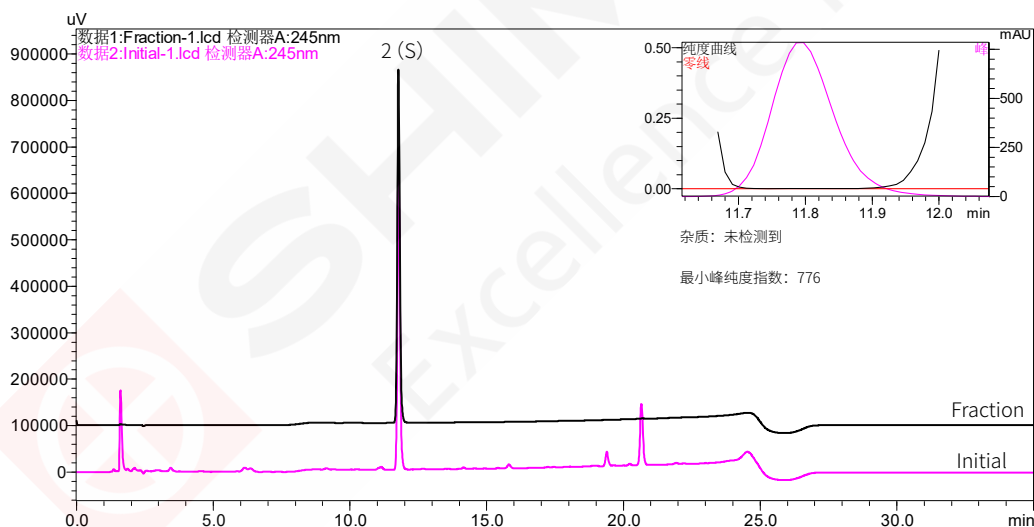


图 7. S 峰制备回收率色谱图

3. 结论

本文介绍了岛津新型液体处理器 LH-40 的主要功能和应用方式，并以中药车前子为例，介绍了从 HPLC 分析方法到制备方法转化的思路及一般性操作。重复性实验结果显示，色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD% 在 0.021~0.232%和 0.054~0.385%之间，重复性良好。以紫外信号作为触发信号进行馏分收集，LH-40 对中药车前子的制备回收率为 97.56%，且纯度合格。LH-40 满足中药车前子制备纯化的目的，在此类物质的分离纯化领域有广阔应用前景。

Nexera Prep——完整高效的分析制备双流路系统

制备液相色谱是一种将混合物分离纯化为目标化合物而广泛使用的技术手段。在鉴定馏分中目标化合物并确定馏分的纯度时往往需要花费大量时间，因此实现这些过程的自动化将有助于缩短纯化工作所需的时间消耗。本文将介绍一种 Nexera Prep 系列的系统配置，该系统可使用质谱触发进行简单制备，并使用分析/制备切换系统完成纯度确认的高通量分析。

1. 分析/制备 LC-MS 系统概述

该系统使用的液体处理器（LH-40）具有制备、分析双流路，可将收集的馏分进行无缝复测。本实验所用的制备液质系统的流路如下图所示。左图所示为作为制备液质工作时的流路图。在该流路中，由 LH-40 进样的样品通过制备柱分离，其中一部分被导入到 LCMS™-2020 中。当 LCMS-2020 鉴别出目标化合物的色谱峰后，安装在 LH-40 喷嘴前端的电磁阀打开，目标化合物被收集到馏分收集器中。

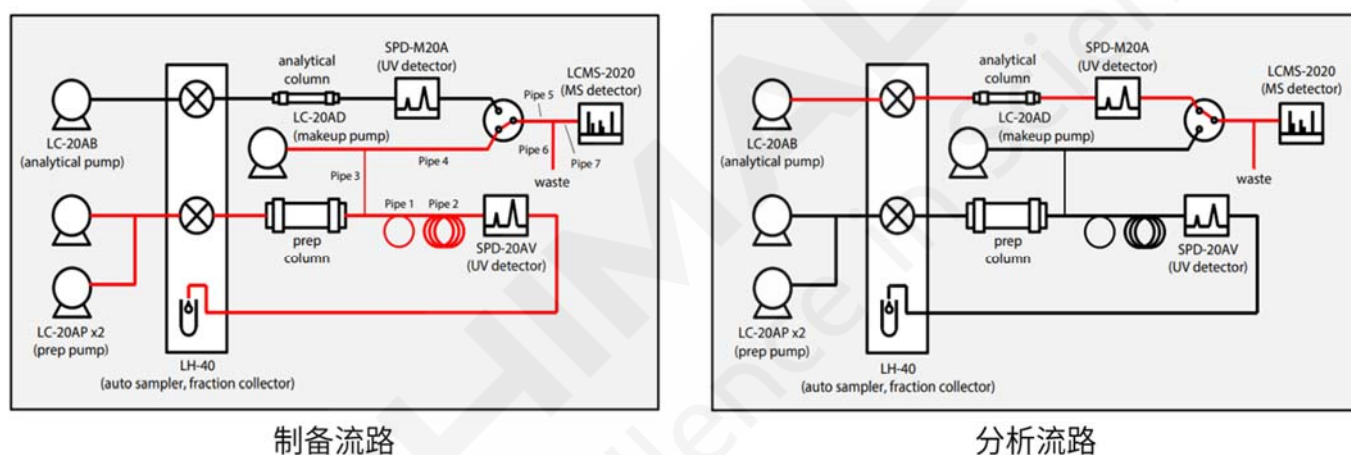


图 1 分析制备色谱系统流路示意图

右图是作为分析液质工作时的流路图。LH-40 具有将通过制备液质收集的馏分重新进样至分析流路的功能。在该系统中，使用岛津 LC-20AB 型输液泵，此种型号输液泵一个模块中内置两个输液泵，用于分析液质系统的梯度洗脱。另外，通过在分析流路的下游安装高压流路切换阀，使在制备液质流路中使用的 LCMS-2020 也可在分析液质流路中使用。

表 1 质谱导向制备色谱流路中分流管路信息

管路编号	Pipe 1	Pipe 2	Pipe 3	Pipe 4	Pipe 5	Pipe 6	Pipe 7
材 质	PEEK	PTFE	PEEK	PEEK	PEEK	PEEK	PEEK
内径 (mm)	0.25	1.00	0.025	0.25	0.13	0.13	0.13
长度 (mm)	150	6000	40	1000	900	60	480

该系统兼具的制备和分析功能可以通过岛津工作站 LabSolutions™进行控制。在批表分析中制备液质和分析液质的切换、目标化合物的制备以及纯度的确认均可通过一套系统自动完成，实现从制备到再分析的高效工作效率。

2. 制备型 LCMS 用于药物的分离纯化

将药品酮洛芬和吲哚美辛的混合标准品作为模型化合物，使用制备液质系统进行了纯化。表 2 所示为制备条件。制备色谱柱使用 Shim-pack Scepter™ C18，粒径 5 μm。质谱采用高速的正负离子切换扫描（m/z 范围 50-1000）进行检测。根据源于目标化合物的离子种类 XIC（提取离子色谱图）进行触发质谱分馏制备。XIC 可以通过设定目标化合物的分子量进行自动绘制。通过制备液质得到的色谱图如图 3 所示。紫外检测器和质谱均成功检测并收集了两种馏分 A、B。

表 2 制备纯化条件（制备型 LCMS 流路）

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18 (75 mm L. × 30 mm I.D., 5 μm)

流动相 A : 1% (wt/v) 甲酸水溶液

流 动 相 B : 1% (wt/v) 甲酸乙腈溶液

流 速 : 40 mL/min

补 偿 流 速 : 1.5 mL/min (甲醇)

时间程序 : B 浓度 10%(0 min)-90%(6-8 min)

柱 温 : 室温

进 样 量 : 1000 μL (每成分 10 mg/mL 浓度)

检 测 器 : UV 250 nm (制备池)
MS(+/-, 扫描范围 50-1000)

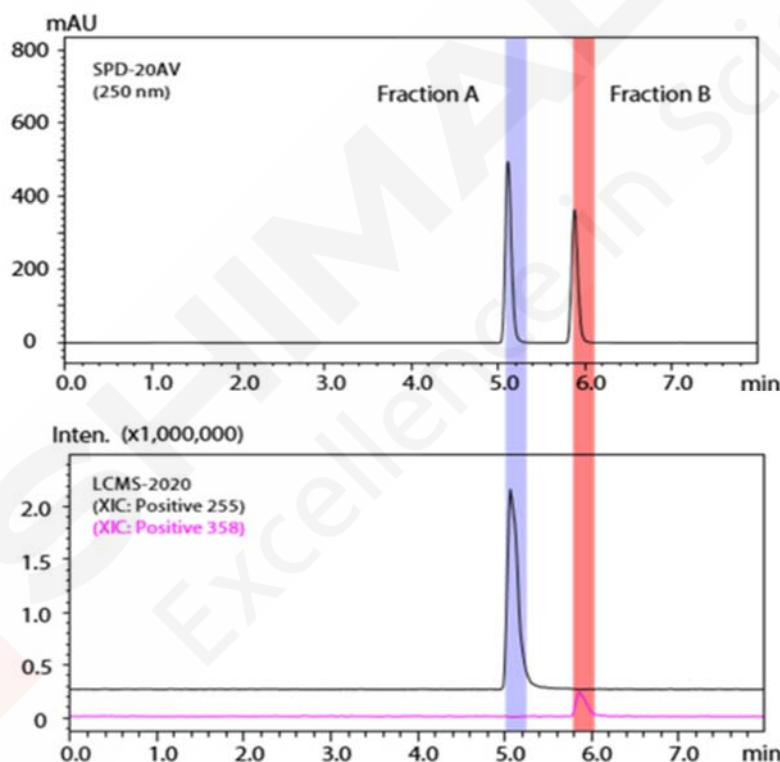


图 3 两种药品的制备色谱图

(上段：紫外检测器所得色谱图、下段：质谱所得色谱图)

3. 分析型 LCMS 用于馏分纯度的确认

通过本系统的分析流路（图 2）对所得到的馏分 A、B 进行分析，并进行纯度确认试验。表 3 为分析条件。在制备液相中，一次制备可得到多个馏分，对这些馏分进行纯度确认时，需要进行高通量分析。实验中，为分析色谱柱使用 Shim-pack Scepter C18，粒径 3 μm，以达到在高通量分析中获得较好分离和良好峰形的目的。

所得酮洛芬和吲哚美辛的的色谱图，如图 4、图 5 所示。酮洛芬和吲哚美辛峰面积归一化（紫外色谱图）条件下，两者纯度均在 99%以上（表 4），分析时间均在 3 分钟以内。

表 3 分析条件（分析型 LCMS 流路）

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter C18 (50 mm L. × 4.6 mm I.D., 3 μm)
 流 动 相 A : 1% (wt/v) 甲酸水溶液 流 动 相 B : 1% (wt/v) 甲酸乙腈溶液
 流 速 : 2.5 mL/min 柱 温 : 室温
 时间程序 : B 浓度 10%(0 min)-90%(2-3 min) 进 样 量 : 1 μL
 检 测 器 UV 250 nm (制备池)
 MS (+/-, 扫描范围 50-1000)

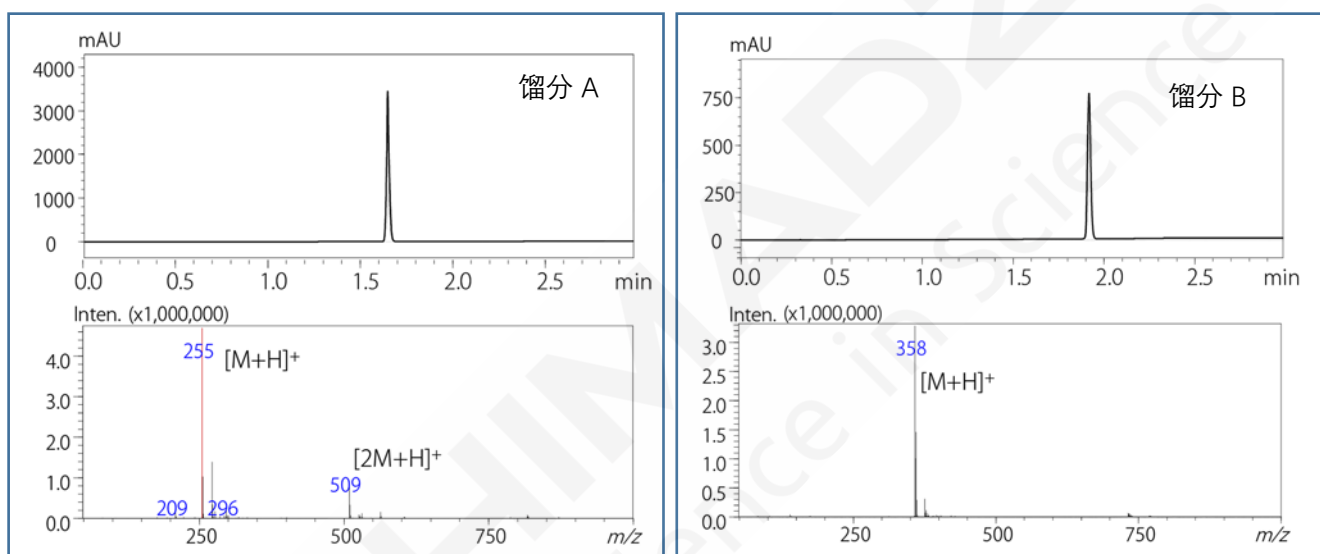


图 4 馏分复测所得色谱图与质谱图

(馏分 A: 酮洛芬; 馏分 B: 吲哚美辛)

表 4 馏分中所含目标化合物的纯度（面积百分比，检测波长 250 nm）

#	化合物	Area %
馏分A	酮洛芬*	99.8
馏分B	吲哚美辛	99.9

*因峰强度在饱和值附近，故面积百分比为参考值。

4. 总结

本文介绍了使用液体处理器 LH-40 实现制备液质和分析液质进行切换的分析装置及其应用示例。通过 LH-40 的再进样功能，实现一系列的批量分析内完成从使用制备液质进行的目标化合物纯化到确认馏分纯度，以及获取质谱图的过程，显著提高传统制备液相的工作效率。

蛋白质从纯化到评估的无缝化流程

尺寸排阻色谱法 (SEC) 是确认蛋白质的分子量及其分布的分析方法之一。在 SEC 中, 体积较小的分子进入色谱柱填充剂的细孔内而绕远流出, 而体积较大的分子则不会进入细孔内, 直接流过, 因此, 会按照分子体积从大到小的顺序洗脱出来。因而即使蛋白质不同, 而溶剂化体积大小相同的分子的洗脱体积相同, 即在同一色谱条件下的保留时间相同。分析血液或细胞培养上清液中的目标蛋白质时, 需在 SEC 分析之前进行蛋白质的纯化。本文介绍了纯化目标蛋白质后, 通过 SEC 分获得组分的分离, 再用液体处理器进行无缝收集馏分的方法。

1. 通过液体处理器实现无缝化

液体处理器 LH-40 是将自动进样器及馏分收集器一体化设计的装置。不需要将之前制备的馏分从馏分收集器转移至自动进样器进行二次作业, 可作为下次的分析样品, 直接重新进样。仅需将图 1 的流路组合, 指定方法和馏分。通过 SEC 分离蛋白质, 借助 LH-40 即可收集馏分。本文加入 Prominence™ 惰性 LC 系统, 分析了血浆中的 IgG。

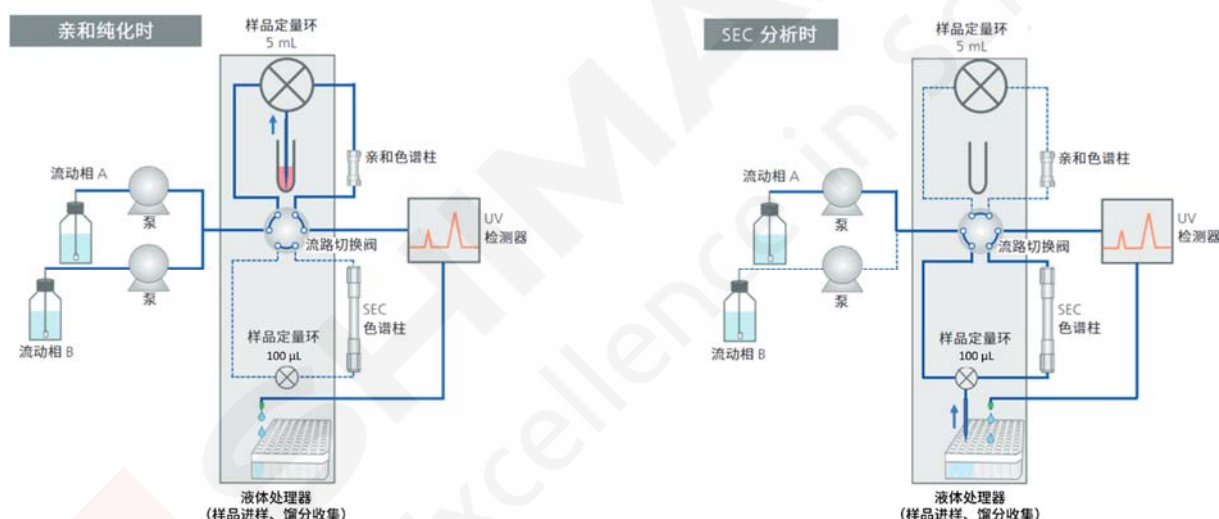


图 1. 亲和纯化和尺寸排阻分析时的流路图

2. 样品分析条件

准备 5 mL 使用流动相 A 稀释至 5 倍的市售正常人体血浆 EDTA-2Na, 装入 15 mL 试管内, 放置在液体处理器的架子上。按照表 1 条件, 使用 IgG 纯化专用色谱柱对其进行亲和纯化, 处理完放置在液体处理器上 (96 孔板)。按照表 2 条件, 对在此条件下的色谱峰顶部分的馏分 (100 µL) 进行 SEC 分析。

表1 亲和色谱柱分析条件

色 谱 柱	: HiTrap™ rProtein A FF (1 mL, Cytiva公司制造)
流 动 相 A	: 10 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液pH 6.9
流 动 相 B	: 100 mmol/L (钠) 柠檬酸盐缓冲液pH 4.0

时间程序 : 0%B (0 - 10 min) → 100%B (10.01 - 20 min) → 0%B (20.01 - 35 min)
流速 : 1.0 mL/min
柱温 : 15 °C
进样量 : 5 mL
检测 : SPD-20A (280 nm)
流通池 : 惰性流通池

表2 SEC分析条件

色谱柱 : Shim-Pack™ Bio Diol-300*1 (300 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
保护柱 : Shim-Pack Bio Diol-300 (G)*2 (30 mm × 8.0 mm I.D., 5 μm)
流动相 A : 10 mmol/L (钠) 磷酸盐缓冲液pH 6.9
流速 : 0.5 mL/min
柱温 : 15 °C
进样量 : 100 μL
检测 : SPD-20A (280 nm)
流通池 : 惰性流通池

*1: P/N 227-31010-04, *2: P/N 227-31010-06

3. 亲和纯化的结果

通过流动相 A 平衡 IgG 纯化专用色谱柱后, 装入 5 mL 稀释后的人体血浆样品, 吸附至色谱柱。之后由流动相 A 清洗出非特异性吸附的组分 (图 3)。然后由流动相 B 洗脱出 IgG (图 4)。

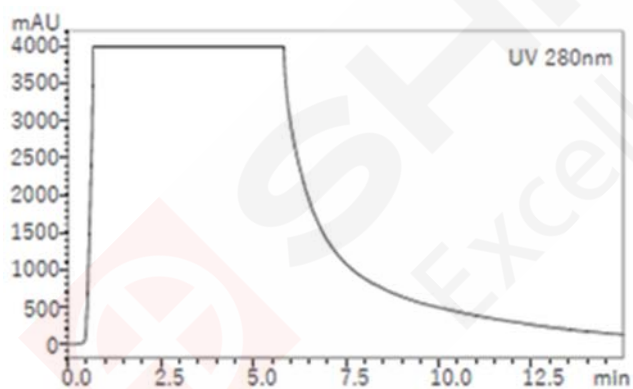


图 3. 亲和纯化时的结合色谱图

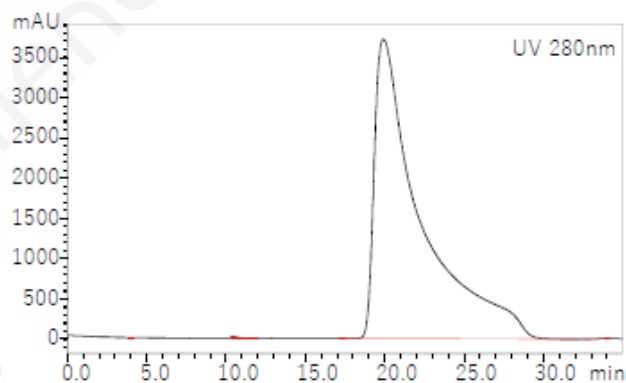


图 4. 亲和纯化时的洗脱色谱图

4. SEC 分析的结果

取在第 1 阶段亲和纯化中溶出的峰顶部分溶液重新进样 100 μL ，进行第 2 阶段的 SEC 分析。SEC 分析中，在主要谱峰（峰 2）之前获得了前伸色谱峰（峰 1，图 5）。根据在 SEC 同一条件分析的标准品甲状腺球蛋白（669 kDa）、醛缩酶（158kDa）、卵白蛋白（44 kDa）的混合液和、铁蛋白（440kDa）与伴白蛋白（75 kDa）混合液，可计算目标蛋白质分子量（图 6）。根据这些蛋白质标准溶液的溶出时间，可知由人体血浆纯化的 IgG 几乎均形成了单量体。

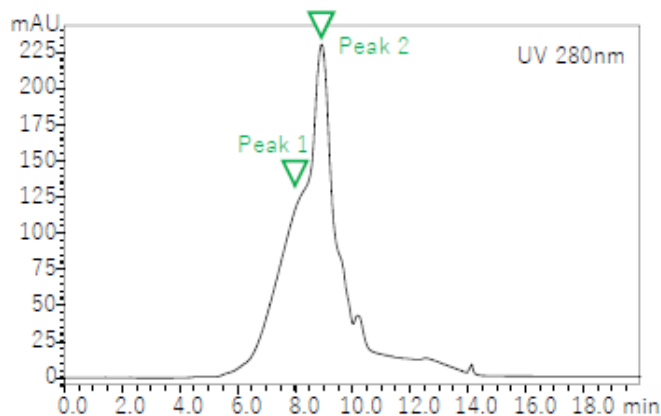


图 5. SEC 分析的色谱图

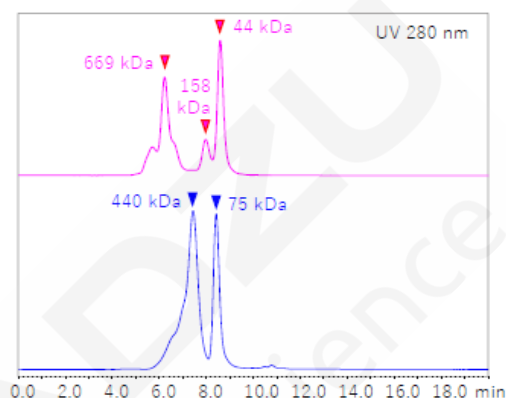


图 6. SEC 分析蛋白质标准品的色谱图

5. SDS-PAGE 分析结果

亲和纯化及 SEC 分析中，将所有馏分分取至 96 孔板中。针对这些所得的谱峰，将相应孔内的样品用于 SDS-PAGE（非还原/还原）分析。无论是根据亲和纯化所得的谱峰，还是 SEC 分析的峰 1 及峰 2，均在与人体 IgG 标准品相同的位置检测出条带（图 7）。SEC 分析中所得峰 1 和峰 2 均为 IgG，血中存在结构类似的 4 个 IgG 馏分，因此根据这些细小的体积或结构差异可推测出其为扩大的谱峰。

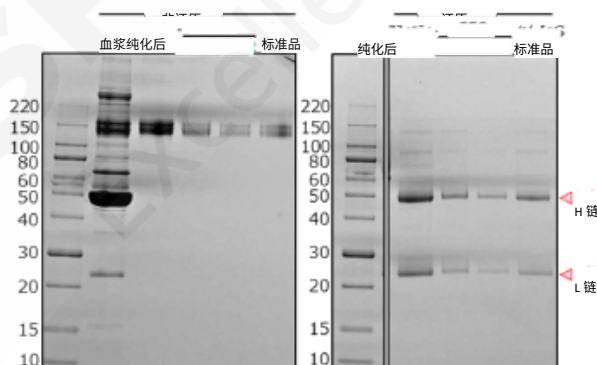


图 7. SDS-PAGE 分析结果

6. 结论

通过在 LC 系统中加入液体处理器，建立了一种仅需放入样品溶液，即可完成纯化、及无缝对已分取馏分进行重新分析的体系。对已确定目标物的常规样品的分析，也可重新分析所需馏分。并且通过追加色谱柱切换阀，增加色谱柱，可进行多阶段纯化。此外，通过使用 96 孔板，还可在 SDS-PAGE 和 ELISA 等后续各种分析中直接使用。

3.2 常规半制备或制备色谱的应用

从使用用途区分,可以将高效液相色谱分为分析型高效液相色谱和制备型高效液相色谱,前者主要用于目标物的分离的同时,往往伴随含量测定或纯度测试等环节,与定量有一定的关系,而后者是通过色谱手段,对目标物分离并且收集后达到纯化的手段,得到产物是其关注点,往往被称为制备液相色谱或者简称制备液相。

制备型高效液相色谱由制备规模可分为半制备型,制备型及工业级制备型。常规分析型液相色谱使用色谱柱内径为 4-8 mm,流速一般为 0.4-2 mL/min,单次载样量不超过 20 mg,对于制备型高效液相色谱而言,半制型色谱柱内径 10-30 mm,流速 10-40 mL/min,单次载样量最大可到 300 mg;制备型色谱柱内径在 50 mm 左右,流速 60-100 mL/min,单次载样量可达 1-2 g;工业级制备型色谱柱内径 1000 mm 左右,流速在 1 L 以上,单次载样量在 Kg 水平。

制备型高效液相色谱主要应用在植化、合成、制药、生物及生化等领域的产品的提取及纯化工作中。不同的工作领域中组份的制备和纯化量的差异较大。在生物技术领域中,酶的分离是微克级;在天然产物化学和合成化学领域中,为应对未知成份定性鉴别、结构测定、生物活性测试等需求,需要纯化获得若干毫克的高纯物;在药品和医药学测试中,需要克级的标准品和对照品;在工业级提纯中,目标产物工业化生产往往需要千克级的分离纯化。

制备色谱使用中,良好的分离是制备成功的必要条件,分离条件获得后,规模的放大和准确的收集,同样是制备成功不可或缺的因素。在常规使用的的馏分收集,依赖色谱峰和依赖时间是常见的两种模式,前者需要根据色谱峰的峰强度和(或)斜率来判断色谱峰收集的起终点,而后者只需要根据保留时间简单开启馏分收集阀便可以进行收集。针对色谱峰的特点和规模,可以选择不同的方式。另外,对于复杂组分的样品而言,多色谱峰或低分离度是常见现象,此时使用工作站软件中的时间程序,配合基础收集参数,可以实现组合收集的效果。

在半制备和制备规模,岛津有 LC-20AR、LC-20AP 和 LC-16P 等型号的仪器可供选择,流速范围最大可达 150 mL/min。本节介绍了使用半制备和制备型液相色谱在有机合成产物、药物降解产物及天然产物有效成分研究中的应用。

LC-20AP 制备液相色谱在合成异构体分离中的应用

摘要：本文建立了一种使用岛津 LC-20AP 制备液相色谱用于合成异构体分离的方法。该方法使用 Daicel Chiralcel OD-H 10 mmID×250 mmL 5 μm 色谱柱，以正己烷-异丙醇为流动相，紫外检测器 190 nm 波长检测，使用 FRC-10A 自动馏分收集器收集。拆分后的异构体以 HPLC 检测，纯度符合后续工作要求。

关键词：制备液相色谱 有机合成 手性异构体 分离纯化

手性化合物是一类特殊的化合物，它们是一对互成镜像的对映异构体，从物质的空间结构上看，对映体之间虽然不能重叠，但分子的组成是相同的，因此，许多物理化学性质也极为相近。但也有一些理化性质具有极大的差异，如旋光性、气味、与其他物质反应后的产物等。在化学合成反应中，常常有手性化合物作为反应原料、底物或者配体等投入，手性化合物的选择和使用，尤其是所选择的手性化合物的纯度对反应的进行和收率有较大的影响，所以能否得到纯度较高的对映异构体化合物对反应的进行相当重要。另外，在许多与生物体密切相关的生化反应中，反应是否能够发生大多数情况下与物质的手性特征相关，因此物质的手性特征、物质的手性反应以及物质的手性合成和分离等研究具有不可轻视的重大意义。

手性拆分常用的方法有结晶分离法、化学法、酶解法和色谱分离法，此外还有聚合物膜拆分法、萃取拆分法、电泳拆分法等。其中每种方法均有各自的优势特点和一定的局限性。随着色谱技术的发展，利用手性化合物在色谱柱中吸附和解吸附速率不同而得到分离的分离方式由于操作的便捷和高效得到越来越多的应用。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津制备型高效液相色谱仪。具体配置为 LC-20AP×2 (输液泵)，SIL-10AP (自动进样器)，SPD-20A (紫外检测器，配制备型流通池)，FRC-10A (馏分收集器)，CBM-20A (系统控制器)，LabSolutions (色谱工作站)。

1.2 制备纯化条件

1.2.1 液相条件

色 谱 柱	: Daicel Chiralcel OD-H 250 mm L×10 mm ID, 5 μm		
流 动 相 A	: 正己烷	流 动 相 B	: 异丙醇
洗 脱 方 式	: 等度洗脱, A 相/B 相=5/95 (V/V)	流 速	: 5 mL/min
检 测 波 长	: 190 nm		

1.2.2 收集参数

半 峰 宽	: 2 sec	斜 率	: 10 μV/sec
水 平	: 5000 μV	收 集 体 积	: 16.0 mL
响 应	: 1 sec	收 集 时 间 程 序	: 见表 1

表 1 收集时间程序

	Time	Action	Value
1	0.33	Lock	Lock
2	12.00	Lock	Unlock
3	22.00	Lock	Lock

2.结果与结论

2.1 分离前分析结果

样品 JF 为通过化学合成手段得到的一对手性异构体化合物，由于进一步合成反应的要求，需要对其进行异构体拆分，为在制备分离过程中快速找到合适的方法，纯化之前，先对该样品进行 HPLC 分析测试，结果如图 1 所示，以确定流动相条件和在该条件下各组分的色谱保留特性。

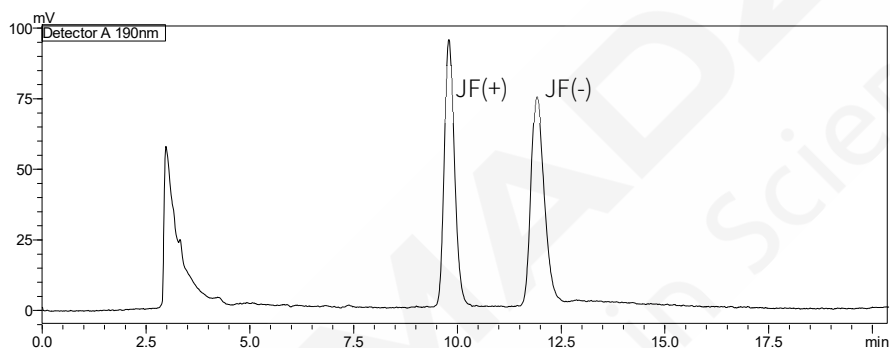


图 1 异构体样品 JF 的 HPLC 分析结果 (分析条件见表 2)

2.2 样品分离

样品 JF，制备色谱流动相初始比例溶解，经过有机相 0.45 μm 滤膜过滤后，进样 500 μL 。

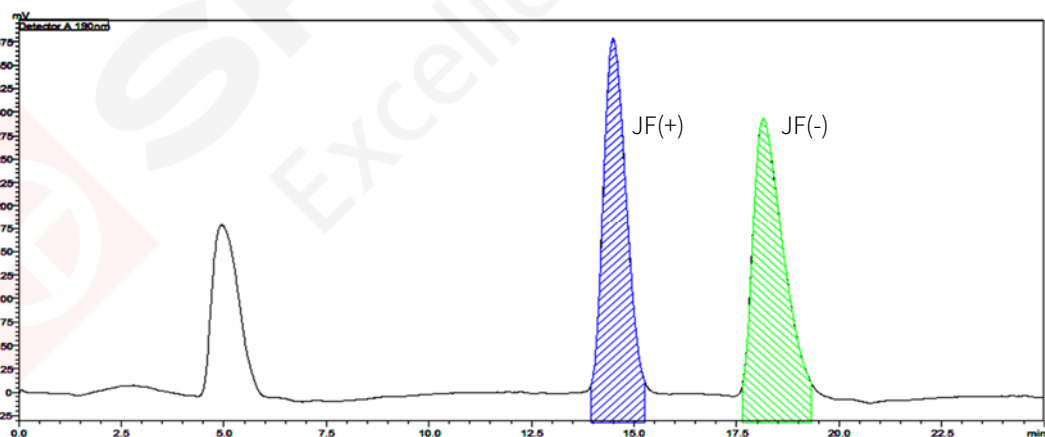


图 2 异构体样品 JF 的制备分离色谱图

Rt.14.6 min JF(+), Rt.18.2 min JF(-)

2.3 分离结果确认

表 2 HPLC 分析条件

项目	参数
仪器类型	: Shimadzu HPLC LC-20A
输液泵	: LC-20AB
检测器	: SPD-20A
检测波长	: 190 nm
色谱柱	: Daicel Chiralcel OD-H 250 mm L×4.6 mm ID, 5 μm
流动相	: 正己烷-异丙醇 (10/90, V/V)
流速	: 1 mL/min
进样量	: 20 μL

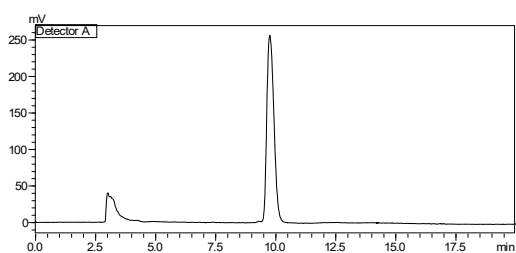


图 3 JF(+)-HPLC 检测图

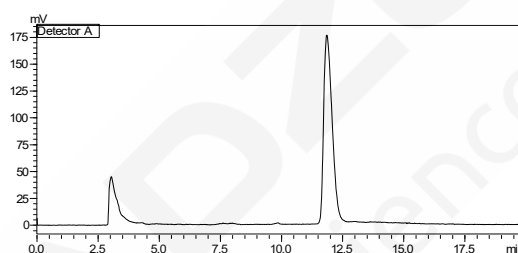


图 4 JF(-)-HPLC 检测图

该实验中使用了收集时间程序，其中 Lock 命令的应用使得启动和结束收集的时间范围可控，对于节省收集容器和提高工作效率大有裨益。具体的使用方式为，在时间节点选择 Lock 命令，设置参数为 Lock，则自此时间后收集功能关闭，直到下一个时间节点中出现参数为 Unlock 的 Lock 命令才恢复收集功能。需要注意的是，在 Unlock 区域中，须满足 Level 和 Slope 的要求才能启动收集。

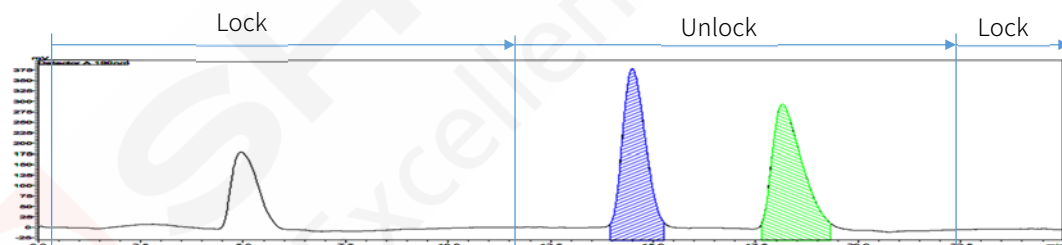


图 5 Lock 命令使用示意图

3.结论

使用岛津 LC-20AP 制备液相色谱仪对化学合成异构体样品 JF 进行手性拆分，JF(+)和 JF(-)可以在上述色谱条件下实现基线分离，对分离结果进行 HPLC 检测，纯度符合实验要求。

LC-20AP 制备液相色谱进行药物稳定性考察的应用

摘要：利用岛津 LC-20AP 制备液相色谱进行原料药稳定性考察研究，对样品中的目标杂质进行制备分离，采用 Shim-pack PRC-ODS 20 mm i.d×250 mm L 15 μm 半制备型色谱柱和水-乙腈流动相体系，通过对收集时间程序的使用，只对目标峰进行定位收集，达到高效准确的目的。

关键词：制备液相色谱 原料药 稳定性 分离纯化

药品的稳定性是指原料药及制剂保持其物理、化学、生物学和微生物学性质的能力。稳定性研究目的是考察原料药或制剂的性质在温度、湿度、光线等条件的影 响下随时间变化的规律，为药品的生产、包装、贮存、运输条件和有效期的确定提供科学依据，以保障临床用药安全有效。稳定性试验要求在一定的温度、湿度、光照条件下进行，这些放置条件的设置应充分考虑到药品在贮存、运输及使用过程中可能遇到的环境因素。

本文研究了一种广泛应用于临床的非甾体类抗炎药——布洛芬在高温条件下稳定性考察中的一种主要降解产物的制备分离方法，为随后杂质研究和生产工艺的改善提供帮助。

1. 仪器配置

类型：岛津制备型高效液相色谱仪

配置：LC-20AP×2（输液泵），SIL-10AP（自动进样器），SPD-20A（紫外检测器，配制备型流通池），FRC-10A（馏分收集器，含大容量组件），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver. 5.8（色谱工作站）。

2. 分析条件

2.1 液相条件

色 谱 柱 ： Shim-pack PRC-ODS 20 mm i.d×250 mm L, 15 μm

流 动 相 A ： 水

流 动 相 B ： 乙腈

洗 脱 方 式 ： 梯度洗脱，初始 30%B，洗脱程序详见表 1.

流 速 ： 20 mL/min

检 测 波 长 ： 206 nm

进 样 量 ： 800 μL

2.2 收集参数

半 峰 宽 ： 2 sec

斜 率 ： 0 μV/sec

水 平 ： 2000 μV

响 应 ： 0.5 sec

收 集 体 积 ： 1000 mL（大体积收集方式）

收 集 时 间 程 序 ： 见表 2.

表 1. 梯度时间程序

Time	Module	Command	Value
11.00	Pumps	Pump B Conc.	30
13.00	Pumps	Pump B Conc.	80
20.00	Pumps	Pump B Conc.	80
22.00	Pumps	Pump B Conc.	30
30.00	Pumps	Pump B Conc.	30
30.00	Controller	Stop	

表 2 收集时间程序

	Time	Action	Value
1	0.33	Lock	Lock
2	9.50	Lock	Unlock
3	11.20	Lock	Lock

3.结果与结论

布洛芬高温加速稳定性实验中某杂质的制备分离色谱图如下。

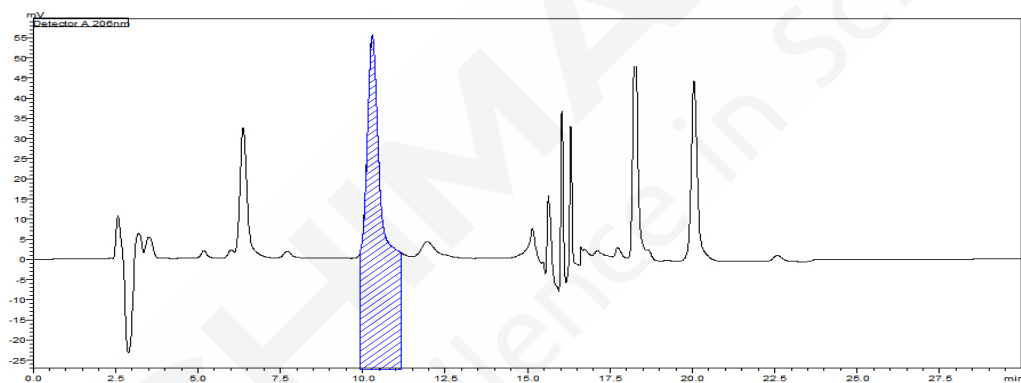


图 1 布洛芬高温加速稳定性实验中某杂质的制备分离色谱图

使用岛津 LC-20AP 制备型高效液相色谱仪对布洛芬高温加速稳定性实验中某杂质的制备分离采用大体积收集方式，重复进样多次便可收集大量的目标杂质供后续研究。另外，利用收集时间程序中“锁定”的功能，配合收集水平参数的使用，有选择性的收集到目标峰，控制精度高，避免收集容器的大量使用，节约成本。

LC-20AP 制备液相色谱对原料药中相关杂质的制备分离

摘要：本文建立了一种以岛津 LC-20AP 制备液相色谱进行原料药中相关杂质制备分离的方法。使用 Shim-pack PRC-ODS 20 mmID.×250 mmL. 15 μm 色谱柱和水-乙腈（4/6，V/V）为流动相，采用等度洗脱的方式，采用在时间程序 Lock 命令控制下的水平（Level）收集方式，成功对两种微量杂质进行分离和收集。

关键词：制备液相色谱 原料药 杂质 分离纯化

药物的杂质是药物中除主成分和其他功能成分之外的少量已知或未知的物质，少量杂质的存在往往会对药效发挥产生重要影响甚至产生严重的致毒致癌致畸作用，因此对药物杂质的研究和确认是药物生产、制剂、包装、储运等环节中不可或缺的重要方面。获得杂质的结构信息和药效学数据在药品研发和生产过程中具有重要的意义。

制备型高效液相色谱仪是利用高效液相色谱分离原理和技术，通过自动化的进样、分离、检测和收集装置对复杂组分中的目标化合物进行分离和收集的装置。随着液相色谱技术的发展，反相色谱，尤其是以 ODS 为填料的色谱类型在化合物的分离中应用日趋广泛。使用制备型高效液相色谱仪和反相色谱 ODS 填料的制备型色谱柱可以快速、方便、可靠的对待分离物质进行纯化。

本文研究了一种新型胆碱酯酶抑制剂——盐酸戊乙奎醚的两种相关杂质的制备分离方法，采用时间程序准确控制收集命令，为随后杂质研究和生产工艺的改善提供帮助。

1. 仪器配置

类型：岛津制备型高效液相色谱仪

配置：LC-20AP×2（输液泵）SIL-10AP（自动进样器），SPD-20A（紫外检测器，配制备型流通池），FRC-10A（馏分收集器），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver. 5.8（色谱工作站）。

2. 分析条件

2.1 液相条件

色 谱 柱 ： Shim-pack PRC-ODS 20 mm i.d×250 mm L, 15 μm

流 动 相 A ： 水

流 动 相 B ： 乙腈

洗 脱 方 式 ： 等度洗脱，A 相/B 相=4/6（V/V）

流 速 ： 15 mL/min

检 测 波 长 ： 210 nm

进 样 量 ： 700 μL

2.2 收集参数

半 峰 宽 ： 2 sec

斜 率 ： 0 μV/sec

水 平 ： 500 μV

收集体积 ： 15.0 mL

响 应 ： 0.5 sec

收集时间程序 ： 见表 1.

表 1 收集时间程序

	Time	Action	Value
1	0.33	Lock	Lock
2	31.00	Lock	Unlock
3	34.00	Lock	Lock
4	37.00	Lock	Unlock
5	42.00	Lock	Lock

3.结果与讨论

盐酸戊乙奎醚杂质制备色谱图如下所示。

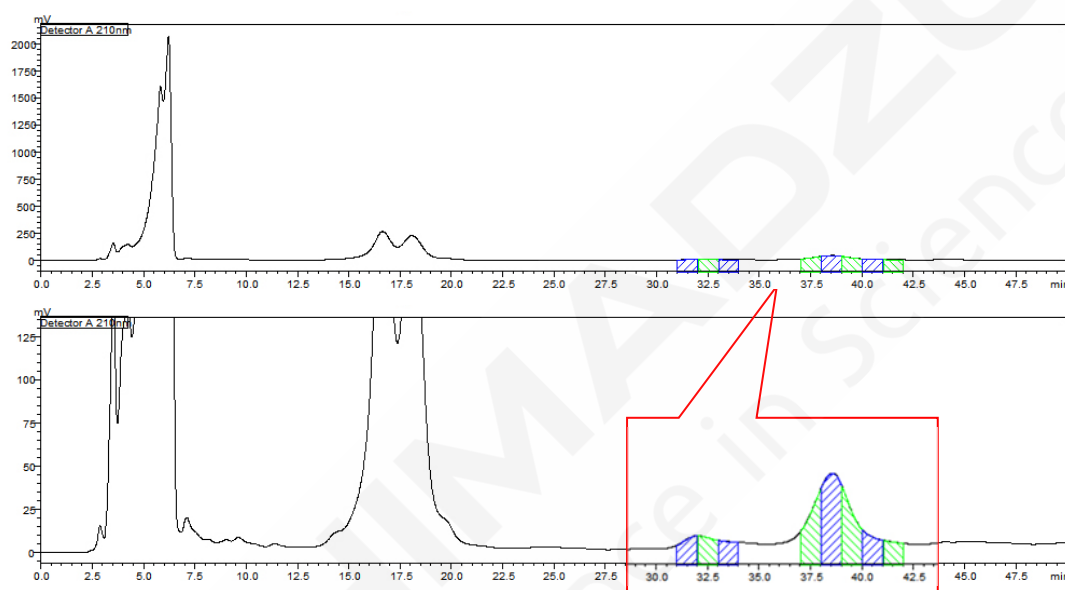


图 1 盐酸戊乙奎醚杂质制备色谱图

针对杂质含量少，响应强度低的特点，使用岛津 LC-20AP 制备型高效液相色谱仪对盐酸戊乙奎醚中某杂质的制备分离采用时间程序控制方式进行收集。在岛津色谱工作站 LabSolutions 仪器参数设置中，使用“Lock”命令对收集阀的开关加以控制。该命令不同于直接使用“Valve Open”和“Valve Close”命令，后者是简单的强制式的控制命令，使用时，半峰宽、斜率、水平等收集参数将无效，直接予以收集或停止。而“Lock”命令是在半峰宽、斜率、水平等收集参数生效的前提下才能工作，在“Unlock”到“Lock”之前的时间内，只有达到上述收集参数的要求的色谱峰才能被收集，体现了智能化的特点，有选择性的收集到目标峰，控制精度高，收集准确，并可以避免收集容器的大量使用，以节约成本。

2.2 制备系统检测结果

根据2.1分析柱分离结果,将方法放大到制备柱上,制备系统分离结果如图2所示(样品浓度3 mg/mL)。

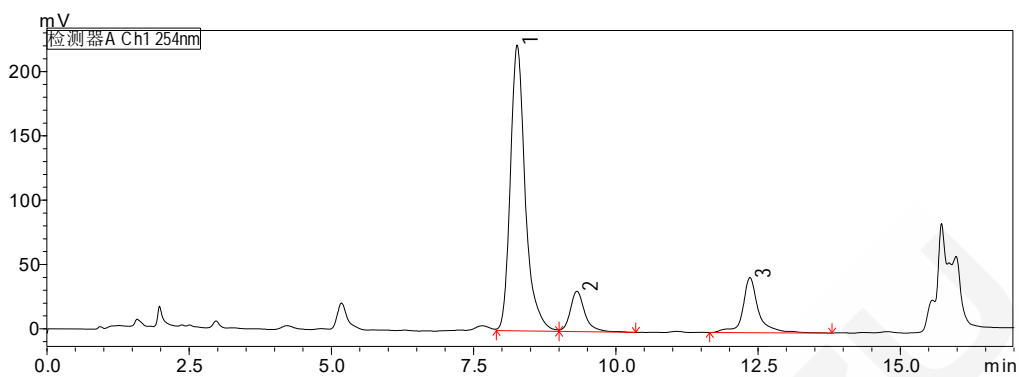


图2 制备系统分离结果

(进样量 100 μ L; 检测波长: 254 nm。1: 大豆苷; 2: 黄豆黄苷; 3: 染料木苷)

2.3 样品制备分离结果

2.3.1 制备系统放大结果

通常每次进样分析所得纯品量最大是制备 HPLC 的主要目的,为此常常通过加大进样量来增加制备通量。图3显示了固定进样量为 100 μ L 时,逐渐提高样品浓度对分离结果的影响,从图中可以看出随着样品浓度提高,目标峰的信号逐渐增强,有利于提高制备通量。同时,由于样品溶解度的限制,此时通过提高样品浓度来进一步增加样品制备通量不易实现,因此接下来尝试通过提高进样体积来增加制备通量。

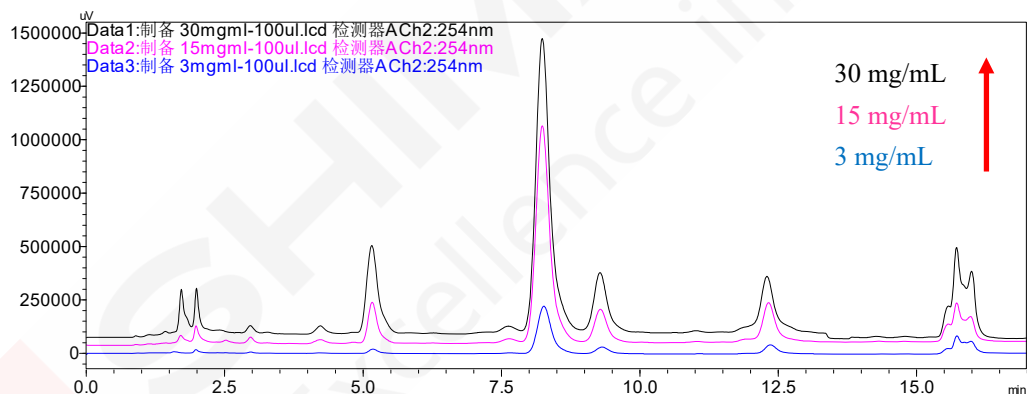


图3 提高样品浓度对制备系统分离结果影响

(进样量 100 μ L; 检测波长: 254 nm; 各个谱图对应样品浓度从下到上分别是 3 mg/mL、15 mg/mL 及 30 mg/mL)

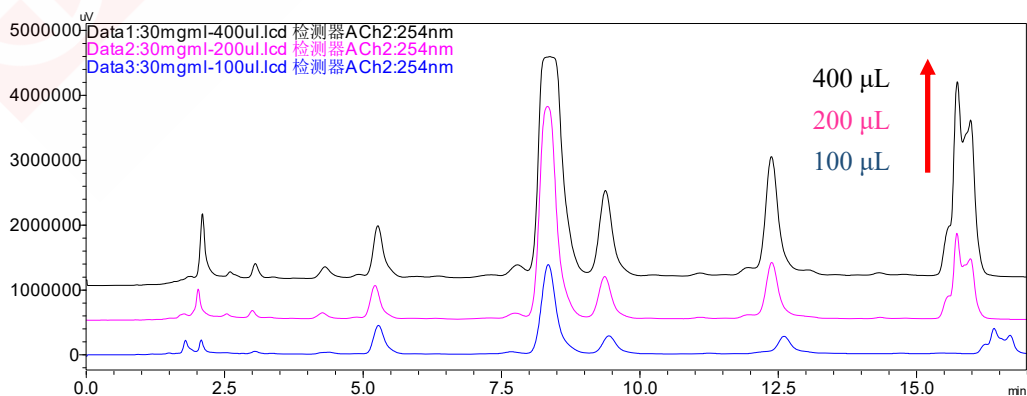


图4 提高进样体积对制备系统分离结果影响

(样品浓度 30 mg/mL; 检测波长: 254 nm; 各个谱图对应的进样体积从下到上分别是 100 μ L、200 μ L 及 400 μ L)

图 4 显示了固定样品浓度为 30 mg/mL 时, 逐渐增大进样体积对分离结果的影响。随着进样体积增大, 各目标组分峰的信号强度增加, 但同时与目标峰邻近的杂质峰信号也在增强, 容易包裹到目标峰中, 不利于制得高纯度组分, 且进样体积增大易产生溶剂效应。综合考虑, 确定采用样品浓度 30 mg/mL, 进样体积 400 μ L 作为制备条件。

2.4.2 制备系统制备分离情况

采用紫外信号强度作为馏分收集触发条件, 设置水平阈值为 200000 μ V, 斜率为 10 μ V/Sec, 经制备系统收集馏分, 得到三个大豆异黄酮的馏分收集色谱图如图 5 所示。

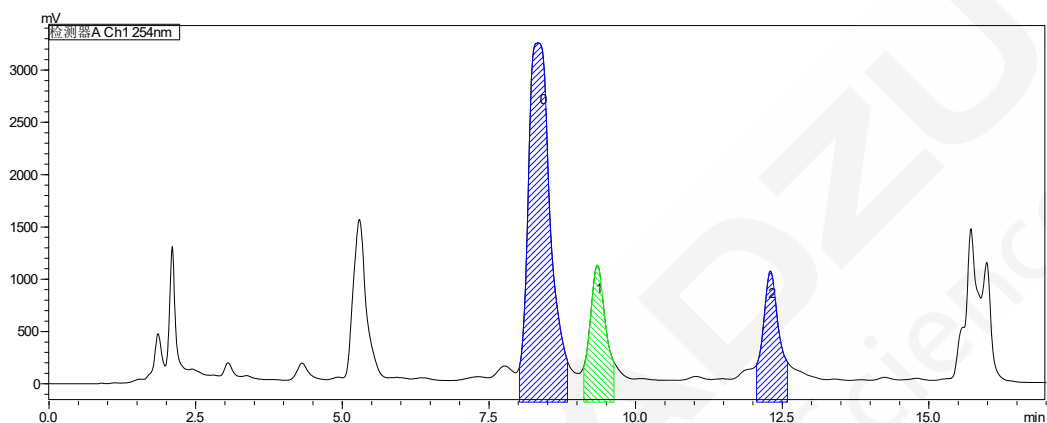


图 5 馏分收集色谱图 (0 大豆苷 1 黄豆黄苷 2 染料木苷)

2.4.3 制备样品的纯度分析结果

以峰面积归一化法 (检测波长: 254 nm) 对收集的馏分进行纯度表征, 结果如表 3 所示, 制得的大豆苷的纯度为 99.70%, 回收率 95.63%; 黄豆黄苷的纯度为 97.37%, 回收率 92.64%; 染料木苷的纯度为 96.70%, 回收率 83.20%。纯度和回收率均较高。

表 3 目标组分制备前后纯度比较及回收率结果

化合物	制备前纯度 (%)	制备后纯度 (%)	回收率 (%)
大豆苷	45.42	99.70	95.63
黄豆黄苷	6.15	97.37	92.64
染料木苷	8.44	96.70	83.20

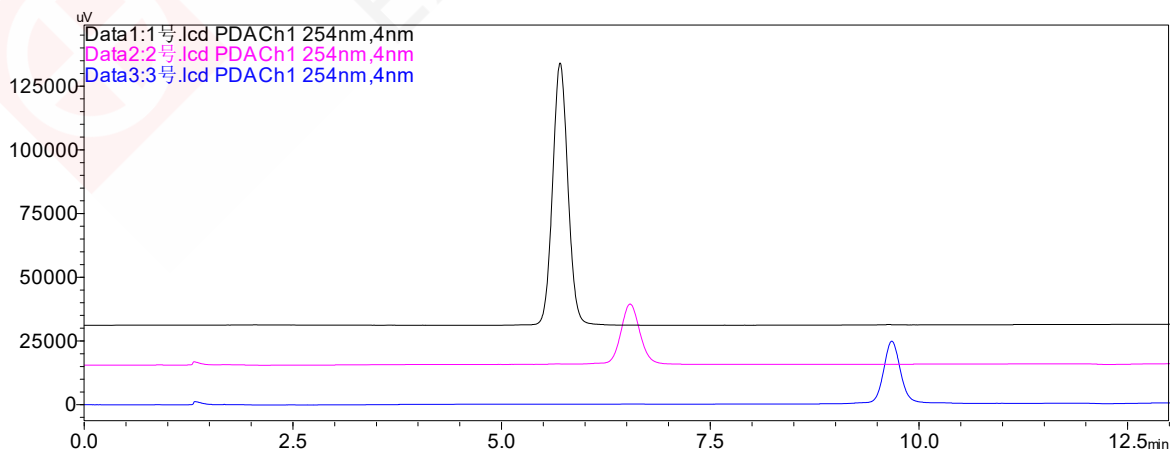


图 6 馏分纯度测试色谱图 (检测波长: 254 nm)

3. 结论

利用岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统可实现一次分离中对大豆提取物中大豆苷、黄豆黄苷及染料木苷的同时分离纯化。以紫外信号强度作为触发信号进行馏分收集，经分离制备的大豆苷纯度由制备前的 45.42% 提高到 99.70%，黄豆黄苷的纯度由制备前的 6.15% 提高到 97.37%，染料木苷的纯度由制备前的 8.44% 提高的 96.70%；相应的回收率分别为 95.63%、92.64% 及 83.20%。



LC-16P 分离纯化绿茶提取物粗品中的茶氨酸

摘要：本文考察了岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统在绿茶提取物粗品中茶氨酸的分离纯化上的应用。首先在分析柱上优化了分离条件，接着将方法放大到制备柱上，对目标组分进行制备纯化。以 Lock 命令结合斜率阈值和水平阈值三个馏分收集命令作为馏分收集触发条件对目标组分进行收集，以峰面积归一化法对馏分进行纯度表征，结果表明，在 203 nm 波长下，目标组分茶氨酸的纯度由制备前的 62.54 % 提高至制备后的 96.78 %。

关键词：LC-16P 半制备系统 茶氨酸 分离纯化

茶氨酸是茶叶中的特有的一种非蛋白氨基酸，约占茶叶中游离氨基酸的 40% 以上，占茶叶干重的 1%~2%，茶氨酸可使茶汤鲜爽、有焦糖味，可显著改善绿茶茶汤的风味，并且具有多种重要的生理作用，可由其开发出各种相应的产品投放市场，但因天然纯品产量有限，所以国际市场价格很高。

本文利用岛津 LC-16P 系统对绿茶提取物粗品中的茶氨酸进行制备分离。由于茶氨酸的极性较大，有文献报道采用氰基柱对其进行分离，虽然保留时间增加，但主成分和茶叶中的其他组分不能完全分离；采用 C18 柱进行分离制备时，茶氨酸保留较差，流动相中加入酸之后，保留有所增加；同时茶氨酸的最大紫外吸波长在 203 nm 左右，其他和其保留时间接近的杂质峰对其纯度影响较大。故本文使用 C18 柱，采用 TFA-水-乙腈体系增强茶氨酸保留，在梯度洗脱的起始时大幅度提高水相所占比例以进一步增强茶氨酸保留能力；同时使用收集时间程序，结合水平阈值和斜率阈值进行馏分收集，以减小杂质峰对目标峰的纯度影响，得到较高纯度的馏分。

1. 实验部分

1.1 分析仪器

本实验使用的仪器为 Essentia LC-16P 半制备系统。具体配置为 LC-16P 输液泵×2，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-16P 自动进样器，CBM-20A 系统控制器，SPD-16 紫外检测器，FRC-10A 馏分收集器，LabSolutions Essentia Version 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-pack GIS C18 (4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm)

流 动 相 A：0.05%-TFA-水

流 动 相 B：0.05%-TFA-乙腈

流 速：1 mL/min

进 样 量：20 μL

检 测 波 长：203 nm

洗 脱 方 式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 2 %

表 1 分析系统梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
10.0	Pumps	Pump B Conc.	2
12.0	Pumps	Pump B Conc.	95
15.0	Pumps	Pump B Conc.	95
15.1	Pumps	Pump B Conc.	2
20.0	Controller	Stop	

2.3 制备系统检测结果

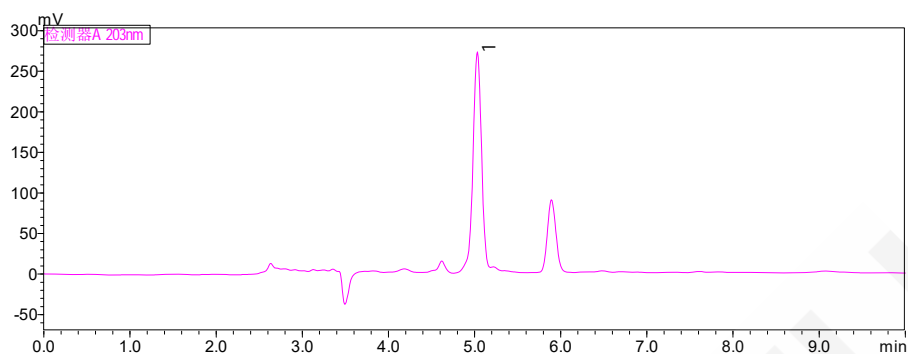


图 1 分析系统检测色谱图 (检测波长: 203 nm; 1 茶氨酸)

根据 2.1 分析柱分离结果, 将方法放大到制备柱上, 同样在 0~10 min 以 2%B 等度洗脱, 之后提高 B% 比例, 将保留较强组分洗脱, 得到如图 2 所示的分离结果 (样品浓度 1.0 mg/mL, 进样量 100 μ L)。

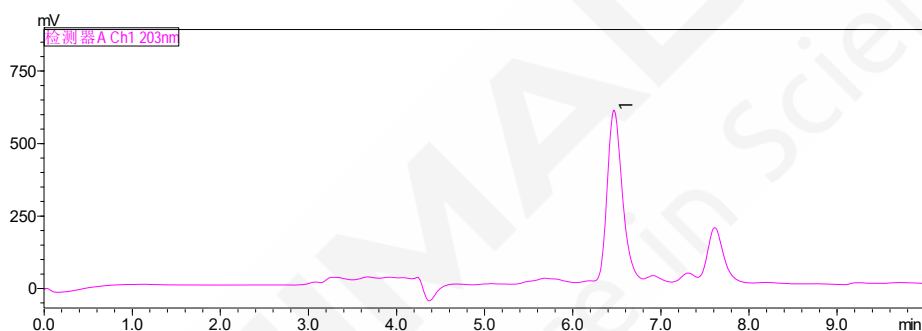


图 2 制备系统检测色谱图 (检测波长: 203 nm; 1 茶氨酸)

2.3 制备系统分离结果

2.3.1 样品浓度对制备系统分离影响

图 3 显示了固定进样体积, 逐渐增加样品浓度对分离结果的影响。由图可知, 随着样品浓度增加目标峰的信号逐渐增强, 利于提高制备效率。同时受制于样品溶解度, 通过进一步提高样品浓度来增加制备通量不易实现, 接下来尝试通过增加进样体积提高制备效率。

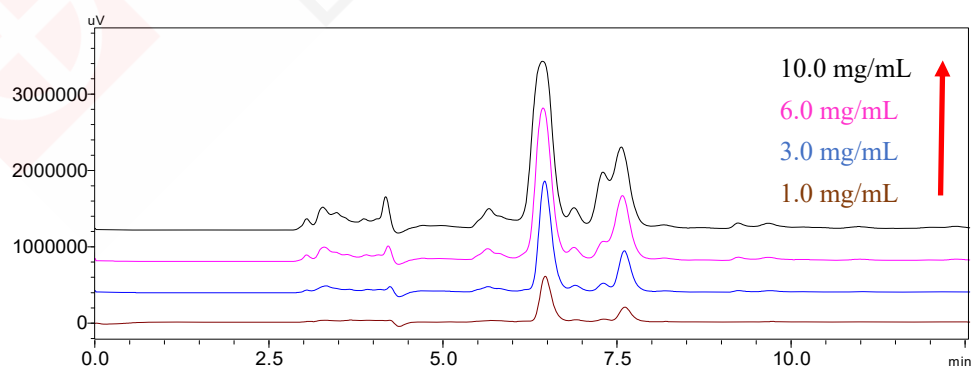
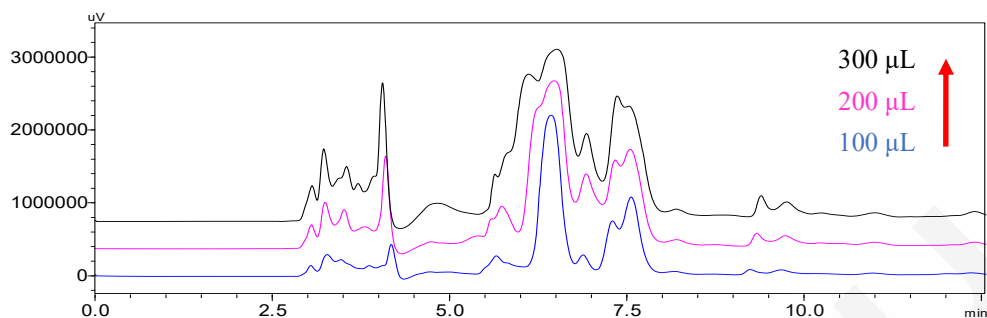


图 3 提高样品浓度对对制备系统分离结果的影响

(进样量: 100 μ L, 检测波长: 203 nm; 各个谱图对应样品浓度从下到上分别为 1.0 mg/mL、3.0 mg/mL、6.0、10 mg/mL)

2.3.2 制备系统放大结果

如图 4 所示，固定样品浓度为 10 mg/mL，逐渐增加进样体积，考察加大进样体积对分离结果的影响。



随着进样体积增加，色谱柱超载，在超载条件下操作色谱柱有利于提高制备效率；同时，超载条件下色谱谱带变形，杂质峰和目标峰之间的分离度下降，峰重叠程度加剧，不利于得到高纯度组分。综合考虑，确定采用样品浓度 10 mg/mL，进样体积 200 μ L 作为制备条件。

图 4 提高样品浓度对制备系统分离结果的影响

(样品浓度：10 mg/ml，检测波长：203 nm；各个谱图对应进样体积从下到上分别为 100 μ L、200 μ L、300 μ L)

2.3.3 制备系统放大结果

该实验中采用收集时间程序，使用 Lock 命令控制馏分收集的开始和结束时间，这对于节省收集容器和提高效率具有积极意义。具体使用方式为：在时间节点选择 Lock 命令，设置参数为 Lock，则自此时间点后收集功能关闭，直至下一个时间节点中出现参数为 Unlock 的 Lock 命令才恢复收集功能。需要指出的是，在 Unlock 区域中，须满足 Level 和 Slope 的要求才能启动收集。据此，本次实验采用紫外信号强度作为馏分收集条件，设置水平阈值为 50000 μ V，斜率为 100 μ V/sec，Unlock 时间段为 6.05~6.70 min，经制备系统收集馏分，得到茶氨酸的馏分收集色谱图如图 5 所示：

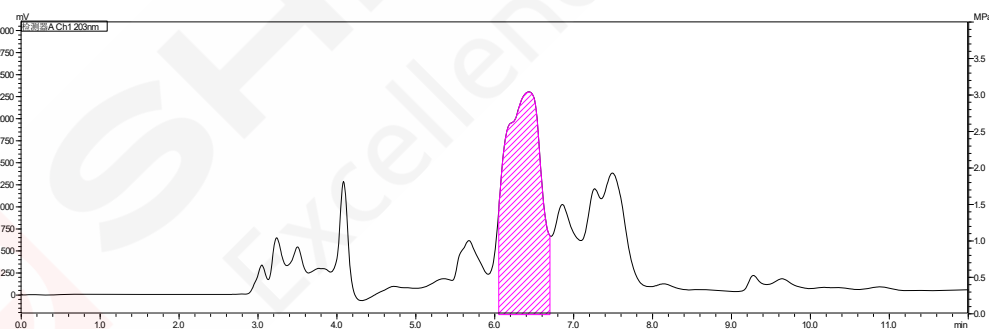


图 5 制备系统组分制备结果

2.3.4 制备样品的纯度及回收率分析结果

以峰面积归一化法对收集的馏分进行分析（检测波长：203 nm），结果如图 6 所示。茶氨酸组分的纯度由制备前的 62.54%提高至制备后的 96.78%，相应的回收率为 93.35%。

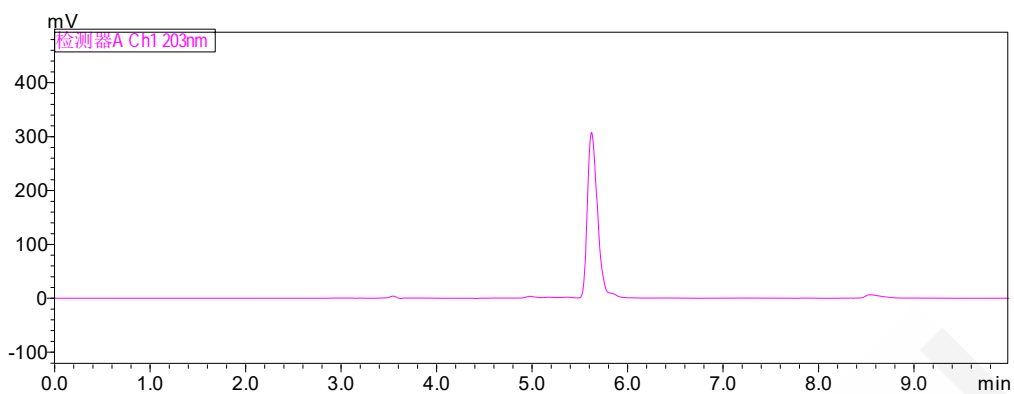


图6 馏分纯度测试色谱图

3. 结论

利用岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统可实现绿茶提取物粗品中茶氨酸的分离纯化。以 Lock 命令结合斜率阈值和水平阈值三个馏分收集命令作为馏分收集条件对目标组分进行收集，可制得高纯度的茶氨酸样品。

LC-16P 用于全合成中间体 2,4,5-三氯嘧啶类化合物的纯化

摘要：本文利用岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统对 2,4,5-三氯嘧啶类化合物全合成过程中的中间体进行了分离纯化。首先将 LC-16P 系统作为分析系统，在分析柱上优化了目标化合物的分离条件；接着将 LC-16P 系统作为制备系统，对样品中的目标化合物进行了制备纯化。目标峰以紫外色谱图强度水平作为馏分收集触发条件进行收集，对获得的馏分以峰面积归一化法进行纯度表征。结果表明在 254 nm 波长下，目标化合物的纯度由制备前的 4.33% 提高到 96.40%，相应的回收率为 90.78%。

关键词：LC-16P 半制备系统 全合成中间体 2,4,5-三氯嘧啶类化合物 分离纯化

2,4,5-三氯嘧啶是合成激酶类抑制剂的重要母核，作为基本的合成原料，可用于各类以 2,4,5-三氯嘧啶为母核结构化合物的合成。本文利用岛津 LC-16P 系统对以 2,4,5-三氯嘧啶为母核，合成表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂过程中的中间体进行分离纯化，以紫外信号强度作为馏分收集触发条件，通过一次分离即可制得高纯度的目标组分，满足核磁、质谱等表征的纯度要求，并可用于后续合成中。

1. 实验部分

1.1 分析仪器

本实验使用的仪器为 Essentia LC-16P 半制备系统。具体配置为 LC-16P 输液泵×2，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-16P 自动进样器，CBM-20A 系统控制器，SPD-16 紫外检测器，FRC-10A 馏分收集器，LabSolutions Essentia Version 5.82 色谱工作站。

1.2 分析条件

色 谱 柱：Shim-pack GIST C18 (4.6 mm I.D.×150 mm L., 5 μm)
流 动 相 A：水 流 动 相 B：乙腈
流 速：1 mL/min 进 样 量：20 μL
检 测 波 长：254 nm 洗 脱 方 式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%

表 1 分析系统梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
4.0	Pumps	Pump B Conc	40
4.01	Pumps	Pump B Conc	90
20	Pumps	Pump B Conc	90
20.01	Pumps	Pump B Conc	40
20	Controller	Stop	

1.3 制备条件

色 谱 柱：Shim-pack GIST C18 (10 mm I.D.×150 mm L., 5 μm)
流 动 相 A：水 流 动 相 B：乙腈
流 速：4.7 mL/min 进 样 量：100 μL
检 测 波 长：254 nm 洗 脱 方 式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%

2.3 样品制备分离结果

2.3.1 提高制备系统进样浓度结果

图 3 显示了固定进样量为 100 μL 时，逐渐提高样品浓度对分离结果的影响。从图中可以看出提高样品浓度时，目标峰信号逐渐增强，有利于提高制备效率。当样品浓度达到一定数值时，受样品溶解度限制，通过提高样品浓度来进一步增加样品制备通量不易实现，因此进一步尝试通过提高进样体积来提高制备通量。

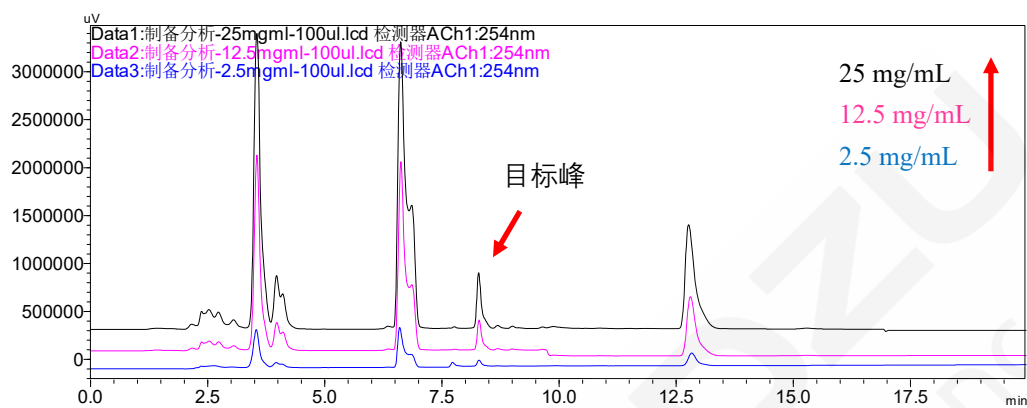


图 3 提高样品浓度对制备系统分离结果影响 (检测波长: 254 nm)

2.3.2 提高制备系统进样体积结果

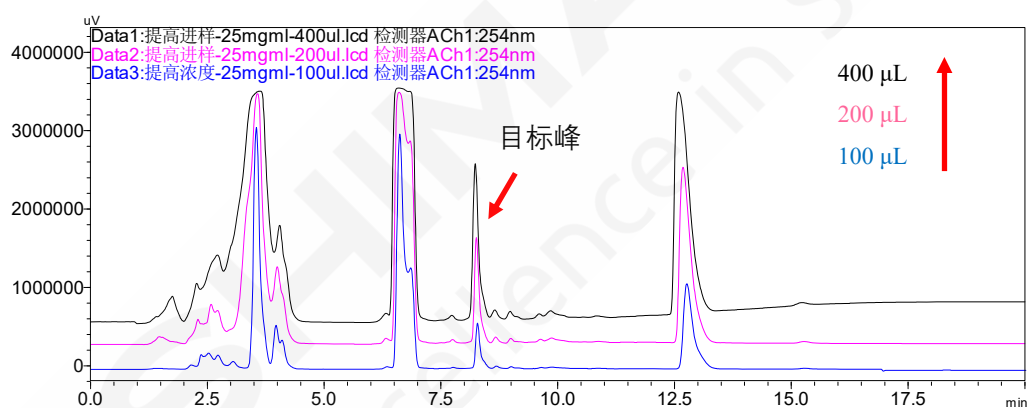


图 4 提高样品浓度对制备系统分离结果影响 (检测波长: 254 nm)

图 4 显示了固定样品浓度为 25 mg/mL 时，逐渐增大进样体积对分离结果的影响。随着进样体积增大，目标峰的信号增加，这对提高制备通量是有利的，但进一步增大进样体积容易使邻近的小杂质峰包裹到目标峰中，对目标峰纯度产生不利影响。综合考虑，确定采用样品浓度 25 mg/mL，进样体积 400 μL 作为制备条件。

2.3.3 制备系统制备分离情况

以紫外信号强度作为馏分收集触发条件，设置水平和斜率阈值分别为 300000 μV 、100 $\mu\text{V}/\text{Sec}$ ，经制备系统收集馏分，得到 2,4,5-三氯嘧啶目标化合物的馏分收集色谱图如图 5 所示。

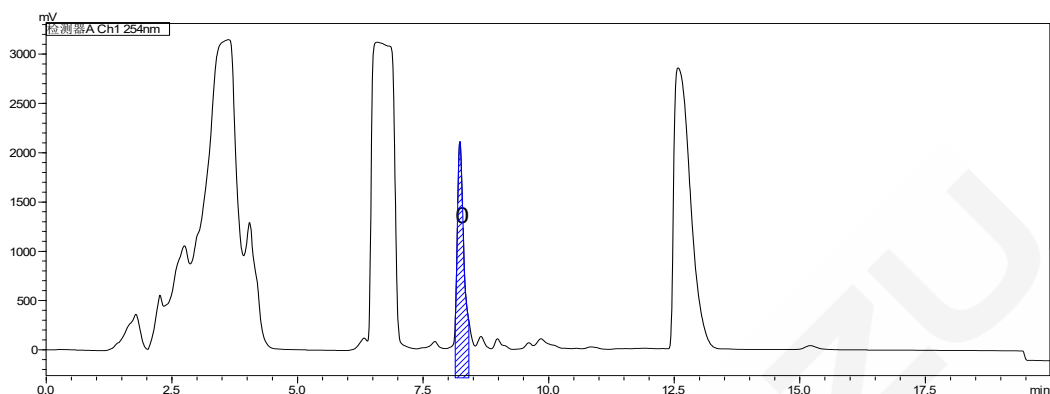


图 5 馏分收集色谱图 (0: 目标化合物)

2.3.4 馏分的纯度分析结果

以峰面积归一化法对收集的馏分进行纯度表征，结果如表 3 所示，制得的 2,4,5-三氯嘧啶类化合物的纯度为 96.40%，回收率 90.78%，相较于制备前目标组分纯度有大幅度提高，且回收率较高。

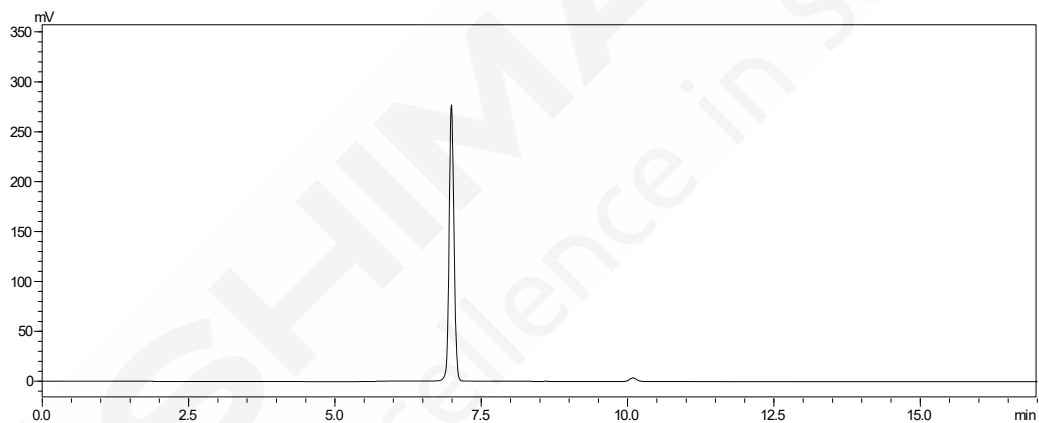


图 6 馏分纯度测试色谱图

表 3 目标组分制备前后纯度比较及回收率 (峰面积归一化法, 检测波长: 254 nm)

化合物	制备前纯度 (%)	制备后纯度 (%)	回收率 (%)
中间体	4.37	96.40	90.78

3. 结论

利用岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统实现了全合成中间体的分离纯化。对合成表皮生长因子受体 (EGFR) 的中间体以紫外信号强度作为触发信号进行馏分收集，经分离制备的目标化合物纯度由制备前的 4.33% 提高到 96.40%，相应的回收率为 90.78%，纯度满足核磁、质谱等表征的需要，并可用于下一步合成。

3.3 复杂组分或低含量组分纯化

上一节中，主要介绍了常规半制备或者制备液相色谱分离纯化的案例，主要以化合物紫外吸收信号获得的色谱图为触发馏分收集的依据，同时待分离物质一般在色谱图上显示明显，经过开发后的分离方法让其与其他杂质有良好的分离度，这样在大多数情况下，可以满足常规的使用要求。在实际使用过程中，也有一些情况使得常规的方式不能获得明显的色谱图信息，或是因为结构影响而紫外吸收较弱、或是高价值目标物在样本中含量微弱、抑或是结构相近的同系物不能在现有色谱条件下达到有效分离，进而影响了馏分收集的准确性和制备收集的回收率。针对此类样的特征，可以选择特殊分离手段或者其他检测器作为分离方式和收集依据。

质谱是一种化学分析形式，用于测量样品中原子或分子的质荷比 (m/z)。它还能区分同一元素的同位素。根据质谱仪的类型，这些测量通常可用于确定样品组分的确切分子量并鉴定未知化合物组成。质谱由于具有较高的专属性和灵敏度，其作为 HPLC 的检测器的应用越来越收到分析实验者青睐。同样，在液相色谱分离中，前面提到过的紫外响应不佳或者目标物在样本中含量较低的情况，就可以考虑使用质谱引导的制备液相色谱 (MS triggered Prep HPLC)。该系统在常规的以紫外 (UV) 信号为触发依据基础上，又添加了质谱检测器，多为单四极杆质谱仪 (SQMS)，同时考虑到液相端和质谱端流速的较大差异，一般配有专用的分流装置 (splitter)。信号方面，由于质谱的接入，可以依据离子流色谱图尤其是选择离子流 (MC) 或者混合离子流 (MIC) 进行针对特定离子的目标收集，让收集效率更高，更灵敏。在复杂组分的样品分离中，可以快速定位目标峰，在弱紫外吸收样品分离中可以提高样品制备回收率，在分离程度不佳的样品分离中可以精确进行峰切割。

ELSD 作为通用型检测器，最大的优点在于能检测不含发色团的化合物，其响应不依赖于样品的光学特性，任何挥发性低于流动相的样品均能被检测，不受其官能团的影响，适合一些如碳水化合物、脂类、聚合物等类型的化合物。将 ELSD 作为检测器接入制备液相色谱，同紫外信号通过逻辑关系组合，可对有紫外吸收和无紫外吸收的化合物进行全面的馏分收集，避免因信号源的问题导致产物的收集损失。本节中介绍了使用 PDA-ELSD 联用的方式进行中草药中复杂组分的全面收集。

如异构体这类难分离组分的纯化，提高色谱峰的分离度是成功的关键，在色谱系统和色谱填料既定的情况下，选择柱长更长的色谱柱是提高柱效的首要办法，但色谱柱的柱长受器材、加工、使用等各方面条件限制不可能无限增长，此时可使用“循环制备”法来弥补柱长不足的缺陷。循环制备是把分离的样品送回到泵的入口侧，在同一个色谱柱循环多次分离以提高分离效果的一种手法。本节介绍了岛津循环制备色谱仪进行同系物分离的案例，在专用工作站软件的支持下，以简单的色谱系统，完成数倍于常规单次分离方式的柱效，实现高效、经济的分离效果。

质谱引导型制备液相色谱在新药研发中的应用

摘要: 针对新药研发中采用化学合成手段得到的先导化合物, 需要经过分离纯化后才能进行进一步的研究。质谱引导型制备液相色谱仪以质谱信号作为馏分收集触发机制, 与紫外检测器相比, 信号更灵敏, 对于紫外信号弱的化合物的制备分离更为高效和可靠。本文以岛津质谱引导型制备液相色谱系统对合成药物粗品进行制备分离, 使用 C18 半制备型色谱柱和 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 采用梯度洗脱的方式, 完成对目标化合物分离和收集。

关键词: 质谱 制备液相色谱 先导化合物 分离纯化

目前在新药研发方式中, 通过化学合成得到先导化合物, 在小分子到大分子药物的研究都是常用并且快速的手段。从合成的粗产品中目标化合物有效分离是研发工作能够继续开展的关键。由于在先导化合物合成过程中, 往往需要多步甚至数十步反应, 期间投入的反应底物、催化剂和配体等数量巨大, 对于目标物的分离造成一定困难。

质谱引导型制备液相色谱仪以质谱信号作为馏分收集触发机制, 对符合特定质核比的色谱峰在达到设定阈值后进行收集。由于质谱信号的高灵敏性, 与紫外检测器相比, 收集更加准确, 对于紫外吸收弱的化合物或者样品中的微量成分而言, 质谱引导型制备液相色谱是一种更为高效和可靠的手段。

本文研究了合成先导化合物 NT1 的制备分离方法, 使用岛津质谱引导型制备液相色谱仪, 以质谱信号作为收集触发机制, 完成对目标产物的分离纯化。

1. 仪器配置

类型: 岛津制备/分析液相色谱-质谱联用仪

配置: LC-20AP×2 (输液泵)、LC-20AD (输液泵, 用于质谱进样补偿)、SIL-20A (自动进样器)、SPD-20A (紫外检测器, 配制备型流通池)、LCMS-2020 (质谱仪)、APV (主动型比例分流阀)、FRC-10A (馏分收集器)、CBM-20A (系统控制器)、LabSolutions Ver. 5.8 (色谱工作站)。

2. 分析条件

2.1 液相条件

色 谱 柱	: Dikma Diamonsil(2) C18 20 mm i.d×200 mm L, 5 μm	流 动 相 B	: 甲醇
流 动 相 A	: 0.1%甲酸水溶液	流 动 相 B	: 甲醇
洗 脱 方 式	: 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1	洗 脱 流 速	: 35 mL/min
补 偿 流 速	: 0.2 mL/min	检 测 波 长	: 220 nm, 254 nm
进 样 量	: 500 μL		

2.2 质谱参数

质 谱 仪	: LCMS-2020	离 子 源	: ESI(+)
扫 描 方 式	: SCAN (m/z 100-1200)	加 热 模 块 温 度	: 400°C
脱 溶 剂 管 温 度	: 250°C	雾 化 气 流 速	: 1.5 L/min
干 燥 气 流 速	: 10 L/min	离 子 源 接 口 电 压	: 4.5 kV

检测器电压 : 1.2 kV

质谱监测类型 : 质量数色谱图 (MC)

质谱监测离子 : m/z 406.00; m/z 407.00; m/z 429.00

2.3 分流参数

分流比: 20000 : 1

2.4 收集参数

收集信号 : MS

半峰宽 : 2 sec

斜率 : 0 μ V/sec

水平 : 25000 μ V

收集体积 : 16.0 mL

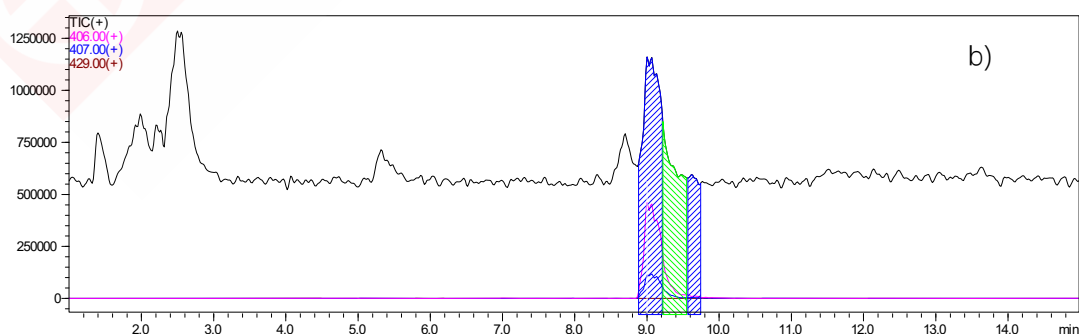
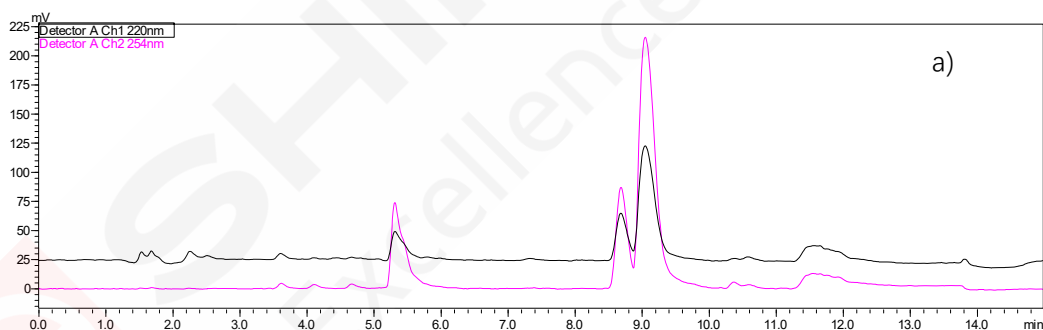
响应 : 1 sec

表 1 梯度洗脱程序

	Time	Module	Command	Value
1	0.01	Pumps	Pump B Conc.	7
2	10	Pumps	Pump B Conc.	27
3	10.2	Pumps	Pump B Conc.	100
4	12.2	Pumps	Pump B Conc.	100
5	12.4	Pumps	Pump B Conc.	7
6	13	Controller	Stop	

3.结果与讨论

先导化合物 NT1, 以甲醇溶液到浓度 10 mg/mL, 经过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后, 进样 500 μ L, 制备色谱图如下所示。



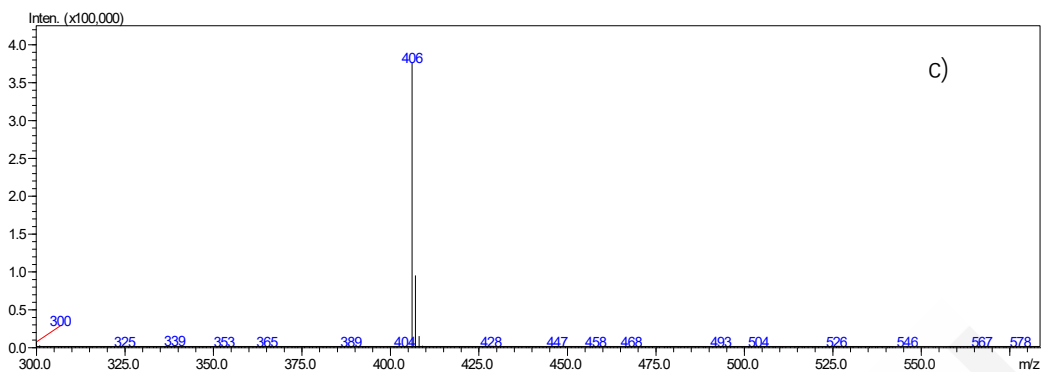


图 1 样品 NT1 的制备色谱图

a) 220 nm 和 254 nm 波长下紫外色谱图 b) 监测质量数色谱图 c) 目标峰的质谱图

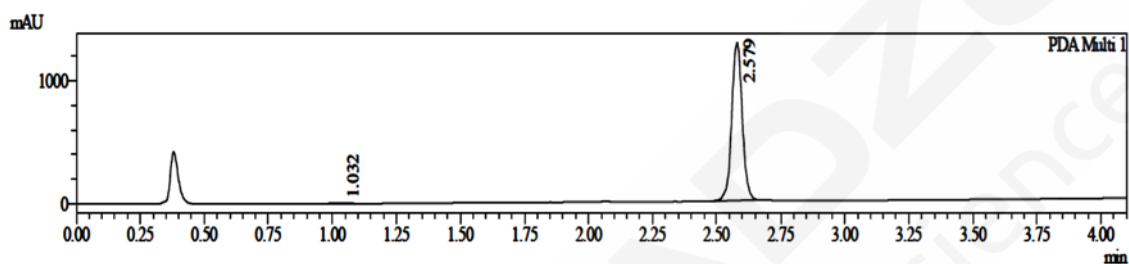


图 2 样品 NT1 收集馏分的 HPLC 色谱图

在使用质谱作为收集触发依据的时候，需要设置监测的离子，根据合成路线和分离前对该样品分析的结果，设定目标化合物在正离子模式下的 $[M+H]^+$ ，同位素峰 $[M+2]^+$ ， $[M+Na]^+$ 作为检测离子，当被检测离子响应超过设定限度后触发收集。使用质谱作为制备液相收集触发机制，可以得到更为灵敏的响应信号，因此分离的准确度和回收率可以大为提高。

质谱引导型制备液相用于药物杂质的鉴定及分离

摘要：本文建立了一种使用岛津质谱引导型高效液相制备色谱用于药物中多组分的制备分离的方法。以分离制备阿托伐他汀钙片中的有关物质为例，采用反向液相色谱，分别以紫外，质谱以及紫外和质谱同时触发馏分收集，详细说明了不同触发方式的参数设置以及 LH-40 的制备模拟功能，使用不同的触发方式都可以对目标组分进行准确的收集。多种触发收集模式，满足不同性质的化合物制备需求。

关键词：LH-40 质谱 制备分离 阿托伐他汀钙

色谱是根据混合物中各组分的化学特性差异对其进行分离的一种分离方法。制备型色谱则是指利用色谱方法分离出一定量达到足够纯度的化合物用于后续实验或处理的过程。按样品的分离目的和规模可以分为分析型、半制备型和制备型。

紫外检测器对于大多化合物有良好的响应，已成为高效液相色谱仪中常用的检测器，同时在制备液相中也被广泛的使用。但是在实际的馏分收集，目标峰紫外信号响应较弱时使用紫外触发制备会显著降低样品的回收率；对于样品中多个色谱峰中目标峰的定性确认需要花费大量时间；对于无紫外吸收的样品，则无法使用紫外触发馏分收集，以上都是紫外检测器对制备分离应用的制约。质谱检测器的加入可以很好的弥补紫外检测器的短板，可以更快的对多个色谱峰进行定性确认；可以在目标组分没有紫外响应或者响应较弱时使用质谱触发馏分收集，得到的结果更加准确。

本文采用岛津新型液体处理器 LH-40 作为进样器和馏分收集器，同时采集紫外和质谱两路信号，提供紫外和质谱两种检测模式的多种触发馏分收集方式，为相关仪器提供一种高效、灵敏、可靠的液相制备分离手段。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验中仪器具体配置为：

系统控制器	： SCL-40	检测器	： SPD-40
输液泵	： LC-40D XS	质谱仪	： LCMS-2020
柱温箱	： CTO-40C	色谱工作站	： LabSolutions Ver. 5.114
液体工作站	： LH-40		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱	： InertSustain™ C18 200 mm×4.6 mm I.D., 5 μm		
输液泵	： A相-20 mmol/L 乙酸铵水溶液（含 0.1%甲酸），B相-乙腈		
流速	： 1.0 mL/min	柱温	： 40°C
进样体积	： 20 μL	检测波长	： 254 nm
洗脱方式	： 梯度洗脱，初始浓度为 B 相 45%，洗脱程序见表 1		

表 2. 色谱峰信息表

No.	名称	保留时间	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
1	杂质 VII	12.3	718.3	716.25
2	杂质 I	21.0	541.45	539.25
3	杂质 II	22.1	559.6	557.15
4	阿托伐他汀	23.0	559.4	557.25
5	杂质 III	23.8	577.3	575.2
6	杂质 IV	30.4	541.4	539.2
7	杂质 VI	32.8	432.05	430.05
8	杂质 V	34.9	655.5	653.25

2.2 馏分收集

LH-40 和 FRC-40 提供根据积分结果收集、时间程序收集和手动收集三种工作模式，其中积分收集和时
间程序收集是自动化和高通量制备分离中常用的方式。在收集信号来源方面，LH-40 和 FRC-40 可以依据 UV
和 MS 信号实现收集触发，两者即可以单独使用，也可以实现逻辑关系组合方式。本节将介绍本例中分别使
用 UV 触发、MS 触发和 UV 和 MS 逻辑组合触发三种方式的参数设置及收集效果。

2.2.1 UV信号触发收集

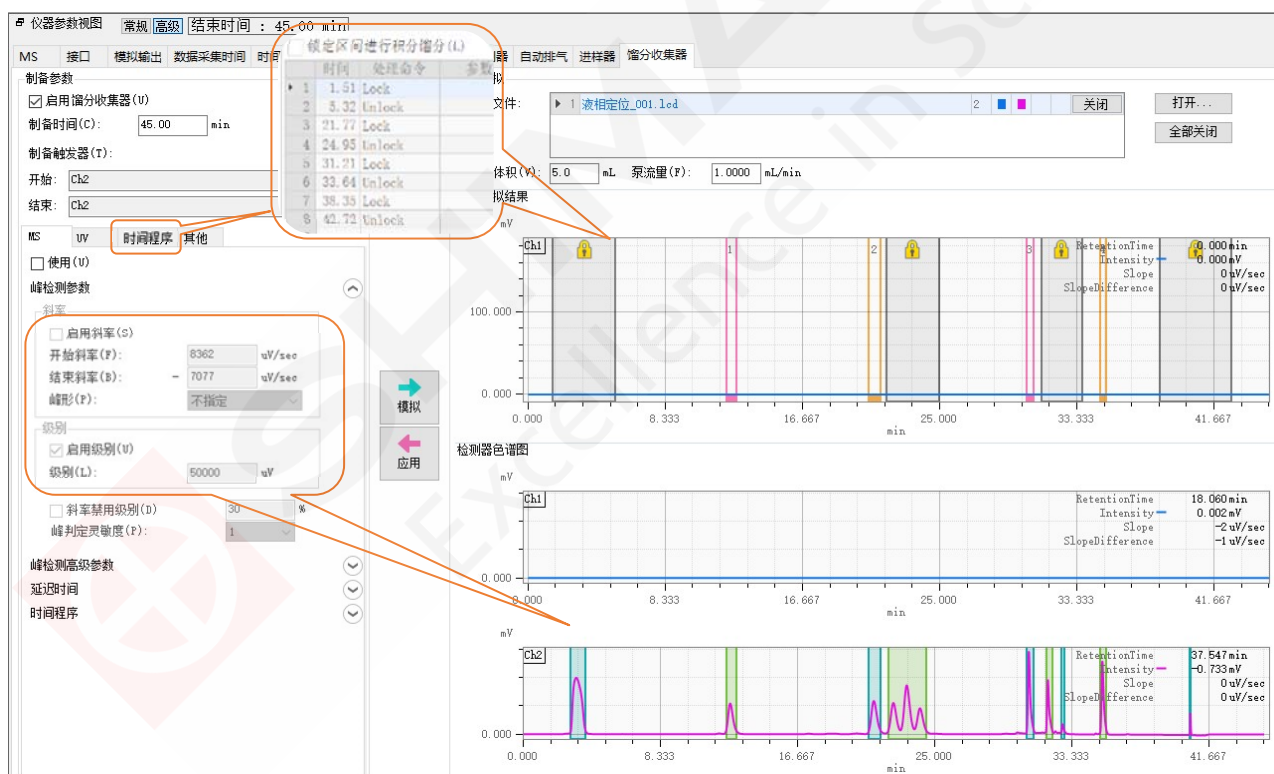


图 2 在馏分收集器参数界面设置 UV 和时间程序触发馏分收集方式

本实验中设置 CH2 为 UV 信号，峰检测参数采用“级别”后，可在“检测器色谱图”界面观察到符合
此级别的色谱峰收集效果，与此同时，设置“时间程序”对目标峰意外的色谱峰进行“锁定”过滤处理，“模
拟结果”视图中显示收集标记的即为符合收集参数的目标峰，按照上述馏分收集参数进行馏分收集，图 3
结果显示，实际的馏分收集结果与模拟馏分收集结果一致。

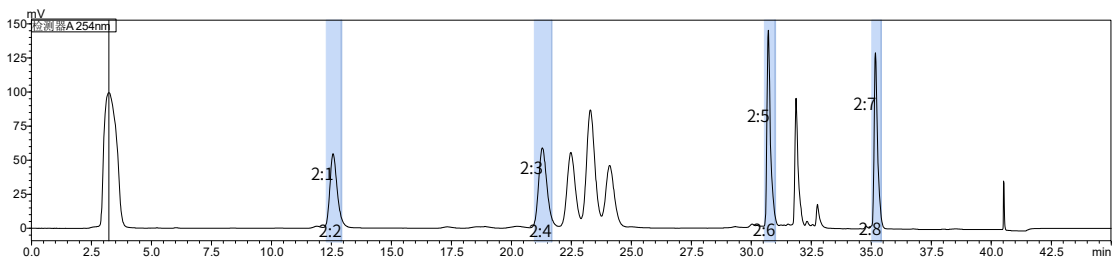


图 3. UV 触发馏分收集结果

2.2.2 MS触发馏分收集

选择Ch1，使用MS触发馏分收集，选择MS模拟信号输出m/z分别为718.20、577.20和541.20。“制备触发器”的开始和结束均选择Ch1。按照级别进行收集，级别参数设置为50000 μV ，添加了4个锁定的时间段。

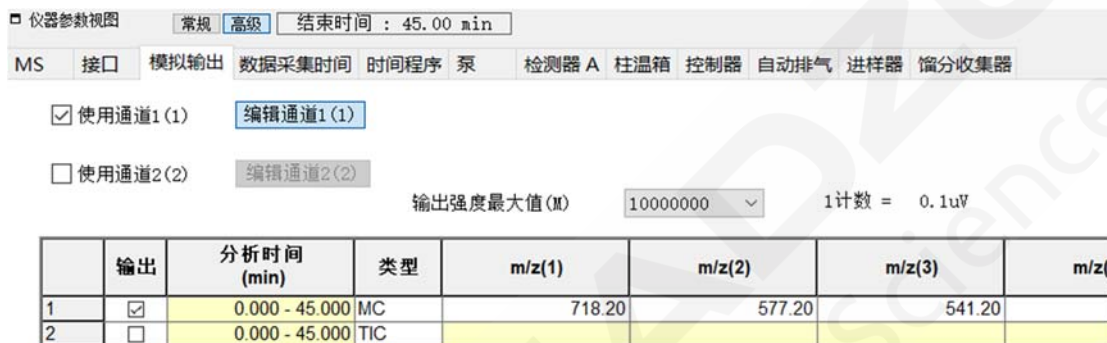


图4 采用MS触发收集时一般采用选择离子流色谱图 (MC) 来检测

按照上述馏分收集参数进行馏分收集，结果如图3所示。模拟通道1是质量数色谱图，图上仅显示了满足设定条件质量数的色谱峰。图5中标识为“杂质III”的色谱峰虽然其模拟信号满足级别要求，但由于保留时间在锁定区间内，因而未收集该馏分；根据图4所示，杂质V在的质谱图中也能提取到m/z 541，因而也对该杂质进行了馏分收集。

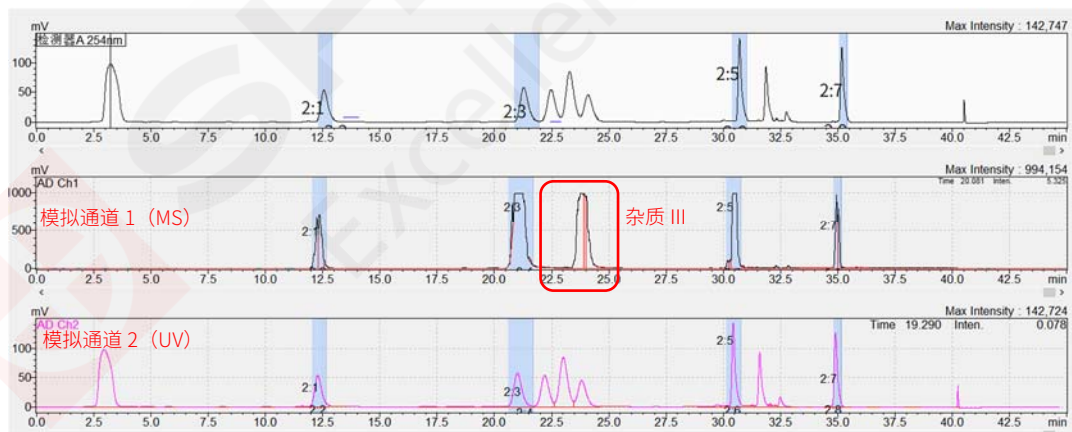


图 5. MS 触发馏分收集结果

2.2.3 UV和MS逻辑组合触发馏分收集

选择Ch1和Ch2，使用MS和UV联合触发馏分收集，选择MS模拟信号输出m/z分别为718.20、577.20和655.20。“制备触发器”的开始选择“Ch1 AND Ch2”（需要同时满足MS和UV条件），制备触发器结束选择“Ch1 OR Ch2”（MS和UV满足其中一个条件）。按照级别进行收集，Ch1级别参数设置为50000 μV ，Ch2级别参数设置为7000 μV ，添加了4个锁定的时间段。

按照上述馏分收集参数进行馏分收集，结果显示，模拟通道1（MS）有三个满足设定检测离子的明显色谱峰，保留时间在约12.5和35 min的两个物质由于同时满足MS和UV条件在模拟通道上均有信号，并且均触发了收集指令；保留时间约24的 min杂质III虽然模拟信号满足设定级别要求，但由于其保留时间在锁定区间内，因而未触发馏分。

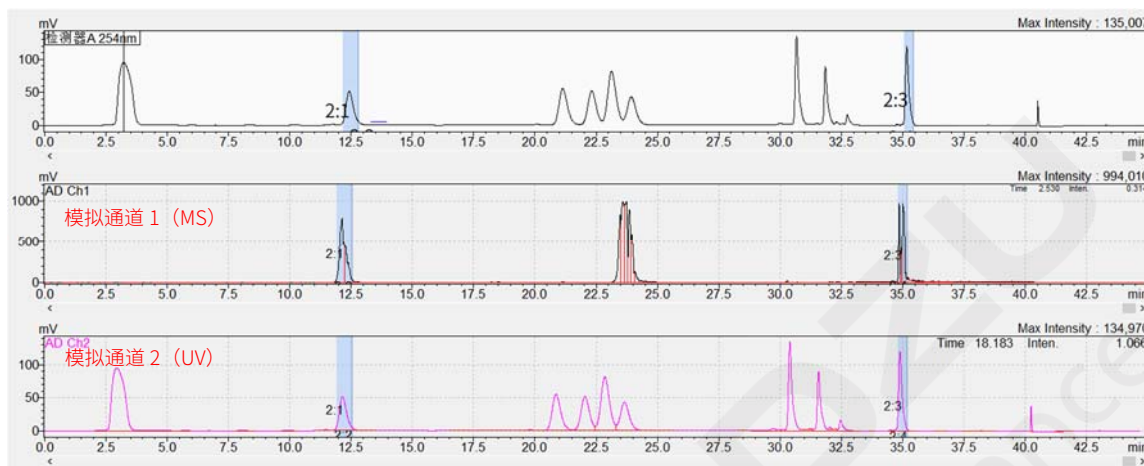


图 6. UV 和 MS 共同触发馏分收集结果

3 结论

本文采用岛津新型液体处理器 LH-40 作为进样器和馏分收集器，单四极杆质谱 LCMS-2020 作为质谱检测单元，以分离制备阿托伐他汀钙片中的有关物质为例，分别以紫外，质谱以及紫外和质谱同时触发馏分收集，详细说明了不同触发方式的参数设置以及 LH-40 的制备模拟功能，并且对不同参数设定得到的不同结果进行了说明。相对于紫外检测器引导的制备色谱而言，质谱的加入可以很好的弥补紫外检测器不足，两者相辅相成，可以使得收集结果更加的准确、收集方式更加多样化，以适用于不同性质的化合物制备需求。

PDA-ELSD 触发的制备液相系统对草药全组分制备收集

制备液相色谱法是一种从混合物中纯化目标化合物的方法。紫外检测器 (UV) 或光电二极管阵列检测器 (PDA) 是制备液相色谱仪的常用检测器。但常规检器 (如 UV/PDA) 无法检测无紫外吸收的化合物, 因此在制备纯化过程中, 难免会导致组分流失。

本文介绍了一种新的 PDA-ELSD 触发的制备液相色谱系统, 在 PDA 的基础上增加了蒸发光散射检测器 (ELSD), 可对有紫外吸收和无紫外吸收的化合物进行全面的馏分收集。

用户获益

- ◇ 可进行全组分馏分收集, 不丢失无紫外吸收组分。
- ◇ 图形用户操作界面使馏分收集设置简单、高效。
- ◇ 由于两种模式 (分析/制备) 使用同一软件控制, 因此可实现分析型液相条件向制备纯化型液相条件的平稳转化。

通过 ELSD 引导进行制备纯化的优点

普通制备液相色谱仪中使用的检测器如紫外检测器 (通用性好) 以及光电二极管阵列检测器 (PDA), 能够同时进行多个波长的测定。然而, 这些检测器无法检测无紫外吸收的化合物。示差折射率 (RI) 检测器是一种已知的不依赖紫外吸光度的通用型检测器, 但由于梯度洗脱过程中基线变化较大, 因此不适用于多种化合物的同时收集。

蒸发光散射检测器 (ELSD) 可在流动相雾化和蒸发后测定目标化合物粒子的散射光。只要目标化合物未随溶剂挥发, 无论其分子结构如何, 都能被检测到。因此, 将 ELSD 与制备 LC 相结合, 可以轻松实现对一些无紫外吸收化合物的收集。

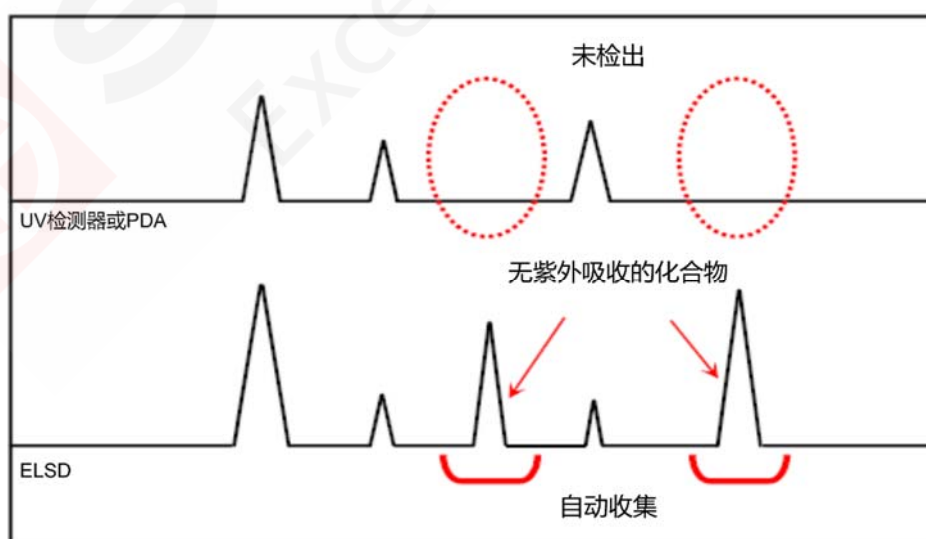


图 1 通过 ELSD 全面制备纯化

PDA-ELSD 触发的制备液相色谱法概述

图 2 为 PDA-ELSD 触发的制备液相系统流程图。该系统配备了一个分流通道，可通过 PDA 将大部分洗脱组分从制备柱分流到馏分收集器，剩余的一小部分分流到 ELSD，用于监测洗脱行为，以发送触发信号（注入的化合物在 ELSD 后不能回收，因为流动相被雾化蒸发）。因此，绝大多数目标洗脱物可被收集。

岛津 Nexera™ 制备液相色谱仪使用 LabSolutions™ 工作站进行控制，该工作站也可控制分析型液相色谱。利用该软件，可通过图形用户界面（GUI）进行模拟馏分收集，使馏分收集过程简便、高效。图 3 显示了根据实际 PDA 和 ELSD 色谱图，对目标峰进行自动馏分收集设置的过程。

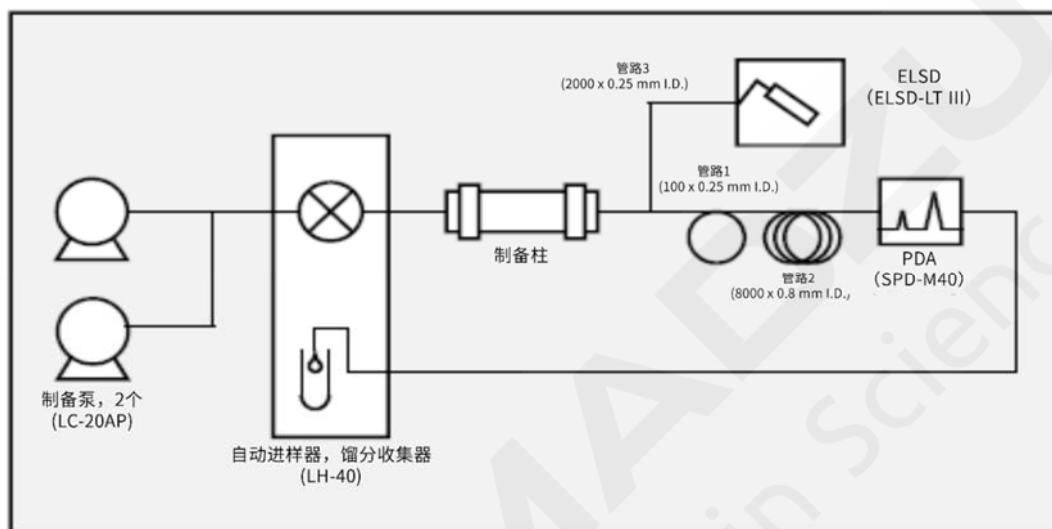


图 2 PDA-ELSD 触发的制备液相色谱的流路

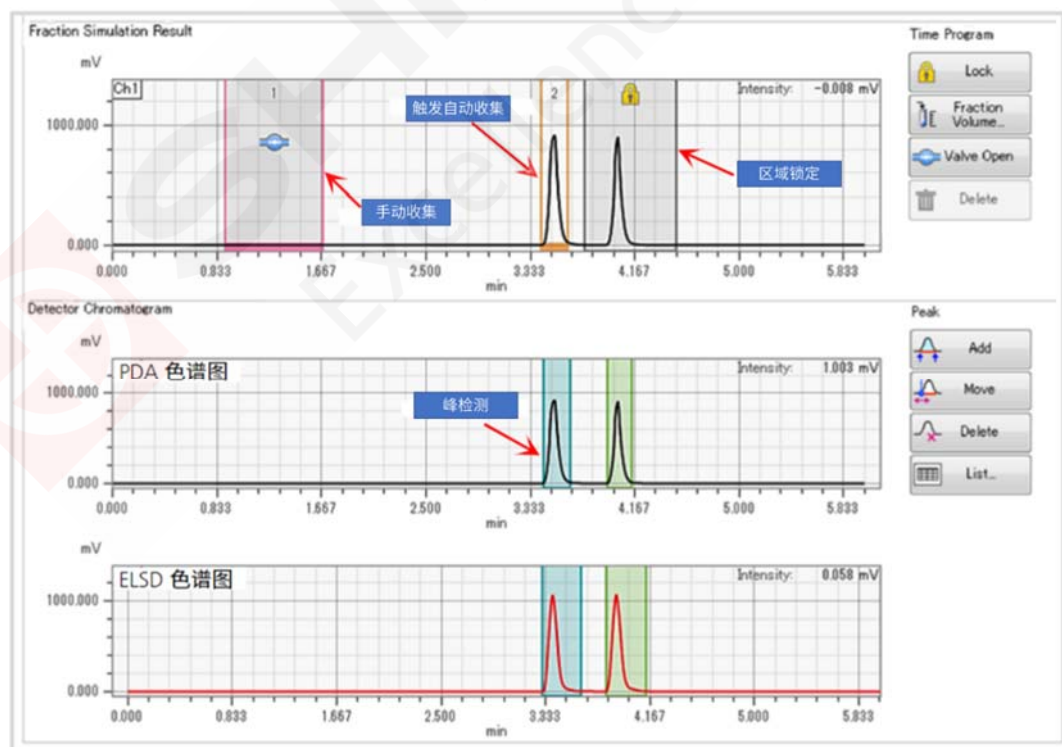


图 3 LabSolutions 目标峰自动馏分收集模拟图示

草药黄芩提取物馏分收集参数的优化

草药，一般是天然药物的泛指。大多数草药未经纯化就被使用，其含有许多药用活性成分。这些化合物的纯化和鉴定对于寻找未知药理活性化合物具有重要意义。本实验采用液相色谱法对具抗菌活性草药黄芩中的化合物的收集条件进行了优化。

图 4 显示了黄芩粉末样品的 qian 方案。表 1 显示了优化后的分析条件，图 5 显示了分析结果：可在 15 分钟内分离和洗脱样品中所含的各种化合物。

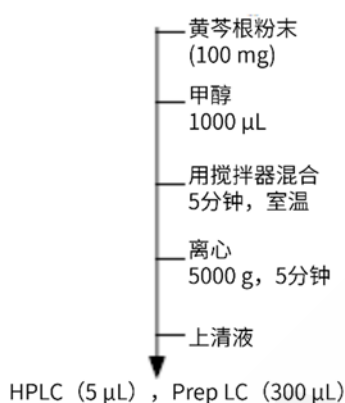


图 4 样品前处理

表 1 分析色谱条件

色谱柱	: Shim-pack™ PREP-ODS (H) 色谱柱套装 (S/N: 228-17881-91) (250 mm × 4.6 mmID, 5 μm)
流动相	: A: 水 (含 0.1% (v/v) 甲酸); B: 乙腈/四氢呋喃 (1/1, v/v)
流速	: 1 mL/min
时间程序	: B 浓度 25% (0-5 min) → 100% (10-15 min) → 20% (15.01-20 min)
柱温	: 常温
进样量	: 5 μL
检测器	: PDA; 250 nm ELSD; 漂移管=40°C, 增益=宽, 滤波=2 秒

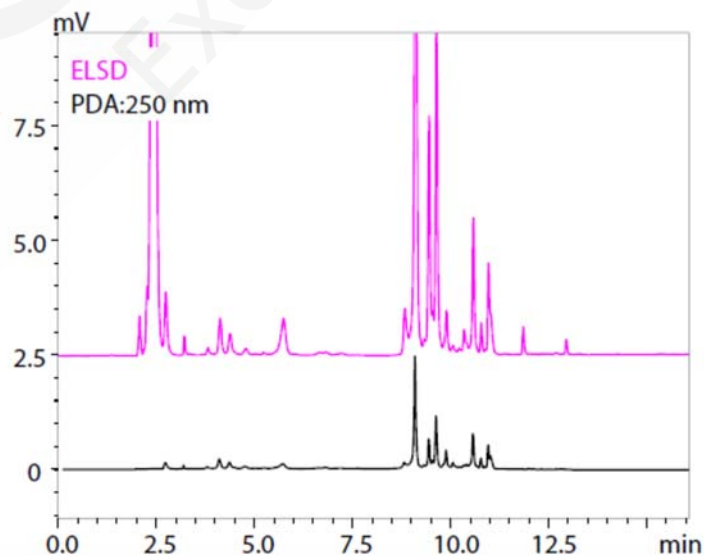


图 5 黄芩提取物分析色谱图

黄芩提取物全组分馏分收集

利用该系统,可在相应分析方法的基础上建立制备液相色谱方法,既将分析液相色谱优化的分析条件升级至 PDA-ELSD 触发的制备液相色谱条件。PREP-ODS (H) 色谱柱套装保证了仅需通过改变流速,即可完成从分析条件到制备条件的简便升级,这是缘于该套装包含相同生产批次、相同填料的分析柱和制备柱。

表 2 显示了实验中使用的制备条件,图 6 显示了馏分收集色谱图。利用自动馏分收集功能,可对无紫外吸收的如糖类、植物甾醇、以及黄芩苷(黄芩中的主要活性成分)进行收集。

表 2 制备色谱条件

色 谱 柱	: Shim-pack™ PREP-ODS (H) 色谱柱 (S/N: 228-17881-91) 250 mm × 20 mmID, 5 μm)
流 动 相	: A: 水 (含 0.1% (v:v) 甲酸); B: 乙腈/四氢呋喃 = 1:1
流 速	: 20 mL/min
时 间 程 序	: B 浓度 25% (0-5 min) → 100% (10-15 min) → 20% (15.01-20 min)
柱 温	: 常温
进 样 量	: 300 μL
检 测 器	: PDA; 250 nm (制备单元) ELSD; 漂移管=40°C, 增益=3, 滤波=3 秒

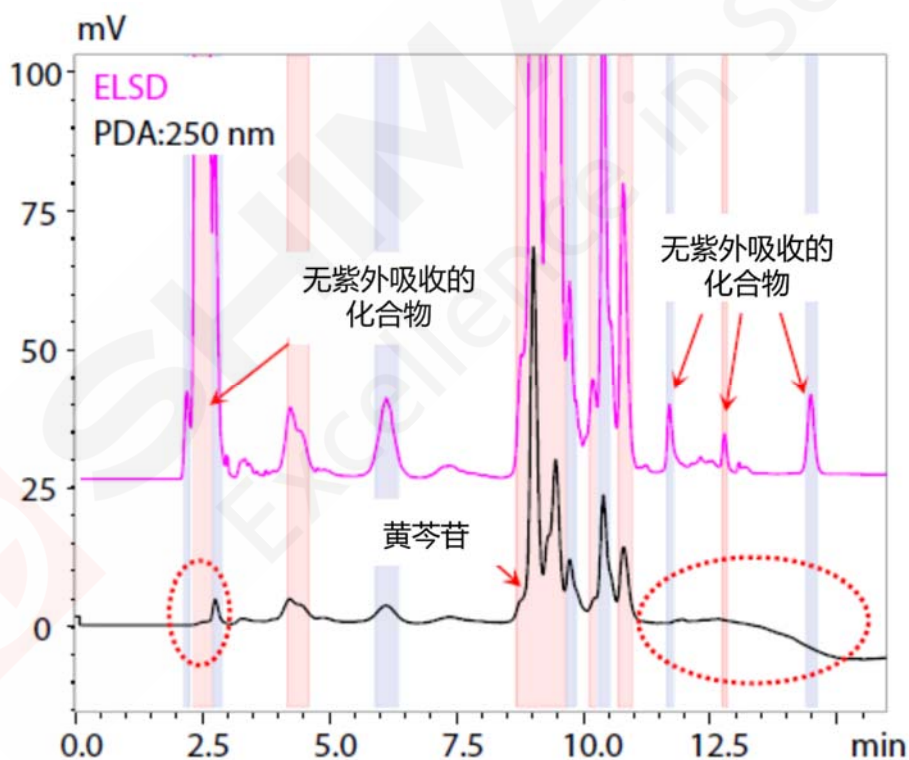


图 6 黄芩提取物收集组分成分

结论

本文介绍了同时利用分析液相和 PDA-ELSD 触发的制备液相对黄芩中全组分进行馏分收集的方法。以草药为代表的天然产物,其含有多种尚未纯化和鉴定的具有药理活性的未知成分。通过建立优化的分析液相色谱条件及使用 ELSD 进行馏分收集,该系统将非常适用于难以纯化未知化合物的发现及后续评价。

循环制备模式的应用于羟苯丙酯异构体分离

摘要：本文考察了岛津 LC-16P 半制备系统的循环制备模式在同分异构体（ISO-羟苯丙酯，N-羟苯丙酯）分离纯化中的应用。在循环制备模式下经过十一次循环后两个同分异构体的分离度从 0.589 提高到 1.783，达到了基线分离的效果。以紫外色谱图强度水平作为馏分收集触发条件，在第十一次循环时收集目标组分，对获得的目标组分以峰面积归一化法进行纯度表征，结果表明，在 254 nm 波长条件下，制得的 ISO-羟苯丙酯和 N-羟苯丙酯的纯度分别为 98.93%和 96.34%，相应的回收率分别可达 90.02%和 98.90%。

关键词：LC-16P 半制备系统 循环制备 同分异构体

羟苯丙酯是白色结晶，具有特殊气味。溶于乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂，微溶于水。主要用作食品、化妆品、医药的杀菌防腐剂抑菌剂，也用于饲料防腐剂等。

本文利用 LC-16P 的循环制备模式对羟苯丙酯的两个同分异构体（ISO-羟苯丙酯，N-羟苯丙酯）进行了制备分离，以紫外信号强度作为馏分收集触发条件，可对羟苯丙酯的同分异构体进行高效分离得到高纯度馏分。

1. 实验部分

1.1 分析仪器

本实验使用的仪器为 LC-16P 半制备系统。具体配置为：Essentia LC-16P 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，Essentia SIL-16P 自动进样器，CBM-20A 系统控制器，Essentia SPD-16 紫外检测器，FRC-10A 馏分收集器，LabSolutions Essentia Version 5.82 色谱工作站。

1.2 制备条件

色 谱 柱：Shim-pack GIS C18 (10 mm I.D. × 250 mm L., 5 μm)
流 动 相：0.1% 醋酸水溶液：乙腈 = 35：65 (v/v)
流 速：5 mL/min 进 样 量：200 μL
检 测 波 长：254 nm 工 作 模 式：循环模式制备

收集参数：

触发信号：紫外信号强度 触发类型：水平 (Level) 和斜率 (Slope)
水平阈值：2000 μV 斜率阈值：200 μV/sec
延迟体积：744 μL

1.3 样品配制

准确称取一定量 ISO-羟苯丙酯和 N-羟苯丙酯样品分别溶于甲醇溶液中，制得 10 mg/mL 的样品溶液，用 0.22 μm 滤膜过滤后，分别取 100 μL 上述溶液加入 800 μL 流动相中，混合均匀，得 1 mg/mL 的混合标样储备液，将混合标样储备液用流动相稀释一倍，得 0.5 mg/mL 的混合标样，上机循环制备分离纯化。

2. 结果与讨论

2.1 样品制备系统分离结果

图 1 为样品循环 13 次的分离结果。其中，样品第一次分离时分离度为 0.589，在第七次循环时已达到

1.487, 在第八次循环时为 1.566, 已经达到基线分离, 在第十一次循环时的分离度为 1.763。由图 2 可以看出, 随着循环次数的增加, 分离度逐渐提高, 但是随着时间推移, 循环次数增加对分离度的改善不明显, 且此时长时间循环会导致目标组分的损失, 不利于提高目标组分的回收率。综合考虑分离效果和时间成本等第十一次循环时收集馏分。

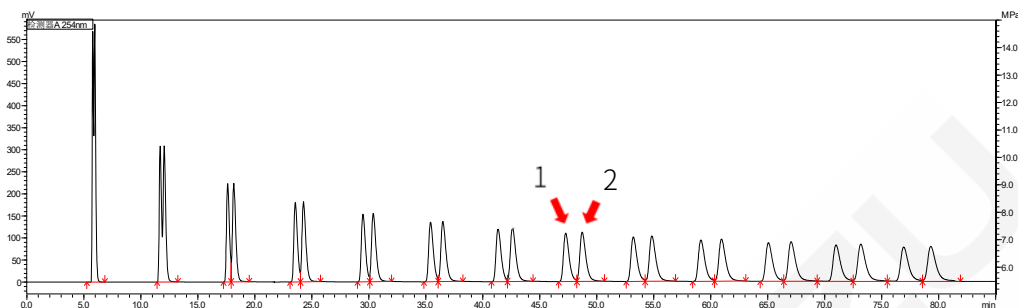


图 1 制备系统检测色谱图 (检测波长: 254 nm, 1 ISO-羟苯丙酯; 2 N-羟苯丙酯)

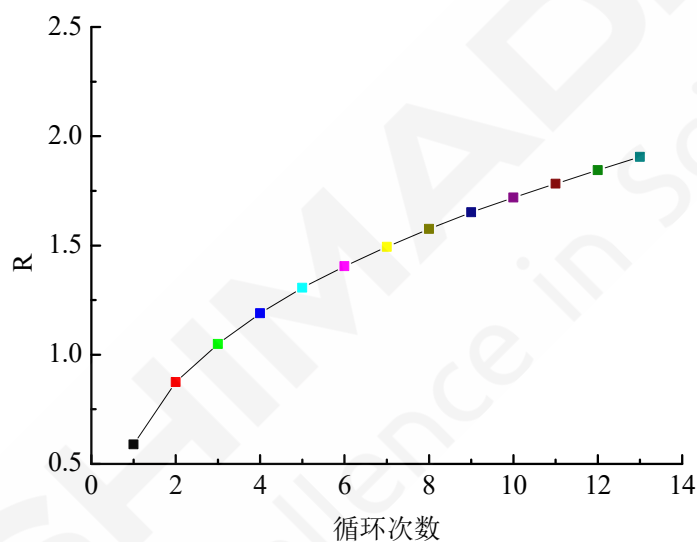


图 2 循环次数和分离度关系曲线图(以 N-羟苯丙酯为例)

采用紫外信号强度作为 ISO-羟苯丙酯及 N-羟苯丙酯馏分收集触发条件, 设置水平值为 2000 μV , 斜率为 200 $\mu\text{V}/\text{sec}$, 经制备系统分离收集馏分, 所得结果如下图 3 所示。

2.2 制备样品的纯度分析结果

采用 Nexera-i 2040 作为分析系统, 以峰面积归一化法对收集的馏分进行分析, 结果如表 1 所示, ISO-羟苯丙酯的纯度为 98.93%, 回收率为 90.02%; N-羟苯丙酯的纯度为 96.34%, 回收率为 98.90%。

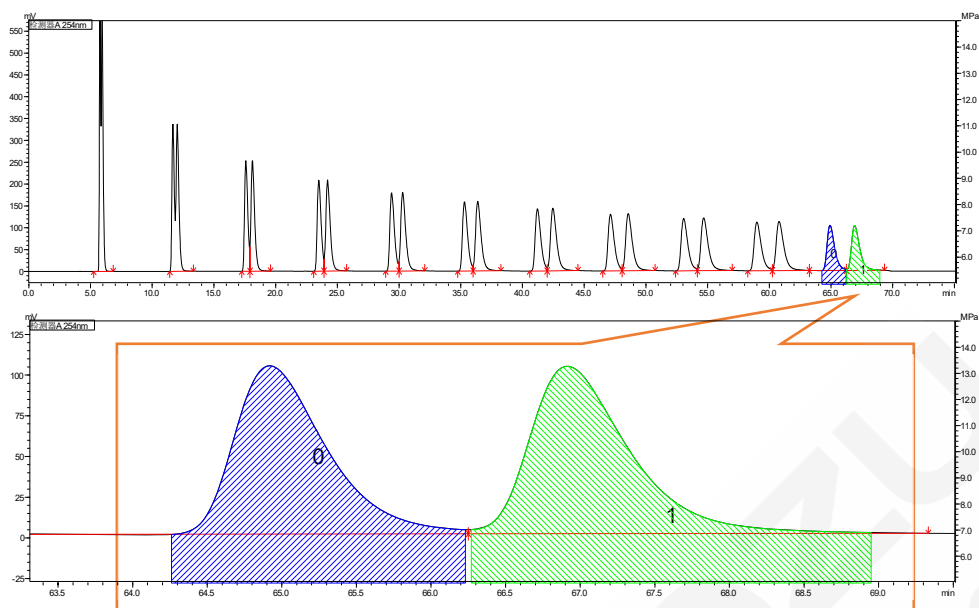


图 3 馏分收集色谱图 (0 ISO-羟苯丙酯; 1 N-羟苯丙酯)

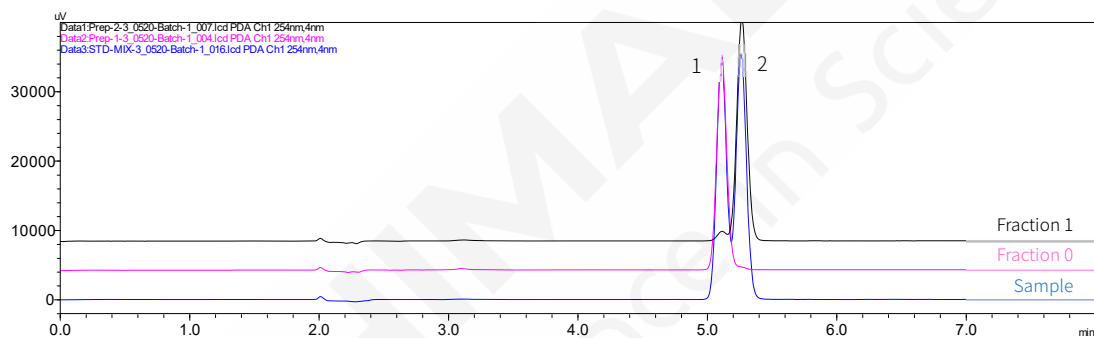


图 4 馏分纯度测试色谱图 (1 ISO-羟苯丙酯; 2 N-羟苯丙酯)

表 1 制备前后组分纯度对比及回收率

化合物	制备前纯度 (%)	制备后纯度 (%)	回收率 (%)
ISO-羟苯丙酯	50.00	98.93	90.02
N-羟苯丙酯	50.00	96.34	98.90

3. 结论

利用岛津 LC-16P 半制备液相色谱系统的循环制备模式，可实现同分异构体 ISO-羟苯丙酯和 N-羟苯丙酯的分离纯化。经分离制备的 ISO-羟苯丙酯和 N-羟苯丙酯纯度由制备前的 50.00%，50.00% 分别提高至 98.93% 和 96.34%，相应的回收率分别为 90.02% 和 98.90%。结果表明 LC-16P 半制备系统的循环制备模式可用于同分异构体等难分离组分的分离纯化。

3.4 绿色环保新概念-超临界流体制备色谱的应用

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)是一种新型的色谱分离技术,流动相以超临界流体为主要流动相,具有气体和液体的共同属性,包括分离效率高、分析速度快,压力低等特点,在药物分析、中药天然产物提取分析、食品检测等领域具有非常广阔的应用前景。

该技术概念最早始于 1962 年,以优异的分选性能使之备受追捧。近年来随着该技术相关仪器上的不断进步和革新引起了色谱分析领域的广泛关注。使用超临界流体作为溶剂,当将其从普通气体压缩为类似于液体密度的时候,提高了其与溶剂之间的分子间作用力,并且该作用力强烈依赖于流体密度,故在 SFC 中流动相的密度对分析物保留具有至关重要的作用。

在 SFC 应用中,CO₂ 由于具有化学惰性、廉价易得、可以较简单的条件进入超临界状态而使用更为广泛。CO₂ 是一种高度非极性溶剂,类似于烃类,对于极性较强的溶质,需要向流动相中加入有机改性剂(主要为醇类)。SFC 中使用的 CO₂ 大多数为食品或饮料级,在色谱分析结束时,流动相会减压并出现两相形态,一相为气态,另一相为液态。气态 CO₂ 会被排出,而液态改性剂将被收集到捕集阱中。由于大多数流动相都会蒸发,因此会大大减少废液的体积,也就意味着产生的废液毒性也较小。同时在使用中发现,在色谱柱尺寸相同的情况下 SFC 能够采用比 HPLC 更高的流速和更短的运行时间,这可以使得操作者在同一时间段内能够完成三至五倍的更多工作量,大大提高了工作效率。基于以上原因,该项技术越来越多的收到广泛关注。

同时,作为传统主流色谱技术——气相色谱和液相色谱的补充,超临界流体色谱技术的应用也越来越广泛。除在立体异构体化合物的拆分方面表现的优异性能外,在脂类化合物的分析分离、天然产物分离、药物研发和药物分析、石油产品的分离、食品分析等领域都有应用。由于 SFC 特殊分离性质所表现出来的分离选择性以及以 CO₂ 为主体的流动相带来的馏分后处理便利性,使用超临界流体尤其是 sCO₂ 的制备色谱系统得到了更多的关注。制备 SFC 系统同分析型相比,其主要组成部分和功能都可一一对应,但系统处理体积可能会有较大的不同,如分析型 SFC 一般流速在 0.5~3 mL/min,而制备型 SFC 往往会达到几十、上百甚至几千毫升每分钟的流速,由此对应的色谱柱和上样量均有不同,由此从仪器角度看,各个部件都进行了相应的放大。

制备 SFC 分离方法的开发,同制备 HPLC 是相同的模式,都经历从分析——分离——放大——规模化运行的过程。本节介绍了 5 篇使用分析-制备 SFC 系统在药物、合成化合物等领域的应用文,供读者对分析-分离协同方法开发进行了解。

Nexera UC Prep 应用于合成原料药的分析和制备

摘要：本文利用岛津 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统建立了合成原料药的分析和制备方法。以满足合成原料药快速分析和大量制备纯化的目的。重复性实验结果显示，色谱峰的保留时间 RSD% 为 0.18%，峰面积 RSD% 为 1.8%，重复性良好。Nexera UC Prep 对合成原料药的制备回收率为 80.4%。

关键词：Nexera UC Prep 合成原料药 超临界流体色谱

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)是以超临界流体为主要流动相，具有分析速度快、立体选择性好、分离效率高、溶剂消耗少特点分离技术，已成为手性药物分离和制备的研究新热点。目前，超临界 CO₂ 因其对环境良好，廉价易得，后处理简单等特点，常用作 SFC 的流动相。

本文利用岛津 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统建立了针对合成原料药的快速分析和大量制备纯化的方法，以提升分析和制备效率。

1. 实验部分

1.1 仪器

Nexera LC-40 液相色谱系统。具体配置为 LC-40BXR (输液泵)， DGU-403 (在线脱气机)， SIL-40C XR (自动进样器)， CTO-40C (柱温箱)， SPD-40V (紫外检测器)， LabSolutions Ver. 5.98 (色谱工作站)。

Nexera UC 超临界流体色谱分析系统。具体配置为 LC-30AD SF (CO₂ 输液泵)， LC-30AD (改性剂输液泵)， SIL-30AC (自动进样器)， CTO-20AC (柱温箱)， SPD-M20A (二极管阵列检测器)， SFC-30A (背压调节器)， CBM-20A (控制器)， LabSolutions Ver. 5.98 (色谱工作站)。

Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统。具体配置为 LC-40P SF (CO₂ 输液泵)， LC-20AP (改性剂输液泵)， FRS-40 (自动进样器和馏分收集器)， CTO-40C (柱温箱)， SPD-M40 (二极管阵列检测器)， SFC-40P (背压调节器)， HEX-40 (热交换器)， CBM-40 (控制器)， LabSolutions Ver. 5.98 (色谱工作站)。



图 1. Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

1.2 分析条件

HPLC 色谱条件：

色 谱 柱	: Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm) P/N: 5020-01731, 岛津 (上海) 实验器材有限公司		
流 动 相	: A 相-超纯水; B 相-乙腈	流 速	: 1.5 mL/min
柱 温	: 50°C	进 样 量	: 10 μL
洗 脱 方 式	: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。		

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0	Pump	B.Conc	5
10	Pump	B.Conc	95
12	Pump	B.Conc	95
13	Pump	B.Conc	5
15	Controller	Stop	

Nexera UC 色谱条件:

色 谱 柱 : Nexera UC Chiral CC4 (150 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
P/N: 220-91625-11, 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流 动 相 : A 相-scCO₂; B 相-乙醇

流 速 : 3.0mL/min B P R 压 力: 10 MPa

柱 温 : 40°C B P R 温 度: 50°C

进 样 量 : 1 μL 洗 脱 程 序: 等度洗脱, 25% B 相

Nexera UC Prep 色谱条件:

色 谱 柱 : Nexera UC Chiral CC4 (250 mm × 20 mm I.D., 5 μm)
P/N: 220-97337-24, 岛津 (上海) 实验器材有限公司

流 动 相 : A 相-scCO₂; B 相-乙醇

流 速 : 94.5mL/min B P R 压 力: 10 MPa

柱 温 : 40°C B P R 温 度: 50°C

进 样 量 : 500 μL 洗 脱 程 序: 等度洗脱, 25% B 相

1.3 样品前处理方法

样品储备液: 准确称取 1.3 g 合成原料药样品, 直接吸取 5 mL 异丙醇, 溶解样品, 作为样品储备液。

HPLC 系统样品测试液: 吸取 1 mL 样品储备液, 用异丙醇稀释至 1 mg/mL, 进样 10 μL。

Nexera UC 系统样品测试液: 吸取 1 mL 样品储备液, 用异丙醇稀释并定容至 10 mL, 进样 1 μL。

Nexera UC Prep 系统样品测试液: 吸取 3 mL 样品储备液, 用异丙醇稀释并定容至 10 mL, 进样 500 μL。

2. 结果与讨论

2.1 合成原料药 HPLC 色谱图

按照 1.3 配制成 1 mg/mL 的合成原料药溶液, 上机分析, 所得 HPLC 色谱图如图 2 所示, 主峰 1 和杂

质峰 2 分离度良好，色谱峰 1 出峰时间约为 9 min。

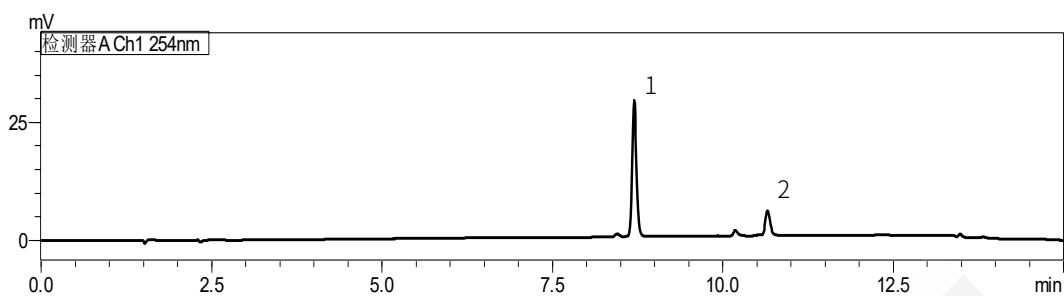


图 2. 合成原料药 HPLC 色谱图

2.2 合成原料药 Nexera UC 测试色谱图

Nexera UC 系统样品测试液所得 SFC 色谱图如图 3 所示，主峰 1 和杂质峰 2 分离度良好，且分析结果显示与 HPLC 分离情况匹配，主要色谱峰面积比见表 2，并确证了目标色谱峰在 SFC 分析色谱图中的出峰位置。色谱峰 1 出峰时间约为 3.5min，较 HPLC 分析，SFC 在保证良好分离度基础上，出峰时间提前，达到快速分析目的，提升分析效率。

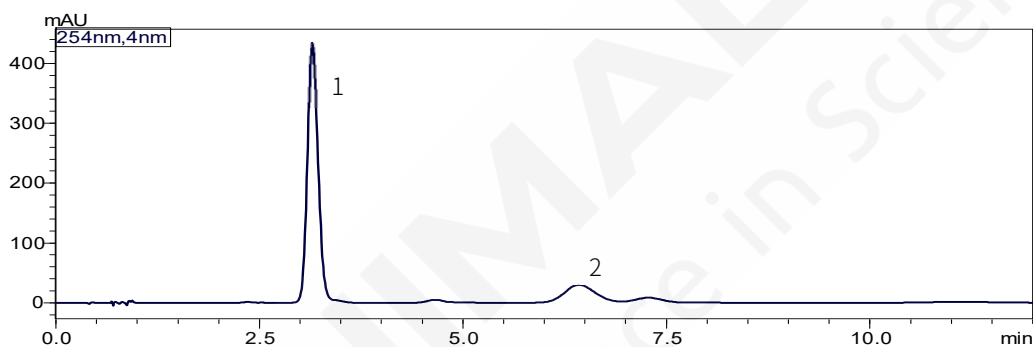


图 3. 合成原料药 SFC 色谱图

表 2. 主要色谱峰面积比

Peak	SFC	HPLC
1	74.43%	74.33%
2	16.15%	16.22%

2.3 合成原料药 Nexera UC Prep 测试色谱图

通过 SFC 和 SFC Prep 色谱柱横截面积，计算 SFC Prep 流速为 56.7 mL/min，并根据色谱柱柱长差异，调整流速为 94.5 mL/min，且进样量设为 500 uL。Nexera UC Prep 系统样品测试液所得 SFC Prep 色谱图如图 4 所示，主峰 1 和杂质峰 2 分离度良好，分析结果显示与 SFC 分离情况一致，主要色谱峰面积比见表 3。SFC Prep 在快速分析的情况下，流速和进样量大幅增大，可以满足合成原料药大规模制备纯化要求，快速分析的同时，大量制备纯化。

表 3. 主要色谱峰面积比

Peak	SFC Prep	SFC
1	75.85%	74.43%
2	16.18%	16.15%

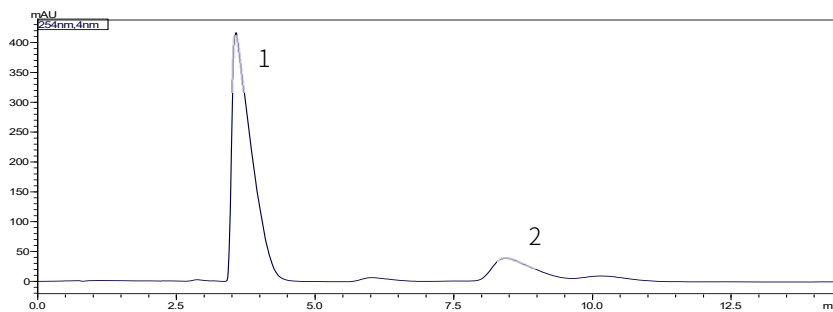


图 4. 合成原料药 SFC Prep 色谱图

2.4 Nexera UC Prep 测试重复性考察

Nexera UC Prep 测试重复性结果如下表 4 所示。色谱峰 1 和色谱峰 2 的保留时间 RSD% 分别为 0.21% 和 0.36%，峰面积 RSD% 分别为 1.8% 和 3.6%，重复性良好。

表 4. UC Prep 重复性测试 (n=6)

名称	Peak1		Peak2	
	R.T.	Area	R.T.	Area
1	3.57	10208069	8.36	2167231
2	3.56	10301560	8.33	2062976
3	3.57	9954299	8.4	2018029
4	3.58	10409134	8.33	2116172
5	3.57	10398221	8.39	2212913
6	3.56	10052700	8.38	2037156
AVG	3.57	10220663	8.37	2102412
RSD/%	0.21	1.8	0.36	3.6

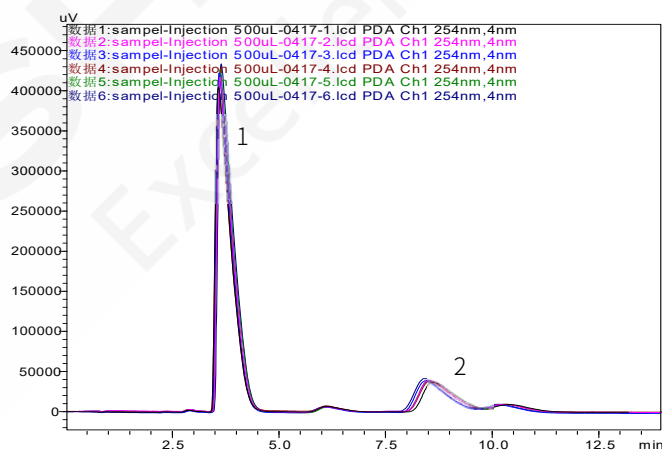


图 5. SFC Prep 重复性测试色谱图

2.5 Nexera UC Prep 制备回收率

针对主峰 1 进行制备回收率考察，结果如下表 5 所示，制备回收率为 80.4%，且纯度合格，满足要求。

表 5. 主峰 1 回收率

	Area	Recovery	Average
Initial	299715	/	/
Fraction	240804	80.3%	80.4%
	241222	80.5%	

注: $\text{Recovery} = \text{Fraction Area} / \text{Initial Area} * 100\%$

Initial: 取 500 μL Nexera UC Prep 系统样品测试溶液, 定容至 10 mL, 进样 1 μL

Fraction: 色谱峰 1 馏分定容至 10 mL, 进样 1 μL

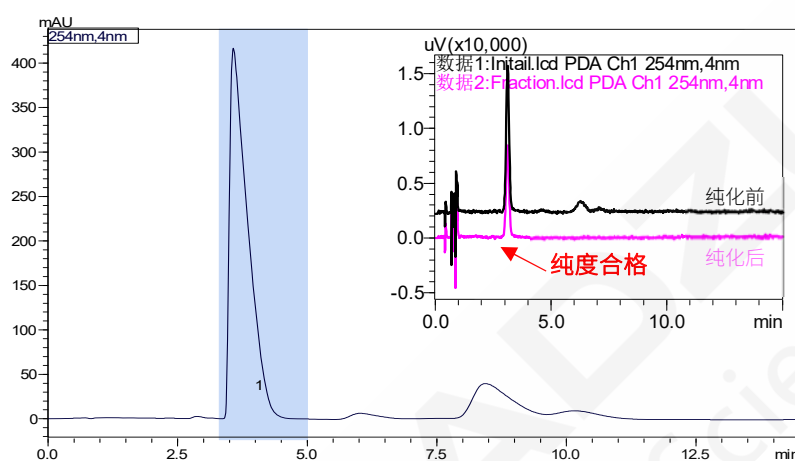


图 6. 主峰 1 SFC 制备收集色谱图

3. 结论

本文采用岛津 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统, 建立了针对合成原料药的快速分析和大规模制备纯化的方法。重复性实验结果显示, 色谱峰的保留时间 RSD% 为 0.18%, 峰面积 RSD% 为 1.8%, 重复性良好。Nexera UC Prep 对合成原料药的制备回收率为 80.4%, 且纯度合格。相较于 HPLC 常规分析, SFC 具有分析速度快特点, 在保证良好分离度情况下, Prep-SFC 增大流速和进样量, 大大提升分析和制备效率, 以满足合成原料药大规模制备纯化的目的。

重叠进样功能在手性化合物拆分与纯化中的应用

摘要：本文简述利用 Nexera UC 和 UC Prep 开发超临界流体色谱制备方法的过程，介绍了重叠进样方式在手性化合物拆分制备系统中的应用方式。实际案例结果比对，使用重叠进样方式分离效率较传统提升 2.3 倍，时间和试剂的消耗量在相同制备量下减少 134%，可显著提升工作效率。11 次重叠进样过程中，各主要色谱峰对应的峰面积和面积/峰高比的 RSD 在 5.5%以内，保留时间差 RSD 在 0.6%以内，各峰峰宽和分离度变化在 7%以内，体现出良好的系统稳定性。

关键词：Nexera UC Prep 手性化合物 超临界流体色谱

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)尤其是以超临界 CO₂为主要流动相的分析分离体系，因具有分析速度快、立体选择性好、分离效率高、溶剂消耗少，并且具有环境友好、廉价易得、馏分后处理简单等特点，在包括手性药物在内的光学异构体分析和拆分中具有重要作用。

本文简述了利用 Nexera UC 和 UC Prep 开发超临界流体色谱制备方法的过程，并着重就重叠进样制备方式进行介绍，在所举案例中使用重叠进样方式分离效率较传统提升 2.3 倍。

1. 手性化合物的色谱分离

手性化合物拆分是手性化合物研究中重要的组成部分，常见的手性化合物拆分方法包括动力学拆分法、结晶法、化学拆分法、生物拆分法及色谱分离法等。这其中以色谱分离法最为常见。手性色谱分离方法有薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、毛细管电泳法及超临界流体色谱法（SFC）等。SFC 具有分离速度快、分离效率高、有机溶剂消耗少、馏分后处理简单等特点，越来越多在现在的手性化合物分离分析中得到应用。同时二氧化碳具有价廉易得、无毒低活性等特点，让以二氧化碳为主要流动相的 SFC 在手性化合物拆分领域得到更多的应用。

同分析型 SFC 相比，制备型 SFC 不仅是所有色谱组件进行了相应的放大，最主要的区别在于分离规模和目的的不同，表现在固定相、时间和原料的最大化利用。当需要多次进样来处理某个样品时，常常使用重叠进样方式来实现，利用 SFC 等度分离过程中，完成前一次运行之前注入第二次样品溶液的方法使生产量和生产率最大化。本例通过手性化合物的制备分离演示了重叠进样的优势。

2. 仪器与配置

Nexera UC 超临界流体色谱分析系统

CO ₂ 输送泵	: LC-30AD SF	改性剂输液泵	: LC-30AD
自动进样器	: SIL-30AC	柱温箱	: CTO-20AC
背压调节器	: SFC-30A	检测器	: SPD-M20A
控制器	: CBM-20A	色谱工作站	: LabSolutions Ver. 5.98

Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统

CO ₂ 输送泵	: LC-40P SF	改性剂输液泵	: LC-20AP
热交换器	: HEX-40	补偿泵	: LC-20AR

背压调节器 : SFC-40P
控制器 : CBM-40
自动进样及 : FRS-40
馏分收集器

柱温箱 : CTO-40C
检测器 : SPD-M40
色谱工作站 : LabSolutions V. 5.98
PrepSolution V.1.0



图 1. Nexera UC 手性筛选系统和 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

3. 结果与讨论

3.1 拆分条件的探索

超临界流体色谱方式进行手性化合物拆分，成功与否极大程度上取决于所采用的色谱柱填料类型。虽然改性剂类型、添加剂、超临界流体温度和压力等因素对拆分效果也有作用，但相比于色谱柱的贡献较为薄弱。因此，适合填料的色谱柱类型筛选工作效率提升对于后期手性样品拆分成功具有事半功倍的作用。

Method Scouting 系统是专门用于自动化进行拆分条件筛选的 SFC 分析系统。通过专用软件控制自动化进行多个待用色谱柱切换和批量进样分析，可 24 小时不间断实现样品分离条件的筛选，为之后使用 UC Prep 规模放大进行纯化操作时提供色谱柱使用方案。

本例中所分析合成化合物具有两个手性中心，因此合成产物有四个异构体，相较于一般单手性中心化合物分离有一定的难度。采用 Method Scouting 进行方法筛选后，确定使用 CHIRALPAK IB 色谱柱作为下一步手性拆分纯化使用。

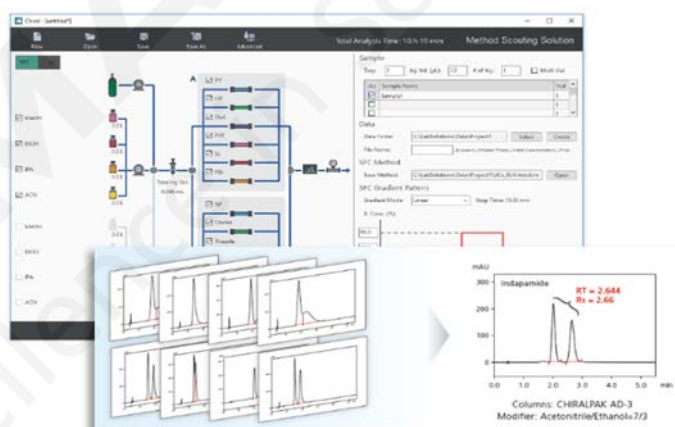


图 2. Method Scouting 系统用于手性拆分条件筛选

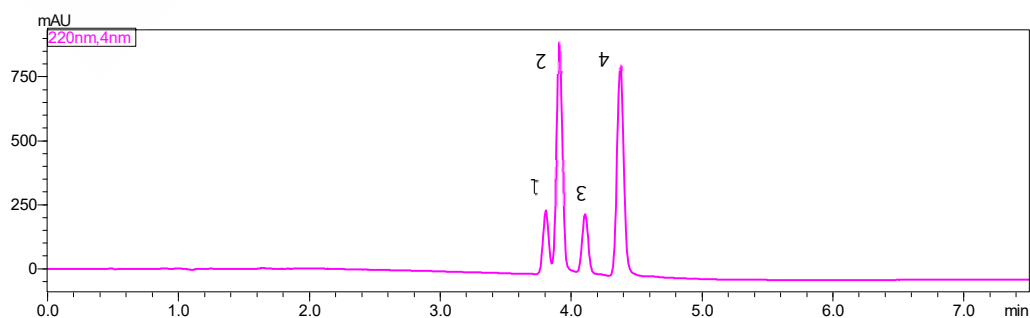


图 3. 合成化合物 SFC 分析色谱图显示具有明显 4 个异构体色谱峰

Nexera UC 色谱条件:

色 谱 柱 : CHIRALPAK® IB/SFC 100mm×4.6mm I.D., 5 μm
流 动 相 : A相-scCO₂ B相-甲醇 流 速: 2.5 mL/min
BPR 压力 : 10 MPa B P R 温 度: 50°C
柱 温 : 40°C 进 样 量: 2 μL
洗脱程序 : 0-1min(10%B)-4.5-7min(40%B)-7.01-8min(10min)

3.2 手性拆分和重叠进样

根据拆分结果提示,选择如下色谱柱和改性剂体系,对样品进行拆分纯化。单次进样 700 μL,在 8 min 内实现目标物的分离。由于制备型色谱柱柱效较分析型低,1#和 2#异构体色谱峰未能完全分离,做合并收集处理;2#、3#与 4#色谱峰之间呈基线分离态势,予以分别收集。

Nexera UC Prep 色谱条件:

色 谱 柱 : CHIRALPAK® IB/SFC 250 mm × 20 mm I.D., 5 μm
流 动 相 : A相-scCO₂ B相-甲醇 流 速: 40 mL/min
BPR 压力 : 10 MPa B P R 温 度: 50°C
柱 温 : 40°C 进 样 量: 700 μL
洗脱程序 : 等度洗脱, 32% B相 补 偿 流 速: 2 mL/min

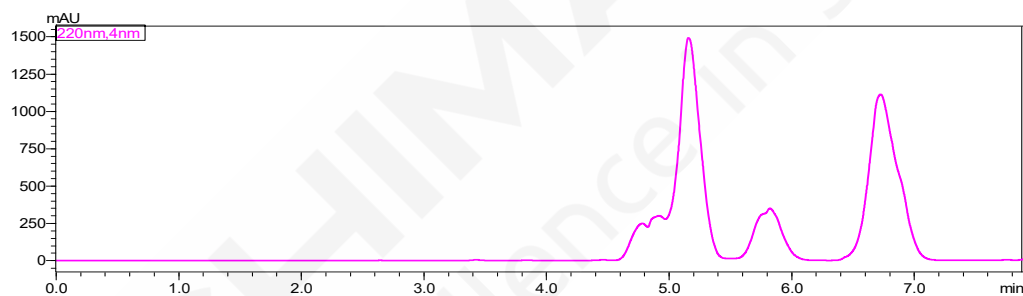


图 4. 手性化合物拆分制备条件探索

在 LabSolutions 工作站“实时分析”窗口-“方法参数”界面-“进样器”页面下,可以通过简单设置完成重叠进样功能的开启。

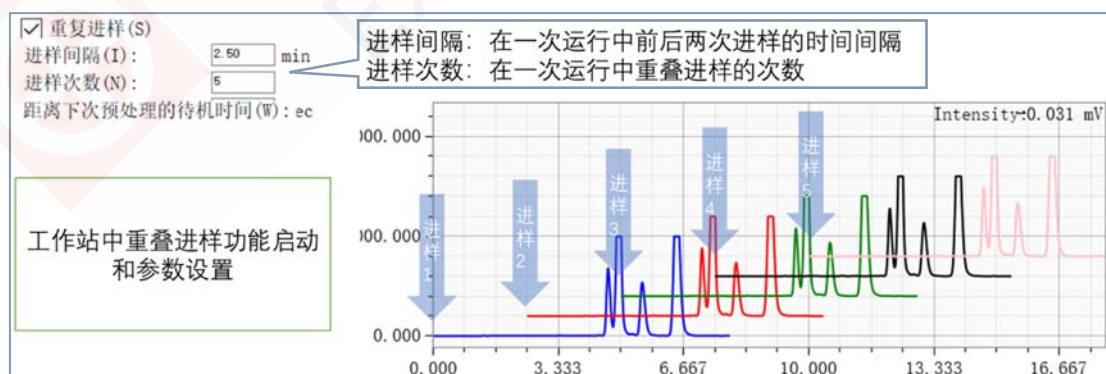


图 5. 在 LabSolutions 中开启重叠进样模式并进行收集条件模拟

通过如图 5 软件界面设置相关参数后,UC Prep 实现重叠进样方式。针对该样品有效连续进样 11 次,耗时 40 min,而传统批处理连续进样方式在相同时间内尚不能完成进样 5 次。

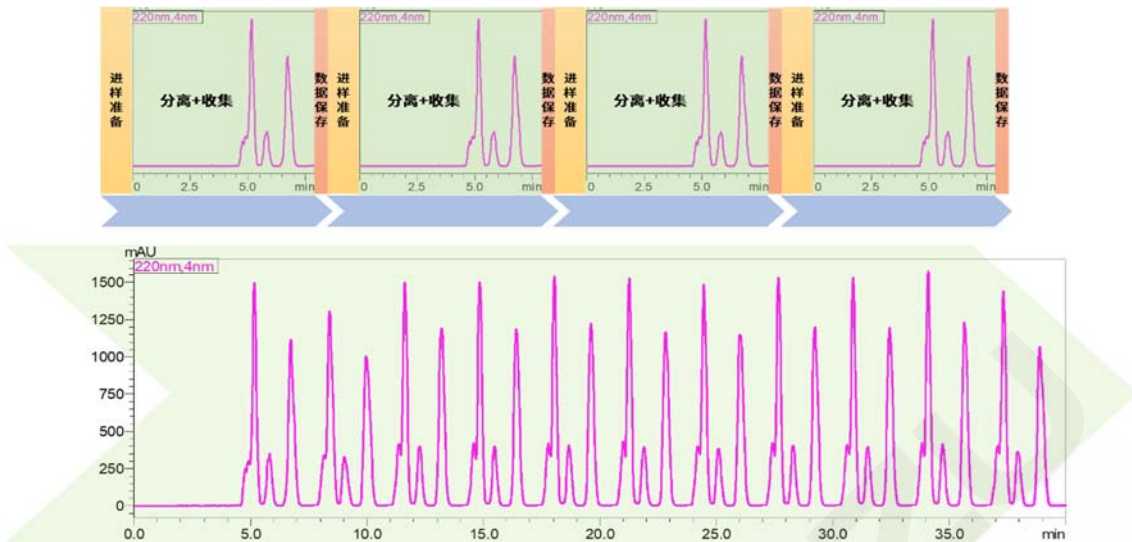


图 6. 相同时间内常规进样方式和重叠进样方式下工作效率比较

通过对重叠进样结果进行分析，对比每次分离中 1#2#、3#和 4#色谱峰的峰面积 (A) 及面积-峰高比 (A/H)，结果显示连续 11 次重叠进样分离过程中，色谱峰面积(A)及面积-峰高比(A/H)保持良好的重复性，相对标准偏差在 2.2%-2.4%及 4.7%~5.5%之间，各峰对应保留时间差在 0.4~0.6%之间，各峰峰宽(5%峰高)变化不超过 5%，分离度(USP)变化控制在 7%以内，体现该系统在此样品的分离整个过程中具有较强稳定性。

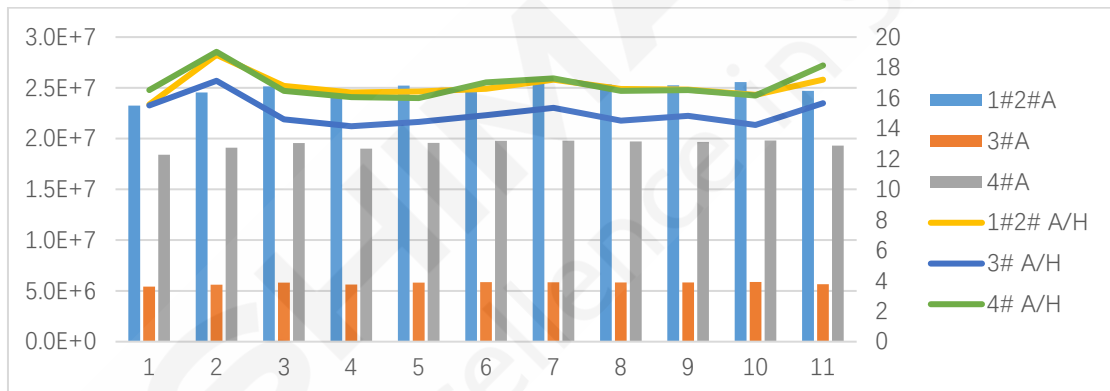


图 7. 收集馏分峰面积和面积/峰高重复性结果

表 1. 异构体拆分重叠进样 11 次的色谱行为

色谱峰	保留时间差*		峰宽(5%峰高)		分离度(USP)	
	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%
1#2#	3.2165	0.4	0.7	3.2	4.1	5.6
3#	3.2115	0.5	0.5	4.7	1.7	6.8
4#	3.2157	0.6	0.5	4.9	2.3	6.5

保留时间差*: 重叠进样分离过程中，同一化合物在相邻两次分离产生的色谱峰保留时间差

3.3 拆分结果确认

对收集到的主要馏分进行SFC分析测试，3#和4#馏分纯度分别为93.0%和99.1%；同时对两色谱峰进行峰纯度测试，未检测到未分离杂质。

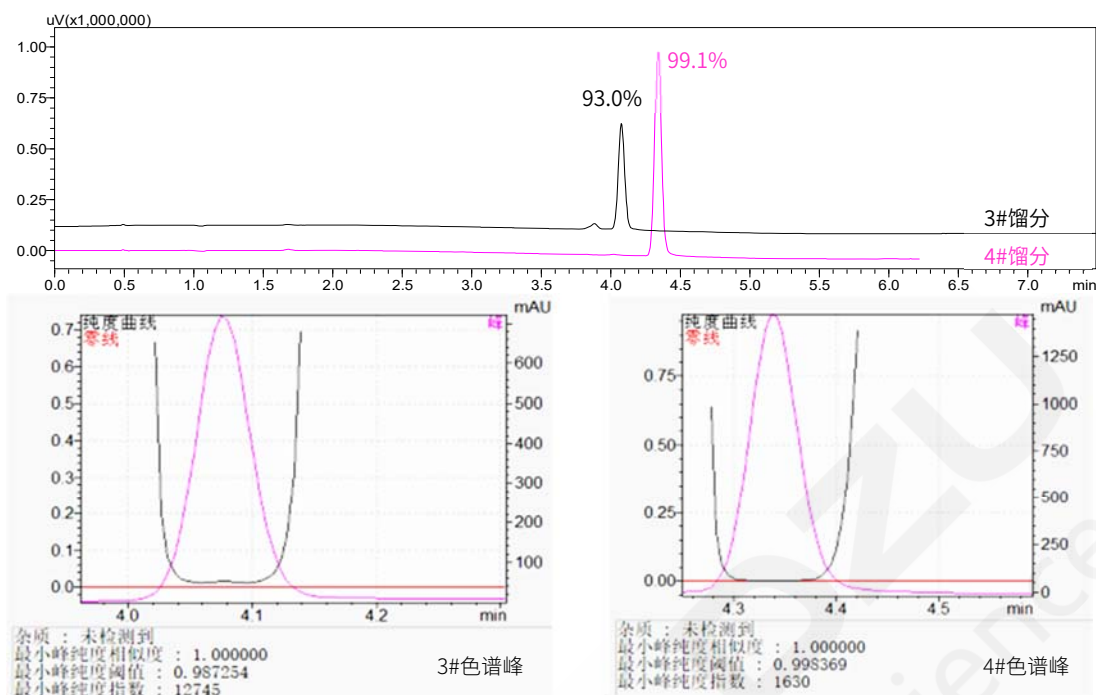


图 8. 3#和 4#色谱峰馏分纯度测试及色谱峰纯度测试

3.4 工作效率提升

同传统单次进样方式相比,采用重叠进样方式,最大程度实现了色谱系统连续不间断工作的效率。以本实验为例,计算单针处理和重叠进样方式处理结果,后者在单位时间内样品制备能力较前者提升 2.3 倍,完成同样样品制备量时,总耗时和试剂(包括 CO₂ 和有机溶剂)后者均减少 134%,同时整体上进一步降低系统使用日常费用。



图 9. 单针进样方式和重叠进样方式的费效比

4. 结论

超临界流体色谱由于其分离柱效高、分离速度快的特点,结合手性填料色谱柱对于手性化合物的拆分有高分离度和高选择性的优势;同时采用 CO₂ 作为主要流动相成分的超临界流体色谱,在制备后馏分溶剂回收和处理方面较反相或正相色谱具有便捷高效的特点。在制备 SFC 使用中,重叠进样模式的使用提升分离效率,降低日常溶剂使用费用,是手性化合物拆分纯化的理想手段。

重叠进样和峰纯度检测功能在旋光异构化合物分离中的应用

由于具有不同的生理学特性，在医药生产过程中，对于旋光异构化合物的分析，变得越来越重要，SFC 由于其特有的类似正相色谱的属性，以及手性色谱柱填料的快速发展，越来越多的替代现有的正相色谱法进行分离。制备型 SFC 在分析型基础上进行规模放大，相比传统制备液相色谱，制备 SFC 最终在 CO₂ 释放后，样品溶解在有机相中，有利于后期的样品的浓缩干燥，可极大提高处理效率。

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)是一种新型的色谱分离技术，流动相以超临界 CO₂ 为主要流动相，具有气体和液体的共同属性，包括分离效率高、分析速度快，压力低等特点，在药物分析、中药天然产物提取分析、食品检测等领域具有非常广阔的应用前景。

本文利用 Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统，完成旋光异构化合物制备的过程，并着重对其重叠进样、纯度检测等功能进行介绍，对重叠进样的结果进行了多维度评价，验证其结果的稳定性及高效率。

1. 仪器与配置

Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统

CO ₂ 输送泵	: LC-40P SF	改性剂输液泵	: LC-20AP
热交换器	: HEX-40	补偿泵	: LC-20AR
背压调节器	: SFC-40P	柱温箱	: CTO-40C
控制器	: CBM-40	检测器	: SPD-M40
自动进样及馏分收集器	: FRS-40	色谱工作站	: LabSolutions V. 5.98 PrepSolution V.1.0

Nexera UC Prep 色谱条件:

色谱柱	: CHIRALPAK® IH/SFC 250 mm × 20 mm I.D., 5 μm	流速	: 40 mL/min
流动相	: A 相-scCO ₂ ; B 相-0.1%二乙胺甲醇	B P R 温度	: 50°C
B P R 压力	: 10 MPa	进样量	: 1000 μL
柱温	: 40°C	补偿流速	: 2 mL/min
洗脱程序	: 等度洗脱, 25% B 相		



图 1. Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

2. 结果与讨论

2.1 拆分条件的放大

超临界流体色谱方法优化中，改性剂、色谱柱、背压、温度等因素都会影响色谱分离。其中色谱柱填料

和改性剂影响较大，为获得合适的色谱分离条件，常需对色谱分离中的色谱柱和改性剂比例进行优化，筛选合适的色谱条件。本文基于前期的使用 Method Scouting 分析型 SFC 手性色谱柱类型和改性剂比例的优化结果，进行制备 SFC 的放大分析，其中色谱柱选用 CHIRALPAK IB，25%甲醇作为改性剂进行最终分离，制备色谱图如下图 2 所示

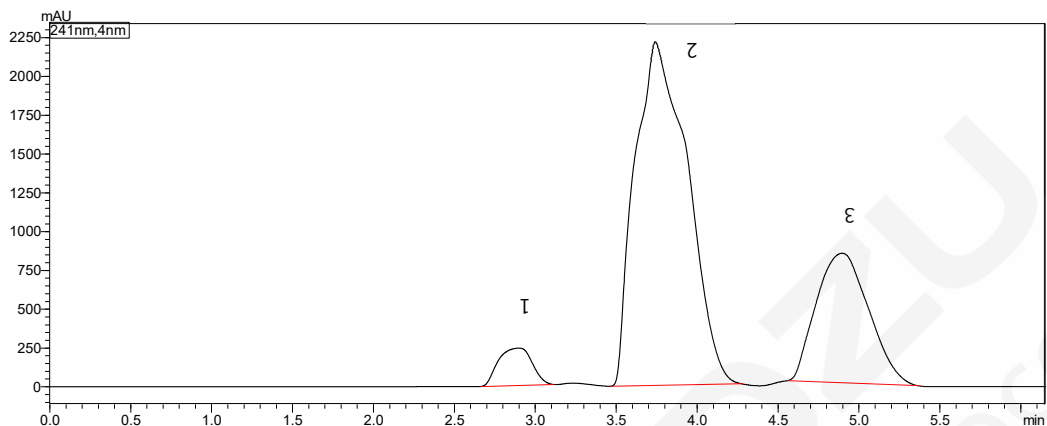


图 2. 合成化合物 SFC 分析色谱图显示具有明显 3 个旋光异构体色谱峰

2.2 自动创建制备参数

LabSolutions 软件自带的基于色谱图自动创建制备参数如下图，第一步选中所需要收集的色谱峰；第二步点击应用，自动生成收集参数；第三步应用模拟收集的色谱峰情况，具体如图 3 所示。

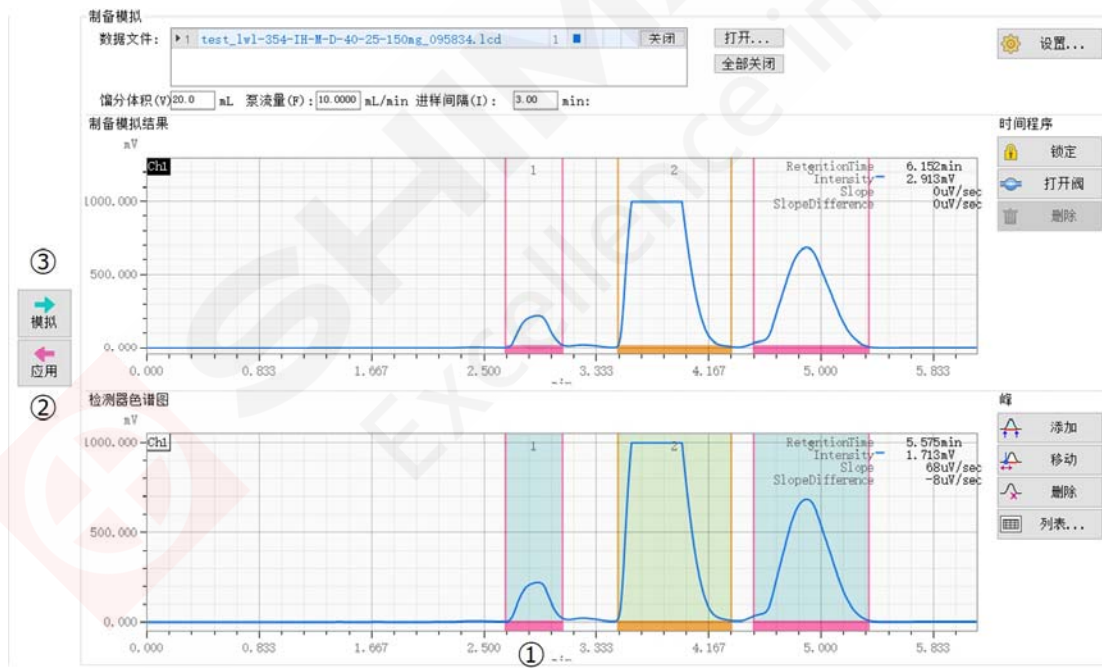


图 3 LabSolutions 制备收集参数自动创建流程

2.3 色谱峰制备收集和峰纯度检测

根据 2.1 结果提示，单次进样 1000 μL ，在 6 min 内实现目标物的分离。峰 1、峰 2 与峰 3 色谱峰之间分离度良好，分别进行收集。

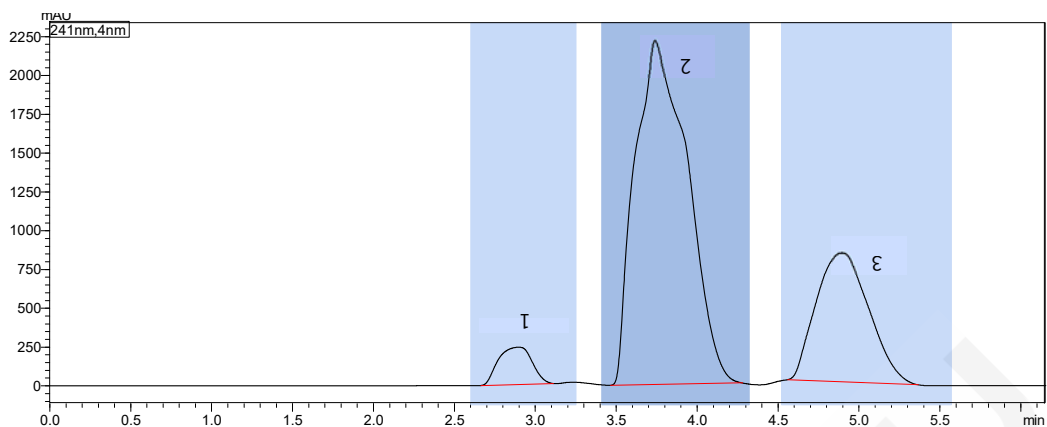


图4 旋光异构体化合物拆分制备条件探索

对收集到的主要馏分进行使用 PDA 检测器的峰纯度检测功能，对 1#、2#和 3#三色谱峰进行峰纯度测试，未检测到未分离杂质。

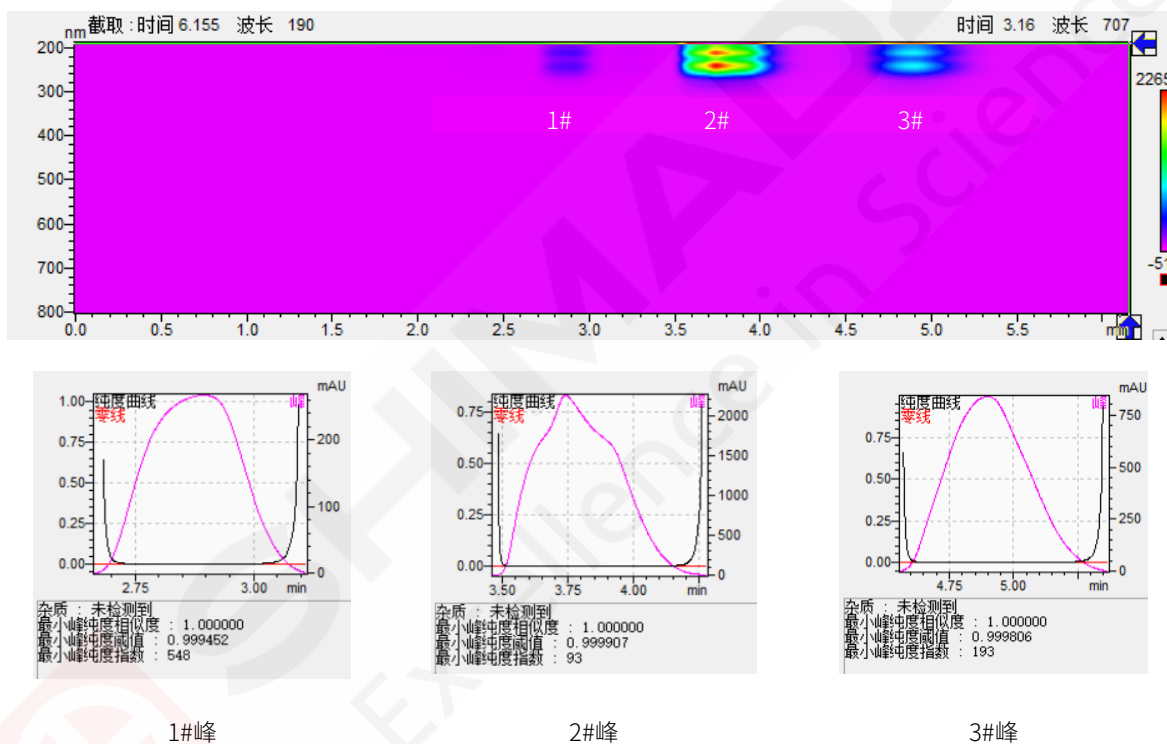


图5 色谱峰等高线视图及 1#和 3#色谱峰纯度测试

2.4 重叠进样及结果评价

Labsolutions 工作站可通过简单设置，完成重叠进样的功能。本例中，UC Prep 实现重叠进样方式。针对该样品有效连续进样 9 次，耗时 34min，而传统批处理连续进样方式在相同进样次数需要超过 63min。

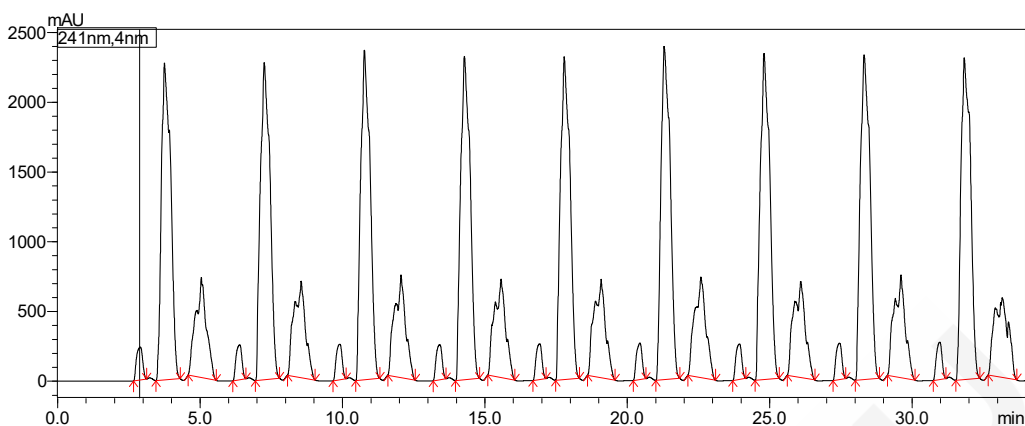


图6 重叠进样9针的色谱图

通过对重叠进样结果进行分析，对比每次分离中1#、2#和3#色谱峰的峰面积、保留时间差、各峰峰宽（5%峰高）、分离度等评价指标。结果显示连续9次重叠进样分离过程中，色谱峰面积及峰宽（5%峰高）保持良好的重复性，相对标准偏差在1.4%-1.6%及0.7%~2.2%之间，各峰对应保留时间差在0.2~0.5%之间，分离度(USP)变化控制在5%以内体现该系统在此样品的分离整个过程中稳定性良好。

表1 收集馏分色谱评价结果

色谱峰	保留时间差*		峰面积		峰宽(5%峰高)		分离度(USP)	
	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%
1#	3.5097	0.3	3627794	1.4	0.381	1.1	2.4	4.9
2#	3.5103	0.2	53436392	1.6	0.666	0.7	1.8	1.9
3#	3.5153	0.5	19424127	1.4	0.853	2.2	1.9	4.7

保留时间差*：重叠进样分离过程中，同一化合物在相邻两次分离产生的色谱峰保留时间差

2.5 工作效率提升

本实验使用了重叠进样方式，同传统单次进样方式相比，可实现色谱系统最大化的无间断连续工作，极大提升了色谱柱分离效率、检测器工作效率。下面以本实验为例，通过重叠进样的方式，将本需要63分钟的常规9针进样时间，缩短到34分钟，时间减少46%，同时溶剂消耗和能量消耗均降低46%，单位时间的样品制备量较常规单针进样方式提升了1.9倍，极大提高了制备分析的效率。

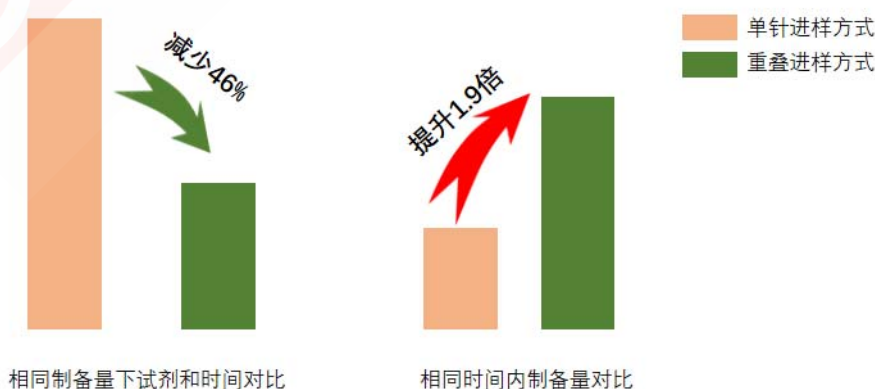


图7 单针进样方式和重叠进样方式效率比较

3. 结论

本实验采用超临界流体色谱制备系统，采用超临界 CO₂ 为流动相，利于其高扩散性，低粘度，压力释放后快速分离收集等优势，结合手性填料色谱柱对于旋光异构化合物完成色谱拆分，高效率收集；同时使用软件中的重叠进样功能，可极大降低试剂和时间消耗，提高色谱系统的工作效率。PDA 软件中的纯度分析功能，可很好的进行制备分离效能的检验，判断有无杂质干扰物质进入收集馏分，提高收集的准确性。



药品成分的高效纯化方式

对用户的好处

相对于常规 HPLC 制备而言，UC 制备可大大降低干燥纯化的人力成本。

可连续处理大批量样品，缩短纯化时间。

可降低纯化操作中大量使用的有机溶剂消耗，降低耗材费用。

简介

HPLC 制备在制药领域中被用于各种目的，例如合成化合物的纯化，杂质结构分析所需的纯化等。另一方面，大量粗样品的纯化和回收液的干燥需要大量时间。此外，使用 HPLC 制备进行纯化会使用大量溶剂，因此购买和废弃溶剂所需的费用成为实验必须考虑的因素。本文介绍了使用超临界流体色谱制备仪“Nexera UC Prep”，通过 HPLC 制备提升纯化工作流程效率的案例。

使用 HPLC 制备纯化 2 种药物组分的案例

众所周知，通常情况下采用 HPLC 反相分离模式应对多种化合物，分离性能较好。但大多数情况下会使用水作为流动相，因此干燥样品回收溶液需要大量时间。

使用 HPLC 制备纯化 2 种药物组分的案例如下所示（表 1、图 1）。本文研讨了分别通过超临界流体色谱分析法与利用常规 HPLC 制备纯化的化合物的差异，以提升纯化工作流程。

表 1 制备条件 (HPLC)

色 谱 柱	: Shim-pack™ Scepter C18-120 (50 mm×20 mm I.D., 5 μm), P/N: 227-31102-01
流 动 相	: A: 水 (含 0.1% (v/v) 的甲酸); B: 乙腈
流 速	: 20 mL/min
时 间 程 序	: B 浓度 10% (0-1 min) → 90% (7-9 min) → 10% (9.01-10 min)
柱 温	: 室温
进 样 量	: 500 μL 乙腈 (每种化合物含 10 mg/mL)
样 品 瓶	: 10 mL 螺旋瓶, P/N: 18 09 1306-1 (SGLC)
检 测 器	: PDA 250 nm

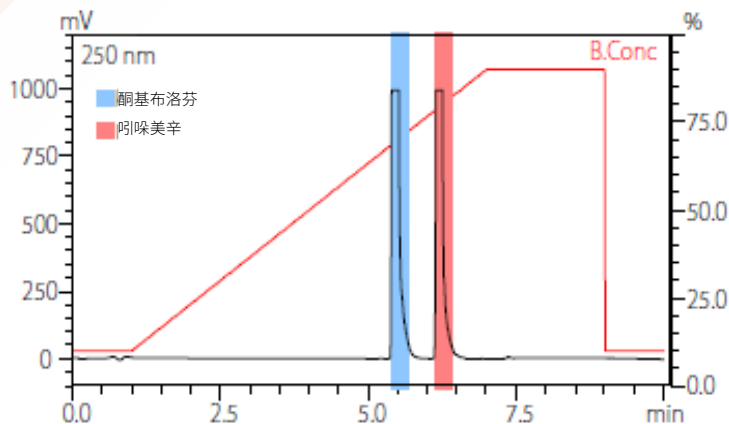


图 1. 两种药物的 HPLC 制备液相色谱图

利用 SFC 纯化的优点

超临界流体色谱分析法 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 是使用超临界流体作为流动相的色谱分析法的总称, 特别是使用二氧化碳的方法广为人知。

多数情况下, 二氧化碳比常规有机溶剂价格更低, 可减少溶剂费用。此外, 二氧化碳在大气压下回收时会自然气化, 还可缩短溶液干燥回收所需的时间。

通过梯度分析确认保留

在 SFC 中, 为调整化合物在色谱柱的保留力和保留时间, 会使用少量有机溶剂 (改性剂), 通过梯度分析, 改变改性剂的添加量, 可确认各化合物的保留。表 2 和图 2 所示为通过梯度分析纯化 2 种药物组分的条件和结果。通过使用 Shim-pack UC Diol II 分析色谱柱, 确认各目标组分已获得良好分离, 可进行制备与纯化。

表 2 制备条件 (SFC、梯度分析)

色 谱 柱	: Shim-pack UC Diol II (250 mm×20 mm I.D., 5 μm), P/N: 227-32606-04
流 动 相	: A: CO ₂ ; B: 甲醇
流 速	: 60 mL/min
时间程序	: B conc.0 % (0-1 min)→ 40 % (7-9 min)→0 % (9.01-10 min)
柱 温	: 40 °C
进 样 量	: 500 μL n-庚烷/IPA = 2:1 (每种化合物含 10 mg/mL)
样 品 瓶	: 10mL 螺旋瓶
BPR 参数	: 10 MPa
检 测 器	: PDA 250 nm

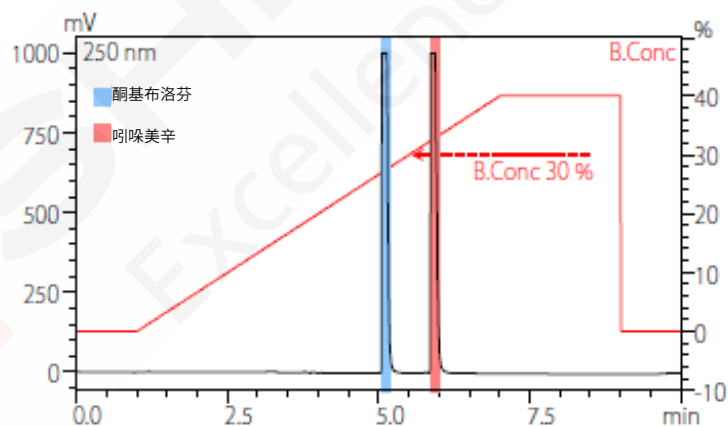


图 2. 两种药物的制备 SFC 色谱图

利用重叠进样方式, 进行批量纯化处理

重叠进样是一种连续对色谱柱注入样品的方法, 可充分利用从进样到分离出首个色谱峰的等待时间, 提高制备效率。本文研讨了通过使用重叠进样, 缩短纯化时间和削减溶剂消耗量。

重叠进样时, 会在分析过程中连续注入样品, 因此在分析中采用不改变流动相组分的等度模式。结合梯度模式下化合物溶出为改性剂浓度 30% (图 2), 将等度模式的分取条件制定为改性剂浓度 30% (表 3)。根据图 2 制备色谱图设置 5 次重叠进样 (图 3、图 4)。

表 3 制备条件 (SFC、等度分析)

色 谱 柱	: Shim-pack UC Diol II (250 mm×20 mm I.D., 5 μm)
流 动 相	: A: CO ₂ ; B: 甲醇
流 速	: 60 mL/min
时 间 程 序	: B 浓度 30% (0-4 min)
柱 温	: 40 °C
进 样 量	: 500 μL 正庚烷/异丙醇 = 2:1 (每种化合物含 10 mg/mL)
样 品 瓶	: 10mL 螺旋瓶
B PR 参 数	: 10 MPa
检 测 器	: PDA 250 nm

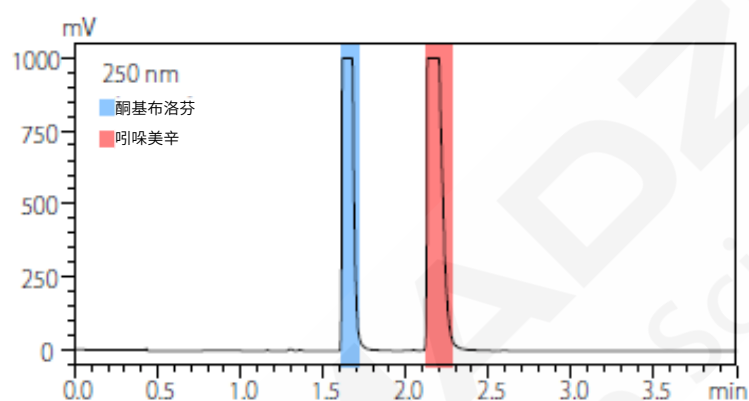


图 3 制备 SFC 色谱图 (等度条件)

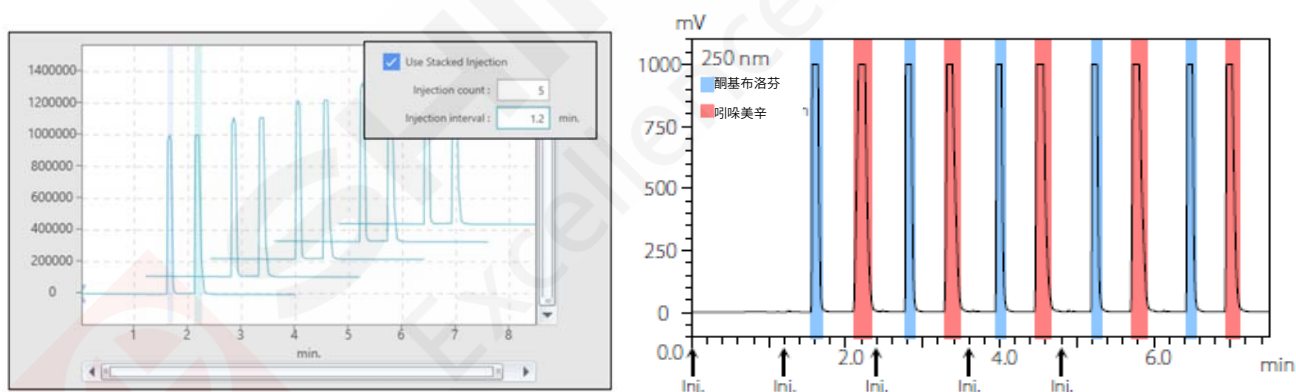


图 4 制备 SFC 专用软件 Prep solution 中关于“重叠进样”功能的设置方式和两种化合物重叠进样制备效果

与常规制备 HPLC 比较，更节约溶剂和样品干燥时间

使用制备 HPLC 纯化本实验中的目标粗样品，并比较了所消耗的溶媒量和处理时间 (表 4)。常规 HPLC 制备使用大量超纯水或有机溶媒作为流动相，而制备 SFC 则使用比有机溶媒价格低的二氧化碳作为主要流动相，因此降低了有机溶媒的消耗。此外，通过重叠进样，连续处理大批量粗样品，进一步降低了溶剂消耗量和分析时间。

回收液干燥时间的比较如图 5 所示。制备 SFC 中使用的二氧化碳会在大气压下挥发，因此需要回收的液量较少。此外，由于流动相中不含水的原因，可将回收液的干燥时间缩短到制备 HPLC 处理时的 1/21。

表 4 不同制备纯化方式 (HPLC 与 SFC) 溶媒消耗量、处理时间比较

	流动相	体积	流动相	体积	总时间
制备型 HPLC	水	630 mL	乙腈	470 mL	55 min
制备型 SFC	CO ₂	315 mL	甲醇	135 mL	7 min

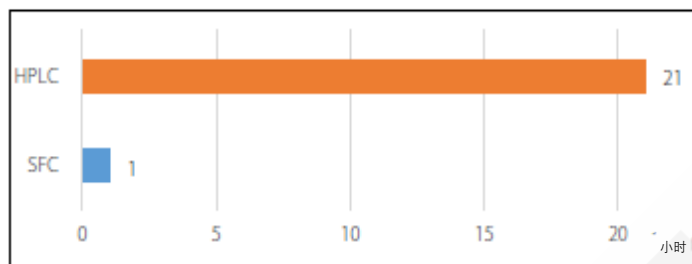


图 5 不同制备纯化方式 (HPLC 与 SFC) 回收液干燥时间比较

结论

本文介绍了使用超临界流体色谱进行药物制备纯化和干燥的案例。与使用常规 HPLC 制备纯化药物化合物具有的如处理时间长, 劳力成本高、有机溶剂消耗大等问题相比, 制备 SFC 纯化法具有多种优点, 不仅适用于新化合物的分析, 还可应用于常规化合物的纯化, 提高其工作效率。

有机发光二极管材料的制备纯化

对用户的好处

可使用分析型 SFC 系统，直接进行制备纯化。

分析条件可以很容易地适用于大规模制备。

使用制备型 SFC 系统，即使在进样大量样品溶液的情况下，仍可保持良好的色谱峰形。

简介

有机发光半导体材料是一组用于制造 OLED 显示屏的化合物，主要由可产生荧光的多环芳烃构成。有机发光半导体材料的合成和杂质的结构表征是开发新的、高性能产品必不可少的，而多数情况下需要高纯度化合物，因此需要纯化目标组分。

本文中，我们介绍了使用超临界流体色谱 Nexera UC 分析系统进行小容量制备以及 Nexera UC Prep 用于大量制备。

利用 SFC 分析有机发光半导体材料

在已经报道的应用新闻中，介绍了使用超临界流体色谱分析仪 Nexera UC 的方法开发系统建立有机发光半导体材料分析条件的工作流程。图 1 所示为 3 种目标有机发光半导体材料，表 1 所示为分析条件，图 2 所示为分析结果。

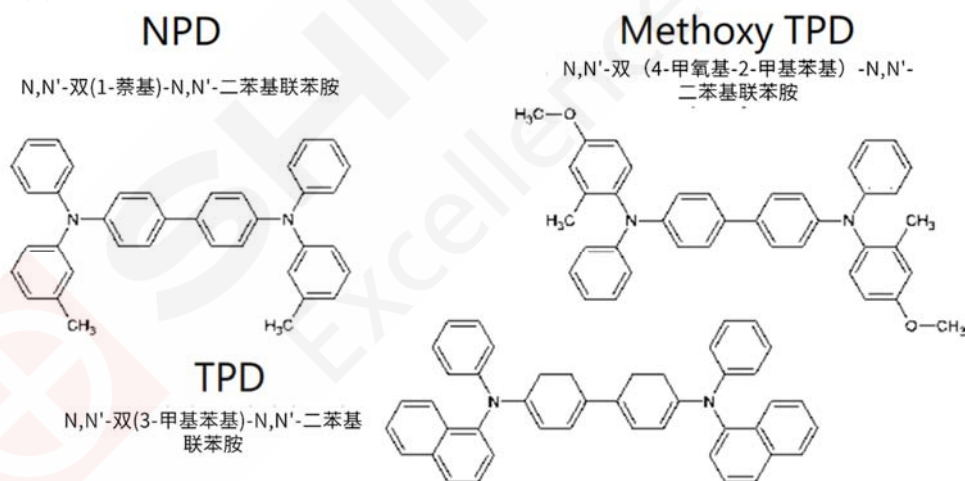


图 1. 有机发光二极管材料的结构

表 1 分析条件 (分析型 SFC)

色 谱 柱	: Shim-pack™ UC Diol II (250 mm×4.6 mm I.D., 5 μm), P/N: 227-32606-02
流 动 相	: A: CO ₂ ; B: 乙醇
流 速	: 3 mL/min
时 间 程 序	: B 浓度 5% (0-1 min) → 40% (6-8 min) → 0% (8.01-10 min)
柱 温	: 40 °C
进 样 体 积	: 5 μL 四氢呋喃溶液 (每种化合物含 250 mg/L)

样品瓶：SHIMADZU LabTotal™用于 LC 1.5 mL，玻璃（P/N：227-34001-01）
B P R 参数：10 MPa
检测器：PDA 350 nm（参比波长 400 nm）

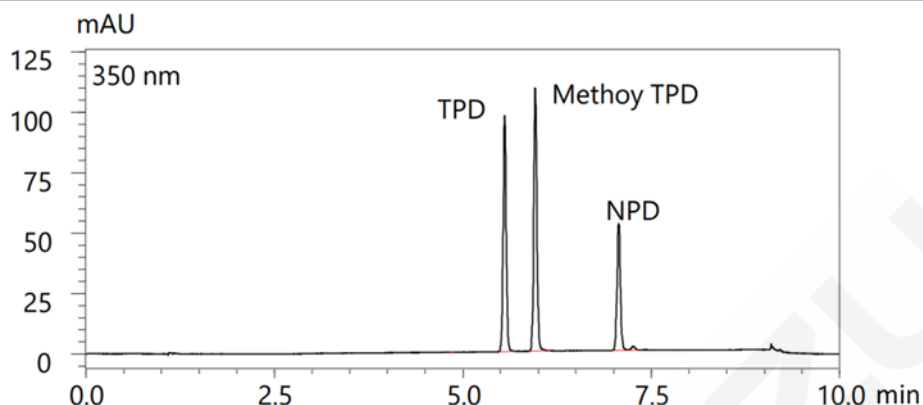


图2 三种发光二极管（OLED）材料的 SFC 分析色谱图

分析型 SFC-馏分收集系统

岛津制作所的超临界流体色谱分析仪 Nexera UC 可通过连接馏分收集器 FRC-40 SF 进行制备纯化。（图 3 分析型馏分收集系统）。Nexera UC 方法开发系统也可升级为分析型馏分收集系统，实现从分析条件的研究顺利过渡到目标分析物的纯化。



图3 分析型 SFC-馏分收集系统

OLED 材料的小规模制备和纯度测试

使用分析馏分收集系统，研究了有机发光半导体材料的制备纯化（图 4）。制备条件与表 1 所示相同，使用 5 g/L 的样品溶液作为纯化对象。在制备操作过程中，使用自动清洗制备喷嘴和气液分离器的谱峰间吹扫功能，来减少污染（图 4 蓝色区间）。

使用分析馏分收集系统对所得馏分进行重新分析，确认纯度。得到的重新分析色谱图如图 5 所示，纯度确认结果如表 2 所示。利用分析馏分收集系统进行少量制备时，可实现 96%以上的高纯度分离纯化。

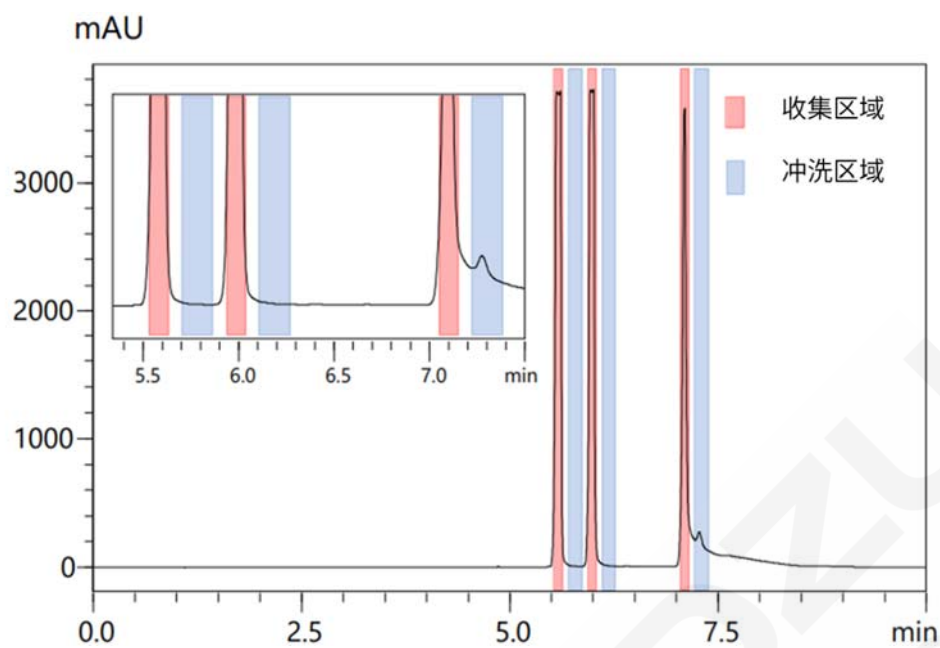


图 4 制备色谱图 (分析型馏分收集系统)

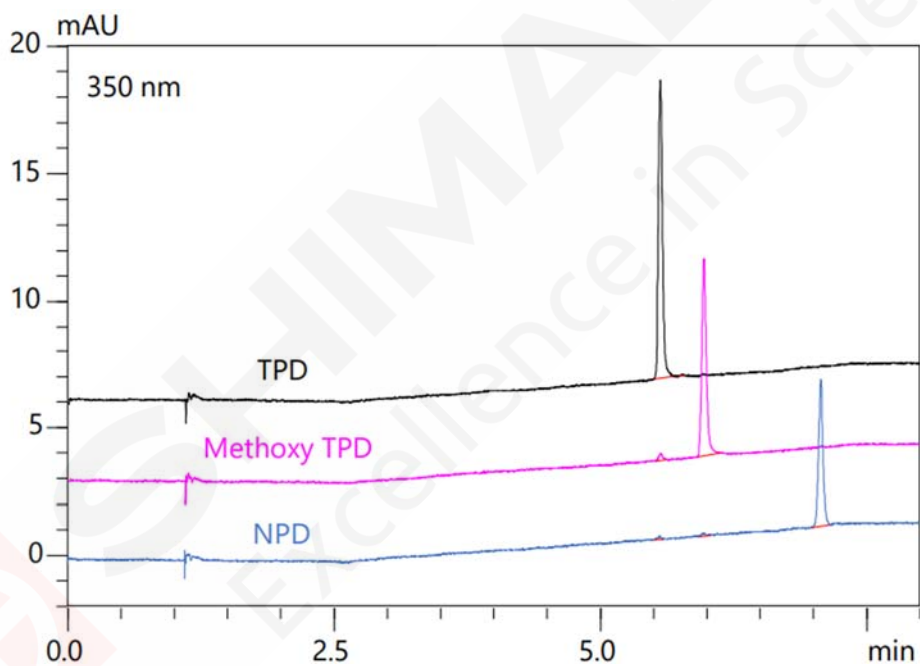


图 5 各收集组分重分析

表 2 馏分中目标组分的纯度 (面积百分比 UV 350 nm)

	面积%
TPD	99.7
甲氧基 TPD	97.2
NPD	96.7

制备方法的规模放大

使用前述分析馏分收集系统进行少量制备时，每次分析可纯化 25 μg 的粗品。为纯化更多粗品，需要提高制备纯化的规模。

通过选择使用同一填充剂的粗内径色谱柱产品，可轻松地提高到大量制备的规模。本文选择了内径 20 mm 的色谱柱，并使用兼容该色谱柱的大量制备装置 Nexera UC Prep。

表 3 所示为利用 Nexera UC Prep 进行制备纯化的条件，图 6 所示为进样 200 μL 样品溶液时的制备色谱图。通过 Nexera UC Prep，可在与分析馏分收集系统相同的分析时间内纯化约 40 倍的粗品。

表 2 分析条件（制备型 SFC）

色 谱 柱	: Shim-pack UC Diol II (250 mm \times 20 mm I.D., 5 μm) P/N: 227-32606-04
流 动 相	: A: CO_2 ; B: 乙腈
流 速	: 60 mL/min
补 偿 流 量	: 5 mL/min (四氢呋喃)
时 间 程 序	: B 浓度 2% (0-1 min) \rightarrow 40% (6-8 min) \rightarrow 0% (8.01-10 min)
柱 温	: 40 $^\circ\text{C}$
进 样 体 积	: 200 μL 四氢呋喃作为溶剂; (每种化合物含 5 g/L)
样 品 瓶	: 10mL 螺口瓶 P/N: 18 09 1306-1 (SGLC)
B P R 参 数	: 10 MPa
检 测 器	: PDA 350 nm (参比波长 400 nm) 制备池

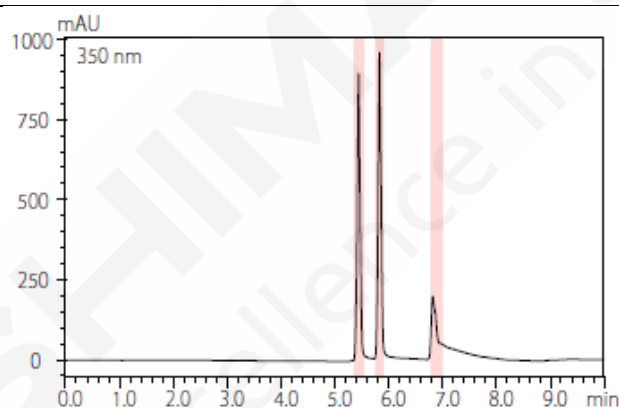


图 6 制备 SFC 色谱图 (Nexera UC Prep)

溶剂效应的改善

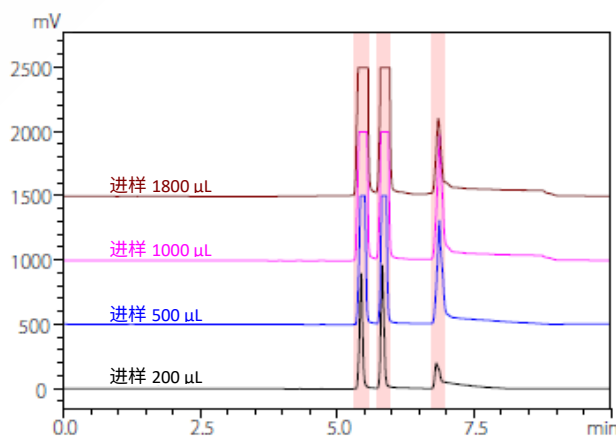


图 7 增大进样体积的制备色谱图

大量制备时，每次上样的化合物量很重要，但如果增加样品溶剂的体积，由于溶剂的影响，峰形可能会变差。Nexera UC Prep 采用柱上稀释法，溶剂被稀释到所需的比例，最大限度地减少了因溶剂影响而导致的峰形变差。

本文以四氢呋喃为样品溶剂，研究了大量进样时的峰形变差。样品进样量从 200 μL 升至 1800 μL 时的色谱图如图 7 所示。结果表明，进样 1800 μL 时仍可保持良好的峰形。

结论

本文介绍了使用超临界流体色谱分析仪，以有机发光半导体材料为对象进行的小批量制备及向大批量制备扩展的情况。有机发光半导体材料的开发和质量控制中，目标组分的合成、纯化、分析均十分重要。利用支持从分析条件研究到少量制备的 Nexera UC，以及支持支持大批量制备的 Nexera UC Prep，可提高有机发光半导体材料的开发和质量控制相关业务的效率。



3.5 制备分离的特色技术

同样基于高效液相色谱技术，制备液相相比较于分析液相而言，具有系统上样量大、流动相流速快、运行成本高等特点，对运行成功率和后续样品处理的要求体现更加明显。实际使用中，往往设计方法时能够以最小的时间消耗和运行成本损耗获取更大的收率和更高的产物质量。

传统的制备分离方法的建立，一般基于使用者对液相色谱熟练的掌握和对液相色谱系统理论的理解和经验运用。如常见的反相 C18 色谱柱上的色谱分离方法，简单可以认为通过调节流动相中有机相（一般为甲醇、乙腈等溶剂及少量用于调节 pH 或者离子强度的添加剂）和水相的比例来达到目标物的保留行为调整，从而获得良好分离条件，往往方法探索需要多次运行，消耗不少样品、流动相和时间。同时制备完成后大量的馏分收集液，由于主要成分为水，导致溶剂回收费时，造成后续进程受限。另外，如果为了改善分离而使用带添加剂的流动相又为后续的溶剂回收和纯度测试带来影响。另一方面，有机合成样品中，由于物质结构的关系，有时会有溶解性，尤其是水溶性差的物质。对于此类物质，进样前的溶剂工作，需要使用相对极性较小的高比例有机相，这时为后续的制备色谱分离，带来了容积效应的隐患，严重时导致分离失败，造成样品损失。针对以上常出现在制备分离中的几个问题，岛津提供了几款应用特色技术予以改善分离效果。

根据分析方法自动计算适合的制备分离方法的制备条件自动放大系统（ASAPrep），是岛津和武田制药公司共同开发的系统，使得反相色谱的从分析到制备的条件放大变得简单。该系统实现简单高效制备的核心是一套基于快筛分析结果来计算制备分离条件的算法。通过这一算法，可自动决定制备实验中有机相的初始浓度来获得更好的目标化合物峰的分离，且没有制备经验也可得到一样的结果。

针对使用复杂流动相进行制备分离或者加速溶剂回收的 Prominence UFPLC，通过二维色谱的工作方式，将一维色谱分离的目标物富集在聚合物填料色谱柱上，经过冲洗净化后，再通过高有机相比例洗脱，最大程度减少了馏分溶液中水相的比例，从而节省了后处理的时间效果的同时，得到真正高纯度的目标物。

一般认为，体积超载能够提高纯化通量。但由于溶解样品的溶剂和流动相之间缺乏充分混合，目标物峰型将会受到影响，本节介绍一种具有自动稀释方式的进样技术来解决此类问题，从而提高制备分离效率。

ASAPrep-药物研发过程中新合成化合物纯化工作流程的优化

摘要：标化合物的合成、筛选和纯化在药物研发实验室中进行。这些步骤耗时长，因此需要改进整个工作流程。本文介绍了一种利用专门设计的软件，实现对LC/MS进行目标物筛选和制备纯化的全新自动化操作流程。ASAPrep™放大算法实现了从筛选步骤到纯化步骤的简便放大转移。

关键词：制备纯化 合成 ASAPrep

药物研发实验室中目标化合物的合成、筛选和纯化是药物研发的关键步骤。一般来说，这些步骤耗时长，影响着药物研发进程，业内迫切需要改进整个 workflow，来提升研发效率。本文介绍了一种利用专门设计的软件，实现对 LC/MS 进行目标物筛选和制备纯化的全新自动化操作流程。

1. 传统工作流程

图 1 显示了药物研发中目标化合物筛选和纯化的传统工作流程。首先，通过 LC-MS 对合成产物中的粗品化合物进行分析，之后操作人员对每个结果进行检查。然后，通过传统的放大方法手动开发制备方法。最后，粗品化合物通过制备液相色谱进行纯化。

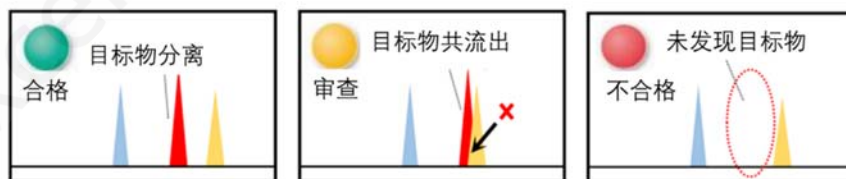


图 1 目标物筛选和纯化的传统工作流程

2. 进阶工作流程

2.1 通过 Open solution 进行自动筛选

典型的筛选步骤需要手动检查每个粗品化合物分离情况。Open Solution™是一种开放式软件，可协助从筛选到纯化的整个药物研发流程。该软件利用目标 m/z 信息和 MS 质谱法将粗样品分离情况自动分为三种类型（图 2）。



2.2 通过 ASAPrep 自动放大

Open Solution 使用 ASAPrep™算法（从分析型到制备型的自动放大）创建了一个放大方法。该算法利用筛选结果的信息，为规模制备创建聚焦梯度曲

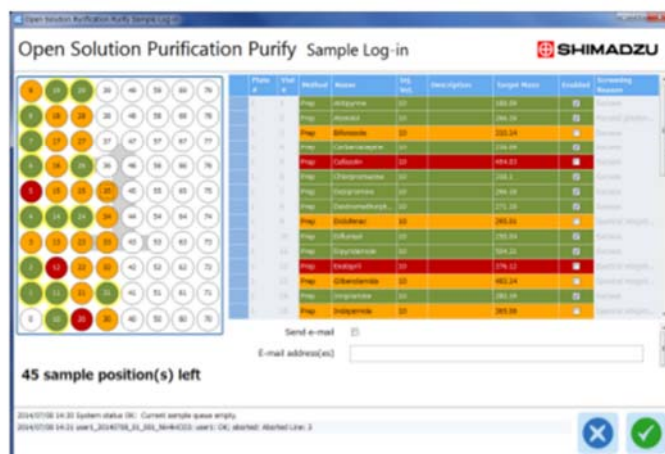


图 2 Open Solution 将粗品化合物分离结果分为三种情况

线（图 3）。用户只需选择合格样品（绿色），然后一键启动纯化步骤。

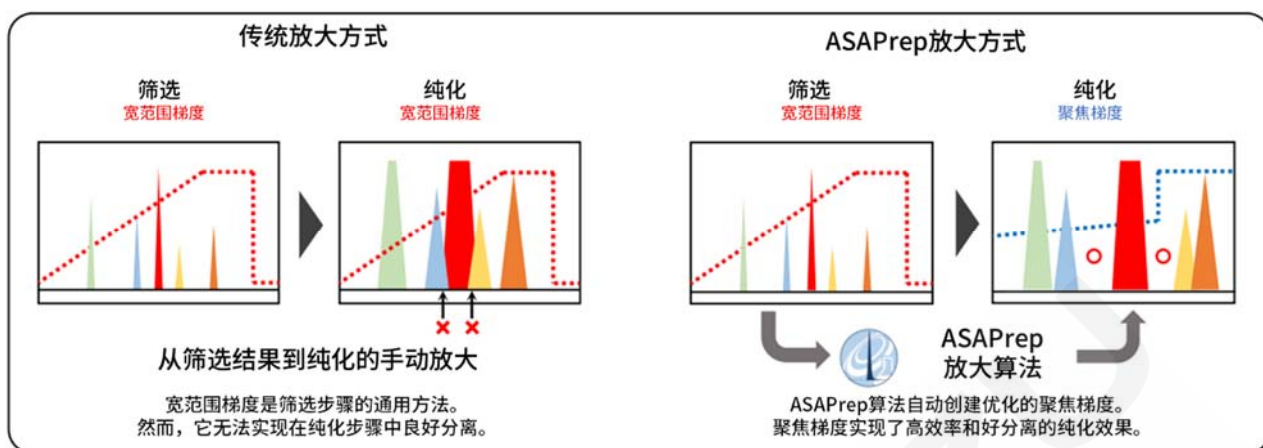


图 3 传统算法和 ASAPrep 算法的工作流程比较

3. 药物合成粗品分离的筛选与纯化

我们针对三种含有杂质的药用化合物进行了筛选、放大和纯化。表 1 为筛选步骤的分析条件，表 2 为纯化步骤的分析条件。所有结果见表 3。LC-MS 分析（LCMS-2020）在筛选步骤中发现三个目标化合物，然后，ASAPrep 算法通过筛选结果，按每个目标化合物的保留时间计算出专用的聚焦梯度曲线。遵循 ASAPrep 算法的聚焦梯度在纯化步骤中显示出良好的分离效果，并通过 LCMS-2020 鉴定了每个化合物。

表 1 筛选步骤的分析条件

色谱柱	Shim-pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm内径, 1.9 μm) P/N: 227-30048-02
流动相	A) 0.1%甲酸水溶液 B) 0.1%甲酸乙腈溶液
流速	0.5 mL/min
时间程序	B浓度5% (0 min) → 95% (3-4 min) → 5% (4.01-5 min)
柱温	40℃
进样量	1 μL
样品瓶	岛津LabTotal™, LC 1.5 mL, 玻璃 P/N: 227-34001-01
分析物	二甲基亚砷中的目标化合物, 浓度2 mg/mL
检测器参数	254 nm (SPD-M20A) Pos./Neg., Scan m/z : 50-1000 (LCMS-2020)

表 2 纯化步骤的分析条件

色谱柱	Shim-pack GISS C18 (100 mm×20 mm 内径, 5μm) P/N: 227-30066-02
流动相	A) 0.1%甲酸水溶液 B) 0.1%甲酸乙腈溶液
流速	20 mL/min
时间程序	B浓度XX*% (0 min) → XX+20% (8-12 min)
柱温	环境温度
进样量	400 μL
样品瓶	10mL螺口小瓶 P/N: 220-97331-09

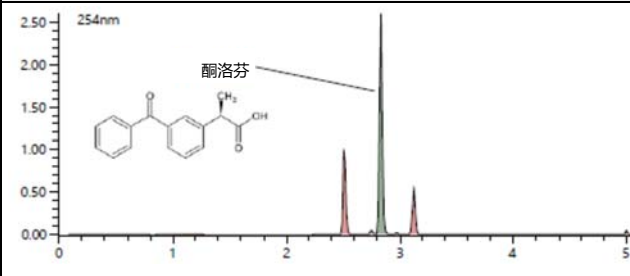
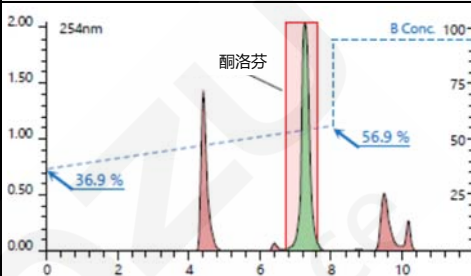
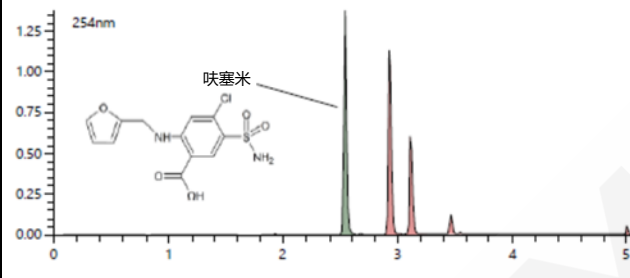
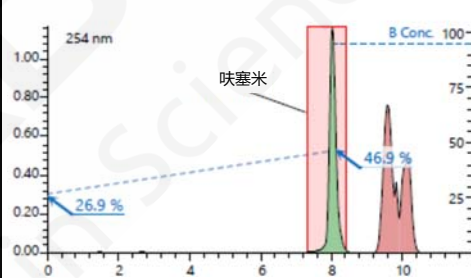
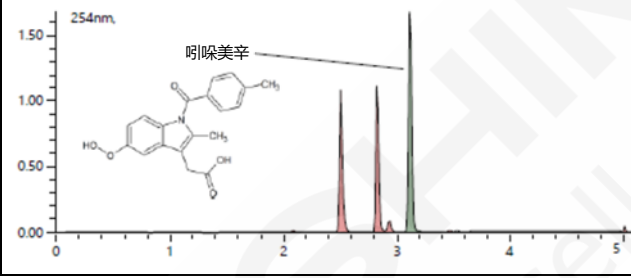
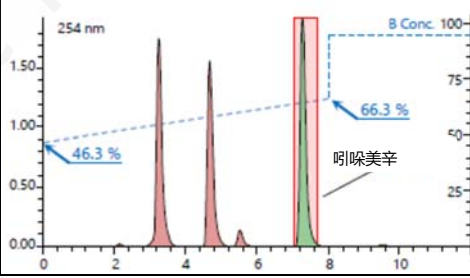
分析物：二甲基亚砷中的目标化合物，浓度20 mg/mL

检测器参数：254 nm (SPD-20AV)

Pos./Neg., Scan m/z 50-1000 (LCMS-2020)

XX* 聚焦梯度的初始B浓度

表 3 筛选和纯化步骤的结果

筛选色谱图	ASAPrep算法	纯化色谱图
	目标物质量 254.28 保留时间 2.83 min 聚焦梯度 初始B浓度 36.9% 筛选结果 合格	
	目标物质量 330.74 保留时间 2.53 min 聚焦梯度 初始B浓度 26.9% 筛选结果 合格	
	目标物质量 357.79 保留时间 3.11 min 聚焦梯度 初始B浓度 46.3% 筛选结果 合格	

4. 结论

本文介绍了从筛选到纯化的药物研发的高级工作流程。Open Solution 软件和 ASAPrep 算法操作简单，可节省劳动力，同时能够自动检查筛选结果和开发制备方法。该纯化自动工作流有望提高生产力，降低劳动力成本。

Prominence UFPLC 用于布洛芬及其有关物质的分离纯化

摘要：制备液相色谱目标馏分的去溶剂干燥是药物研究过程中一个耗时的过程，一定程度影响药物研发的速度。同传统的溶剂回收方式相比，UFPLC方式不仅实现了目标化合物的分离自动化，而且实现了浓缩、纯化、回收等相关过程的自动化，大大节省了制备纯化的劳动力。

关键词：制备纯化 合成 ASAPrep

液相色谱制备和纯化技术广泛应用于药物合成、天然产物中有效化合物发现，以及在制药、食品和化学工业中对微量未知化合物进行结构分析等工作。Prominence™ UFPLC (Ultra Fast Preparative and Purification Liquid Chromatograph, 以下简称 UFPLC) 不仅实现了目标化合物的分离自动化，而且实现了浓缩、纯化、回收等相关过程的自动化，大大节省了制备纯化的劳动力。本文介绍了利用岛津先进的 UFPLC 系统制备药物布洛芬及其类似物混合样品的工艺纯化应用。

1. 利用 UFPLC 进行分取提纯的流程

UFPLC 利用制备 LC 和捕集柱的组合自动进行与目标化合物制备分离相关的各种过程。这些过程的细节如下。

- 1.用制备液相色谱法分离复杂样品中的目标化合物，并将其注入捕集柱
- 2.用超纯水置换捕集柱中的溶剂
- 3.使用有机溶剂对捕集柱中目标化合物进行洗脱。(流程如图 2 所示。)



图1 Prominence UFPLC 系统

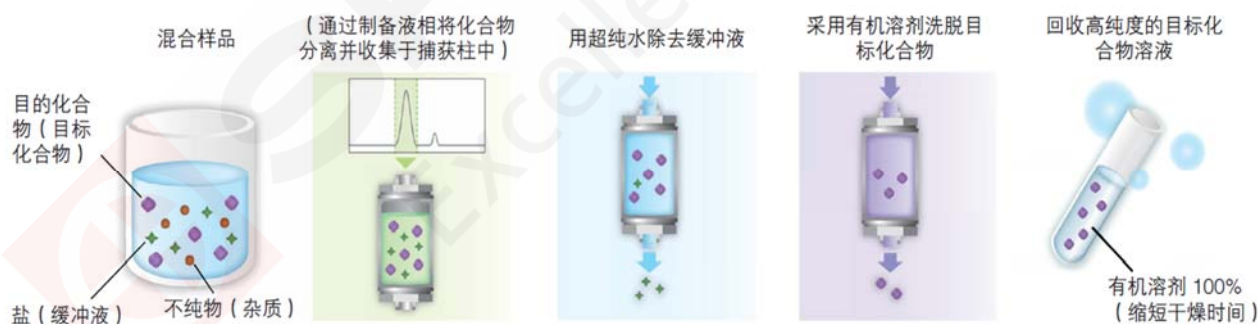


图2 Prominence UFPLC 用于目标化合物分离、捕集、净化、洗脱的过程

2. 布洛芬及其类似物的制备与纯化

布洛芬是一种非甾体抗炎药 (NSAIDs)，常用于解热镇痛。美国药典 (USP) 收录了布洛芬及其类似物异丁基苯乙酮的分析方法，该方法以苯戊酮为内标。本文介绍了利用 UFPLC 制备纯化这三种化合物的方法。

制备纯化条件如表 1 所示，混合溶液的制备 LC 色谱分离图如图 3 所示。三个目标化合物用流动相溶解，制成各组分含量分别为 5000 mg/L 混合溶液。



表 1 布洛芬等三个物质的 UFPLC 制备-净化-回收条件

制备液相条件	
色 谱 柱	: Shim-pack™ VP-ODS (250 mmL. × 10.0 mmI.D., 5 μm)
流 动 相 A	: A-1%氯乙酸溶液 (氨水调节 pH 3.0)
流 动 相 B	: 乙腈
流 动 相 比 例	: A/B = 2/3 (v/v)
流 速	: 9.0 mL/min
柱 温	: 室温
进 样 量	: 100 μL
检 测 器	: UV 230 nm (制备流通池)
捕集和净化条件	
捕 集 柱	: Shim-pack™ C2P-H (30 mmL. × 20 mmI.D., 25 μm)
净 化 溶 剂 A	: 2%乙腈水溶液
净 化 溶 剂 B	: 水
时 间 程 序	: A 15 mL/min (0-2 min) → A 8 mL/min (2.01-4 min) → B 8 mL/min (4.01-8 min)
洗脱条件	
洗 脱 液	: 乙腈
流 速	: 4.5 mL/min
检 测 器	: UV 230 nm (制备流通池)

3. 布洛芬及其类似物的纯度验证

对通过 UFPLC 收集的布洛芬、苯戊酮、异丁基苯乙酮的组分进行分析和纯度验证。分析条件及色谱图如图 2 所示。此外，通过使用面积归一化计算得到各组分中目标化合物在 UV230nm 波长下纯度结果。

色 谱 柱	: Shim-pack™ VP-ODS (250 mmL. × 4.6 mmI.D., 5 μm)
流 动 相 A	: A-1%氯乙酸溶液 (氨水调节 pH 3.0)
流 动 相 B	: 乙腈
流 动 相 比 例	: A/B = 2/3 (v/v)
流 速	: 2.0 mL/min
柱 温	: 30°C
进 样 量	: 10 μL
检 测 器	: UV 230 nm (分析流通池)

表 2 收集馏分的纯度测试结果（峰面积归一化法，UV230 nm）

#	化合物	面积%
1	布洛芬	99.2%
2	苯戊酮	99.6%
3	异丁基苯乙酮	99.8

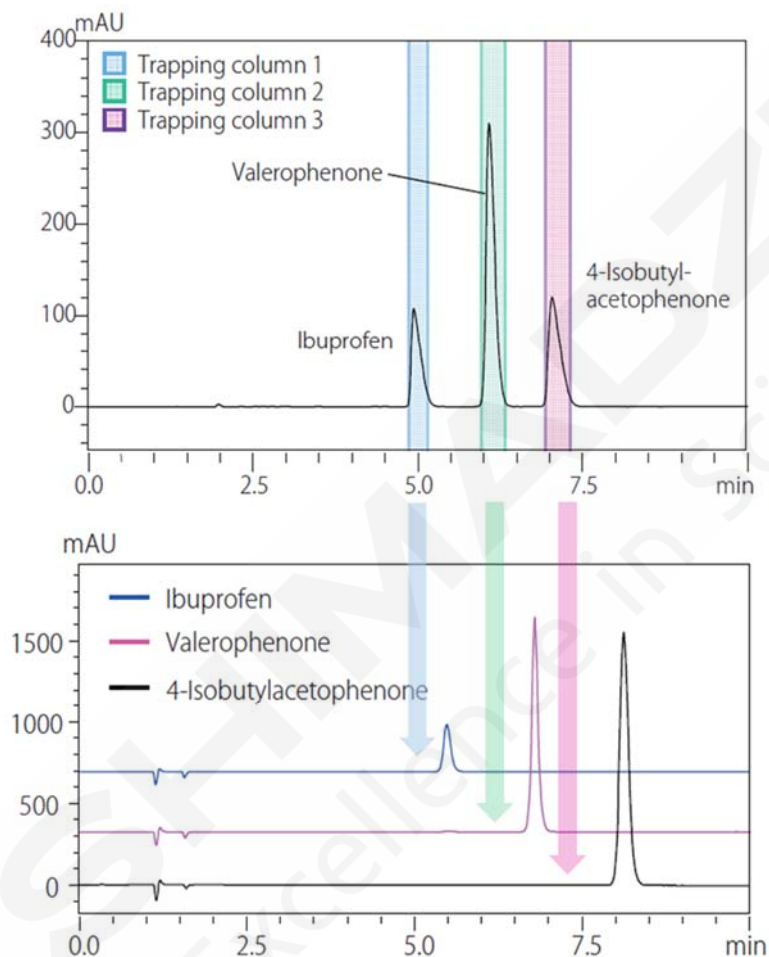


图 3 三种物质使用 UFPLC 分离及对应纯度检测
(上：三种物质制备液相色谱图；下：经过纯化后各物质纯度检测结果)

4. UFPLC 和制备液相色谱对馏分溶剂回收的时间对比

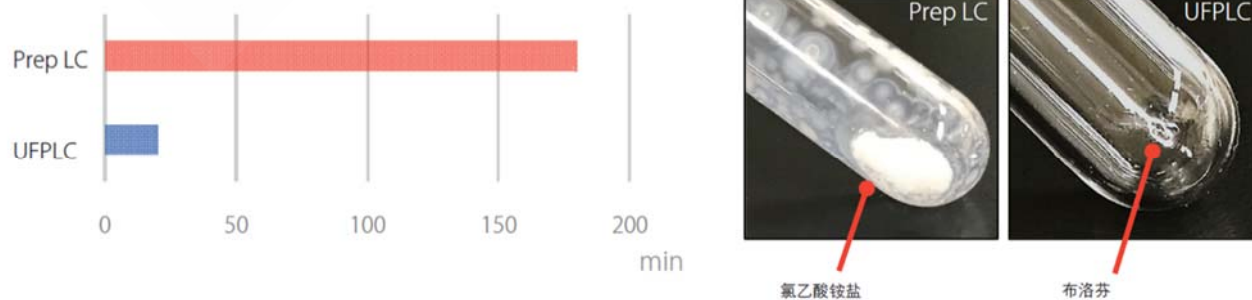


图 4 传统制备色谱与 UFPLC 对馏分干燥时间计干燥效果对比

在使用制备液相色谱对复杂样品的分离纯化中，为了在下一工作流程使用中的目标物，须对目标馏分溶液进行溶剂干燥。实际工作中，由于流动相中含有水分的原因，对于使用传统的反相制备液相色谱获得的馏分，需要非常长的干燥时间。并且，在流动相中使用了非挥发性缓冲盐的情况下，盐有时会在干燥后沉淀析出。在使用 UFPLC 进行制备纯化过程中，利用捕集柱的脱盐作用，可以去除分离过程中使用的非挥发性盐。由于仅使用有机溶剂从捕集柱中回收样品，目标馏分的干燥时间也得到了大为缩短。

为验证干燥时间的缩短，对通过 UFPLC 制备分离的布洛芬组分采用离心浓缩仪进行了干燥。同时也测定了制备液相收集的布洛芬馏分的干燥时间，并对二者的干燥时间进行了比较。普通制备液相馏分干燥需约 180 min，而 UFPLC 馏分的干燥时间约 20 min（图 4）。制备液相的馏分经过干燥后发现了添加于流动相中的氯乙酸和铵盐。因此，这样的产物不能直接用于下一步工作。而在通过 UFPLC 获得的馏分中，因为经过了捕集柱的脱盐过程而干燥制得了晶体，经过验证为布洛芬晶体。



SHIMADZU
Excellence in Science

具有自动切换稀释进样功能的高通量制备液相色谱

特点描述

大体积进样（体积超载）能够提高制备型 LC 的通量。

稀释进样功能在强洗脱溶剂时将表现出更优异的峰型。

自动切换功能使得系统既适合于典型进样，也适合于强洗脱溶剂时的大体积进样。

简介

制备型 LC 是一种被广泛使用的纯化技术。在各行业中，高通量纯化均是最基本的需求。然而，高通量纯化时的大体积进样会导致峰型变宽。本文介绍了一款具备稀释进样功能、便于大体积进样的高通量制备型 LC。

大进样量对提高纯化通量的重要性

上样量是决定制备型 LC 通量的关键参数之一。在大多数情况下，待纯化的粗品样品量大于常规制备型 LC 的上样容量。因此，纯化目标量的样品需经历多重制备流程。增加上样量将减少该流程的重复次数并提高纯化通量。增加上样量主要通过浓度超载和/或体积超载实现上样（表 1），由于浓度超载可能导致样品析出，因此实际制备过程中体积超载方式被更广泛的应用。



图 1 上样量与通量的关系

表 1 样品中的上样量

样品浓度	上样量	
	500 μ L 进样方式	2000 μ L 进样方式
1 mg/mL	0.5 mg	2 mg
5 mg/mL	2.5 mg	10 mg
20 mg/mL	10 mg	40 mg

大体积进样的局限性

体积超载能够提高纯化通量。但由于溶解样品的溶剂和流动相之间缺乏充分混合，目标物峰型将会受到影响。尤其，当溶解样品的溶剂具有比制备时的起始流动相有更高的洗脱强度时，体积过载将导致峰变宽（图 2）。表 2 描述了典型进样时的分析条件。高洗脱强度溶剂的大量进样对峰型的影响见图 3。由于溶剂影响，进样量为 2000 μ L 时峰型将变差。

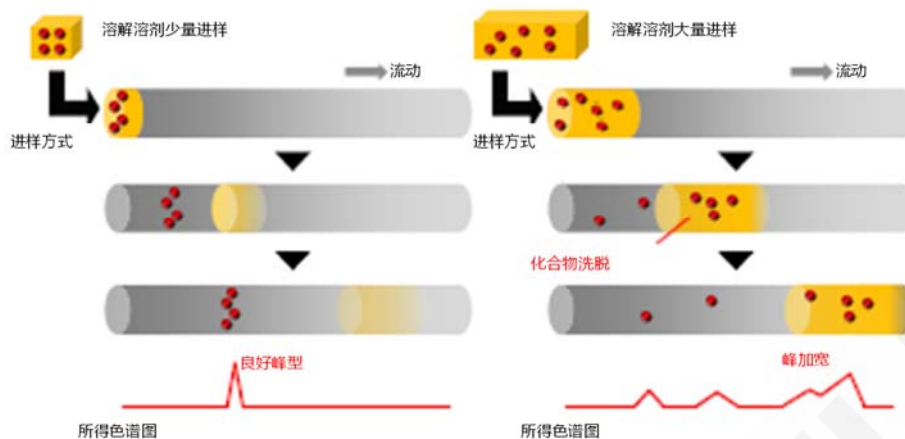


图2 进样量对峰形的影响

表2 典型进样的分析条件

色谱柱	:	Shim-pack™ GISS C-18 ¹ (100mm×20mm 内径, 5μm)
流动相	:	A: 水 B: 乙腈
流速	:	20mL/min
时间程序	:	B 浓度 5% (0 分钟) → 90% (4.5-6.5 分钟) → 5% (6.51-8 分钟)
柱温	:	环境温度
样品溶剂	:	二甲基亚砜 (DMSO)
分析物	:	5mg/mL 咖啡因、50mg/mL 磺胺二甲嘧啶
样品瓶	:	10mL 螺口小瓶 ^{**2}
检测器	:	PDA 250 nm

¹ P/N: 227-30066-02 ² P/N: 220-97331-09

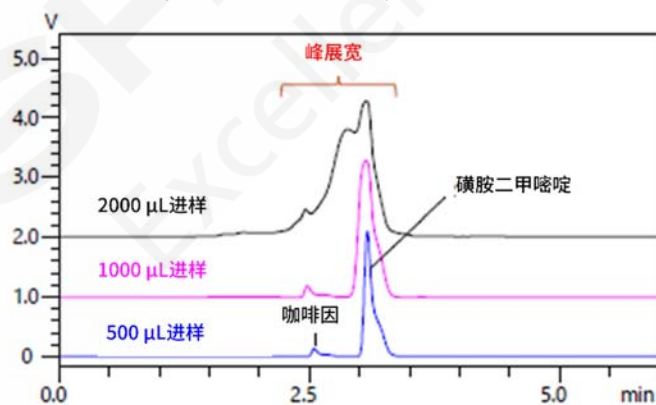


图3 不同进样量对两种化合物色谱峰形的影响

大体积的稀释进样方式

稀释进样是一种可改善大量进样时目标峰型的技术。用洗脱强度低于起始流动相的稀释剂稀释样品溶解溶剂，并在色谱柱的顶端（柱头）浓缩目标化合物。图4显示了使用稀释进样功能后改善的峰型。图5显示了典型进样和稀释进样之间的管路系统切换的流程图。

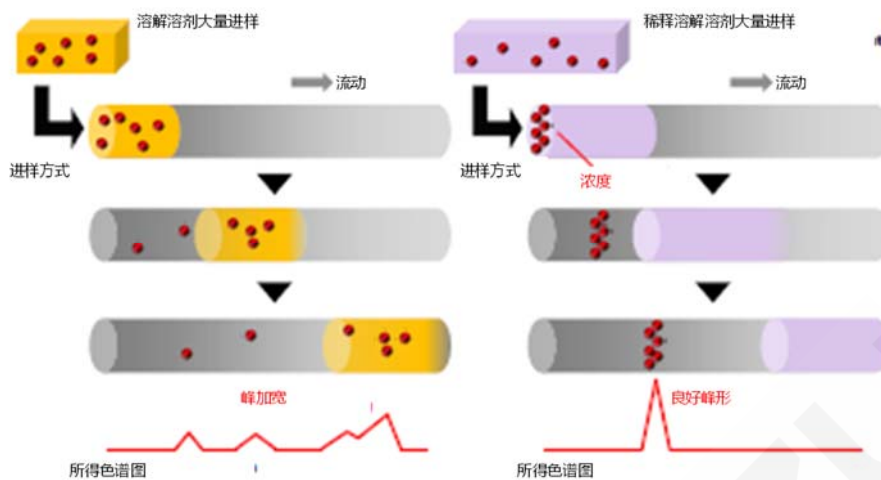


图4 稀释进样方式对大体积进样时峰形劣化的改善

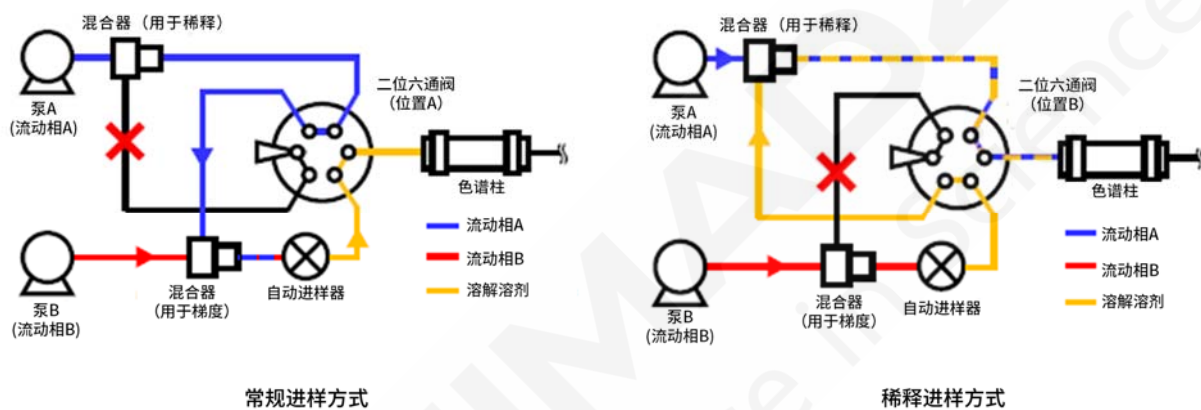


图5 常规进样方式和稀释进样方式流程图

咖啡因和磺胺二甲嘧啶稀释进样考察

在本研究中，我们使用咖啡因和磺胺二甲嘧啶作为稀释进样的目标化合物。表 3 显示了稀释进样的分析条件。所得色谱图如图 6 所示。典型进样显示两种化合物峰型加宽，而稀释进样能获得良好峰型和分离度。

表 3 稀释进样的分析条件

色 谱 柱	: Shim-pack GISS C-18 (100mm×20mmID, 5μm)
流 动 相	: A: 水; B: 乙腈
流 速	: 20mL/min
时 间 程 序	: B 浓度 5% (0-2.2 分钟, 稀释剂: 水) B 浓度 5% (0 分钟) → 50% (4.5 分钟) → 5% (4.51-6 分钟)
柱 温	: 环境温度
样 品 溶 剂	: 二甲基亚砷(DMSO)
分 析 物	: 5mg/mL 咖啡因、50mg/mL 磺胺二甲嘧啶
样 品 瓶	: 10mL 螺口小瓶
检 测 器	: PDA 250 nm

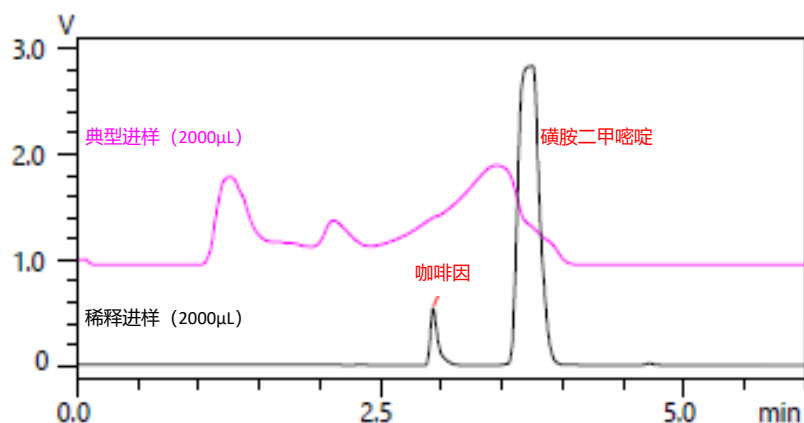


图6 相同进样体积下常规进样和稀释进样色谱图的表现

连续稀释进样

在稀释过程中，系统的另一能力是通过如图7中所述的连续进样实现大上样量。用如表3中所示的相同分析条件进行咖啡因和磺胺二甲嘧啶混合物的连续进样。在该过程中，通过连续五次进样将超过500mg的目标化合物引入分离柱中。所得结果显示实现了具有良好分离和峰型的较高上样量，如图8中所示。



图7 连续稀释进样示意图

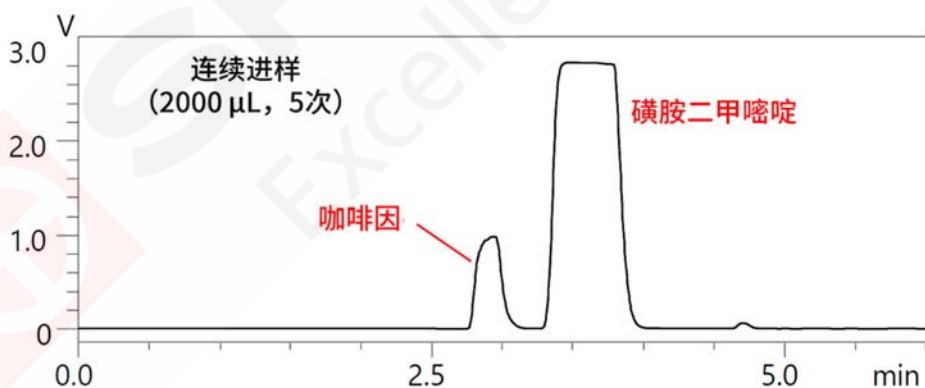


图8 连续稀释进样色谱图

结论

本文是大体积进样的一个实例。在大多数情况下，大体积进样会影响色谱峰的峰型和分离效果。具有常规进样和稀释进样切换功能的岛津 Nexera prep 系统将使具有大上样量的样品展现出更好的色谱行为。

附录 1 使用 LH-40 液体处理器优化制备流程

Nexera™ Prep 制备型纯化 LC 系统可为包括初步方法开发阶段在内的全套制备工作流程提供支持和优化。本文对 LH-40 液体处理器及 LabSolutions™ 控制软件的使用进行介绍，该系统可以简化条件的初步考查，规模放大至制备规模，优化制备参数，并能进行纯度检查。本文还阐述了如何扩展该系统进行大量样品的连续制备分离。

1. 分析规模的条件考查

对于制备型液相色谱，一个重要的初始步骤是确定要分离的目标化合物的量。该量可根据样品中目标化合物浓度及量进行估算，并后续用于制备系统和色谱柱的选择。大量目标化合物需要具有较大内径和较大装载量的色谱柱。

制备型液相色谱需要消耗大量流动相和样品，因此通常使用分析规模预先考查分离条件。LH-40 在制备型液相色谱系统中添加了一条分析液相色谱流动路径(图 1)。可将高达 400 μ L 的流动相注入分析流动路径，并能精确考查装载量。

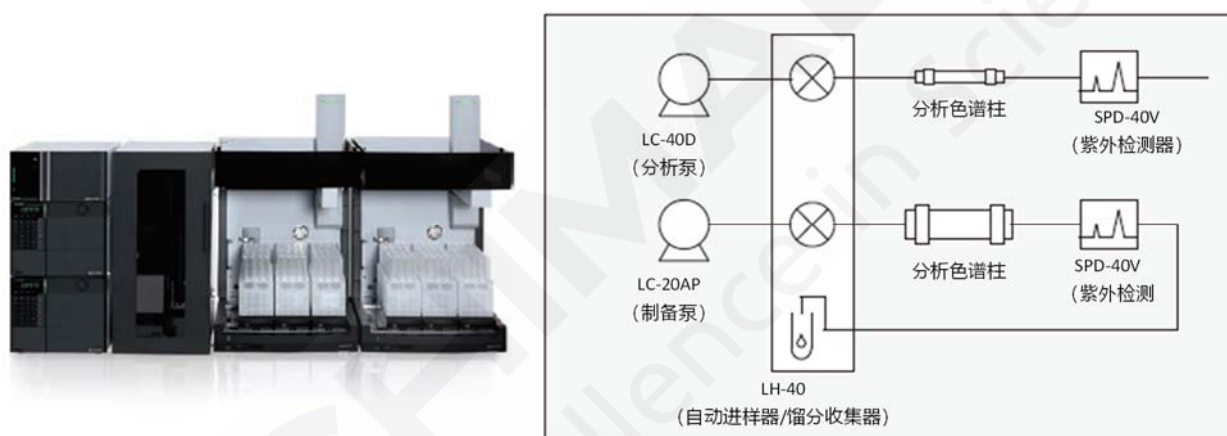


图 1 分析/制备组合系统及其流路示意图

2. 制备条件的优化

在根据分析规模考查分离条件之后，放大规模进行制备应用。在制备柱中采用相同的填料量实现相同分离，而流动相流量和装载量的增加与制备柱横截面面积的增加成正比。图 2 显示了在分析规模确定的装载量的规模放大示例。

将色谱柱的内径从 4.6mm 增加至 20mm，可使横截面积增加约 18.9 倍，因此需要将制备级流速设置为 19mL/min 或分析级流速的 19 倍。规模放大后，所得色谱图相同。

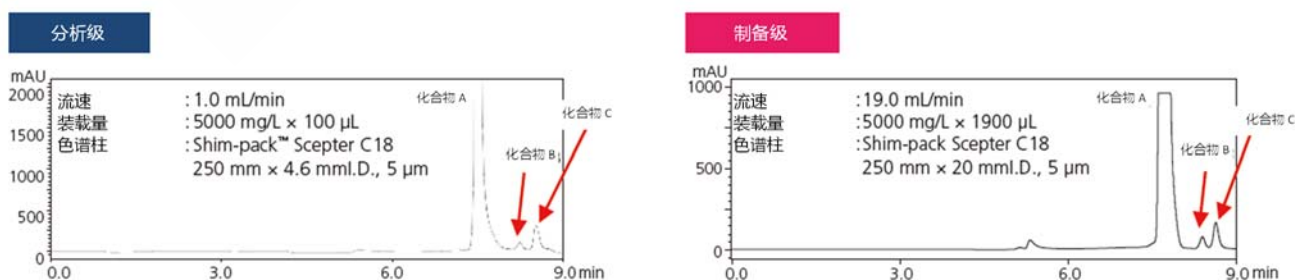


图 2 从分析级到制备级的规模放大示例

下一步是配置分馏参数。可以使用自动馏分收集、指定时间馏分收集或手动馏分收集进行分馏。

自动馏分收集包括设置峰检测信号斜率和强度阈值，并根据峰识别收集馏分。该方法独立收集馏分，而不受保留时间变化的影响。指定时间馏分收集是指预先设置洗脱时间范围，并根据洗脱时间范围收集馏分。当重复进行制备分离时，该方法可用于在预定时间段内收集馏分。

手动馏分收集涉及收集馏分的手动控制。操作人员可通过 LabSolutions 软件界面监控色谱图，只需轻轻按键一次即可收集馏分。LabSolutions 软件中的馏分收集功能可轻松设置所有收集参数。操作人员仅需要根据色谱图选择收集峰范围（如图 3 中的蓝色和绿色区域所示）参数即可，LabSolutions 软件能够自动计算收集馏分所需的信号斜率和阈值强度。也可基于指定峰范围的洗脱时间设置馏分收集。

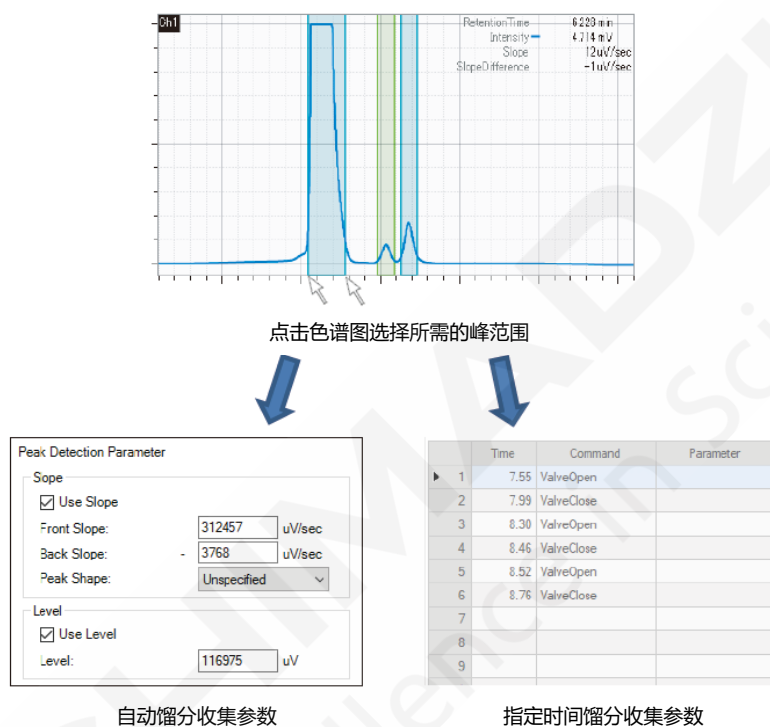


图 3 馏分收集参数的自动配置

3. 纯度检查

根据分析规模分析的收集馏分检查纯度。LC-40 可直接分析馏分，无需在分析过程中转移任何样品。图 4 显示了分馏前的色谱图和取得馏分后化合物 A、化合物 B 和化合物 C 馏分的色谱图。色谱图表明，各馏分均不含其他化合物，由各自目标化合物的高纯度馏分组成。

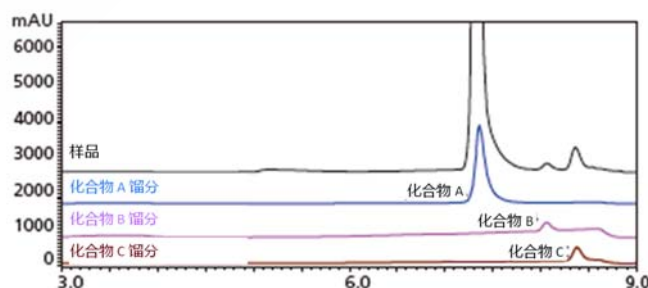


图 4 各馏分的纯度检查

4. 大量样品的多单元分析

最多可将六单元的 LH-40 液体处理器组合连接使用以实现更高工作流程效率(图 5)。组合连接使用时，

所有 LH-40 液体处理器单元均能够进样、收集馏分并检查所收集馏分的纯度。将多个 LH-40 液体处理器单元组合使用可实现对大量样品的连续制备分离和纯度检查。

例如，两个 LH-40 液体处理器可容纳多达 432 支 18mm 试管（图 6）。假设从每个样品中收集 5 个馏分，此配置允许多达 72 个样品依次分馏，然后将收集到的全部馏分进样到总共 360 支试管中，通过单一系统即可完成从进样到纯度检查的整个工作流程。

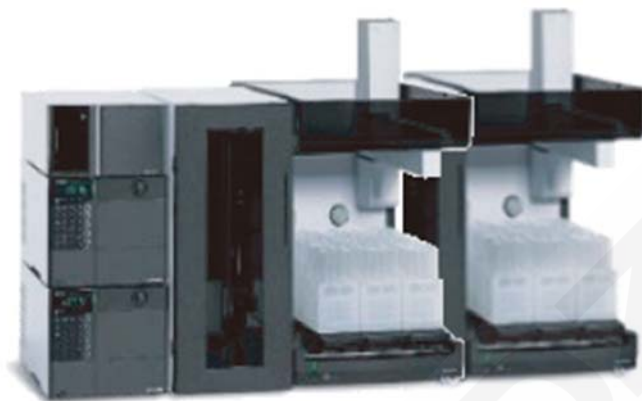


图 5 多单元液体处理器系统（两单元 LH-40 液体处理器组合）

显示 1 个样品中的 5 种化合物的制备分离的色谱图示例

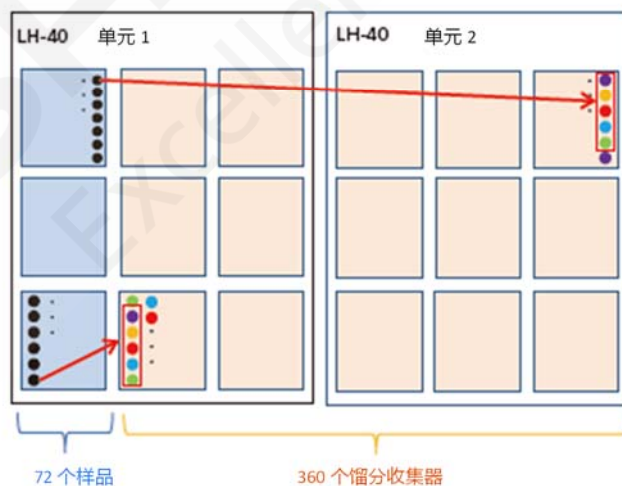
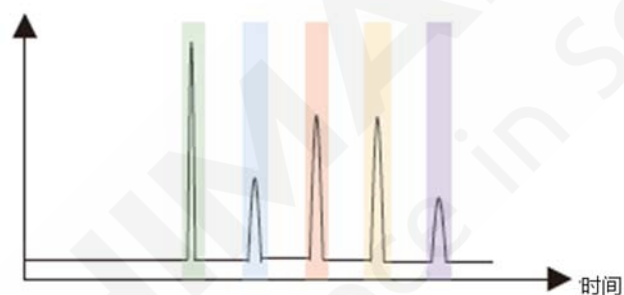


图 6 多重液体处理器系统示例

LH-40 液体处理器及 LabSolutions™ 控制软件的组合可实现简化、单一系统进行完整制备工作流程，从制备条件初步考查到优化制备参数到纯度检查。另外，最多可将六单元 LH-40 液体处理器组合连接并一起配合使用进行进样、收集馏分并检查所收集馏分的馏分纯度水平。将 LH-40 液体处理器组合使用可实现对大量样品进行连续制备分离和纯度检查。

附录 2 液体处理器 LH-40 基本操作

1. 基本设置

LH-40 集自动进样器功能和馏分收集器功能于一体的单元。可以自定义进样预处理或后处理,从而能够自由设置进样针和管路清洗工序及样品预处理。此外,可以根据目的在移液收集器上增设多种选配单元。

1.1 设置进样参数

启用进样功能

数据采集时间 时间程序 检测器 A 控制器 进样器 馏分收集器

启用进样器 (U)

进样设置

吸样速度 (S): 50 uL/sec

样品排液速度 (A): 100 uL/sec

气隙量 (G): 20.0 uL

清洗设置

清洗模式 (R): 进样前后

清洗速度 (N): 500 uL/sec

清洗液排液速度 (Z): 500 uL/sec

进样针外壁清洗液体积 (Y): 3000 uL

进样针内部清洗液体积 (I): 1500 uL

进样针浸渍时间 (T): 2 sec

预处理程序 (P) 设置...

后处理程序 (Q) 设置...

选择不同的进样器清洗模式。
【注意】不同的模式会影响单次运行时长。

通过预处理/后处理程序,可以对进样程序进行更改。

LC就绪 LHS就绪

样品名: LC
样品ID:
数据描述: LC
LC 分析时间: 7.46 / 1.00 min 检测器A Chi (210nm): 10nV 稳

仪器参数视图 常规 (默认) 结束时间: 1.00 min

数据采集时间 时间程序 原 检测器 A 柱温箱 控制器

启用进样器 (U)

进样设置

吸样速度 (S): 50 uL/sec

样品排液速度 (A): 100 uL/sec

气隙量 (G): 20.0 uL

清洗设置

清洗模式 (R): 进样前

清洗液吸液速度 (N): 500 uL/sec

清洗液排液速度 (Z): 500 uL/sec

进样针外壁清洗液体积 (Y): 3000 uL

进样针内部清洗液体积 (I): 1500 uL

进样针浸渍时间 (T): 2 sec

预处理程序 (P) 设置...

后处理程序 (Q) 设置...

预处理程序

命令列表

进样 (进样针定量环)

进样 (气隙)

吸入空气 (气隙)

吸入空气 (进样针定量环)

清洗

执行清洗 (浸渍)

清洗进样针外壁

清洗进样针内壁

时间

按照指定时间待机

高级操作

移动到主位置

预处理程序

8	按照指定时间待机	<input type="checkbox"/>	待机时间: 2.0 sec
9	进样针移动到进样管表面	<input type="checkbox"/>	到达进样管表面的距离: 0.00 mm
10	进样	<input checked="" type="checkbox"/>	注射器: A 吸液体积: 10.0
11	按照指定时间待机	<input type="checkbox"/>	待机时间: 2.0 sec
12	吸入空气 (气隙)	<input checked="" type="checkbox"/>	注射器: A 吸液体积: 20.0
13	吸入空气 (进样针定量环)	<input checked="" type="checkbox"/>	注射器: A 吸液体积: 1000.0
14	执行清洗 (浸渍)	<input checked="" type="checkbox"/>	清洗时间: 2 sec
15	将高压阀切换到进样侧	<input checked="" type="checkbox"/>	阀: A <input type="checkbox"/> 开始信号
16	执行清洗 (浸渍)	<input checked="" type="checkbox"/>	清洗时间: 2 sec
17	清洗进样针外壁	<input checked="" type="checkbox"/>	注射器: A 清洗体积: 3000.0
18	清洗进样针内壁	<input checked="" type="checkbox"/>	注射器: A 清洗体积: 1500.0

上一步 下一步 删除 全部删除 初始化 确定 取消

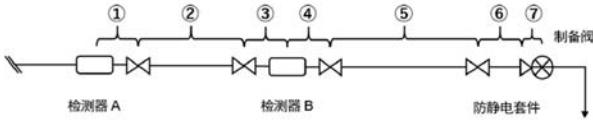
洗针模式选择：进样前

预处理程序勾选：在预处理程序默认步骤后（默认为 15 步），增加洗针命。

作用：进样动作结束后，开始信号采集，同时开始进行进样器清洗，节省单次运行时间。

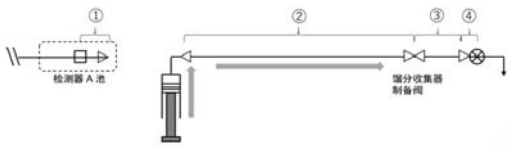
1.2 设置延迟体积

延迟体积为检测池中心到馏分收集器制备阀之间的体积，影响收集准确的重要因素。



延迟体积确定方法：
A. 延迟体积计算工具
标配制备流通池(分析池)+管路+制备级电磁阀，
延迟体积为 1626.4μL (1563.4 μL)
B. 实际测量

在检测器池出口端的二通上连接注射器，向出口端到制备阀喷嘴前端之间的管路内部注满水。



计算延迟体积 Ch-1
1 台检测器时不使用③~⑤

检测器(A)
检测器A: 自定义, 池类型: 自定义, 池中心-出口管前端: 0 μL
检测器B: 自定义, 池类型: 自定义, 入口管前端-池中心: 0 μL, 池中心-出口管前端: 0 μL

管路体积(B)
管路A: 内径(mm): 0.3, 管路长度(cm): 0, 管路体积: 0 μL
管路B: 内径(mm): 0.3, 管路长度(cm): 0, 管路体积: 0 μL

防静电套件管路(C)
内径(mm): 0.3, 管路长度(cm): 24, 管路体积: 16.9 μL

电路阀体积(D)
电路阀类型: 加量等级, 电路阀体积: 31 μL

检测器A的延迟体积: 47.9 μL 应用 = ①+②+③+④+⑤+⑥+⑦
检测器B的延迟体积: 47.9 μL 应用 = ④+⑤+⑥+⑦

1.3 样品台布局

样品台布局管理
Stage Layout List
样品台布局名称: 3x3, 4x3, 5x4
样品台布局

试验管架布局管理
Rack Layout List
试验管架布局名称: 10x6_4mL(FRC), 9x6_1.5mL(INJ), 3x2_50mL(FRC), 7x4_4mL(INJ), 4x3_15mL(FRC), 6x4_25mL(FRC), 6x4_32mL(FRC), 6x4_20mL(FRC), 2x2_4mL(INJ), 2x2_15mL(INJ), 12x8_MTP96(FRC), 12x8_DWP96(FRC), 10x6_3.5mL(FRC), 250mL(FRC), 500mL(FRC), 1000mL(FRC), 9x6_ID12(FRC)
试验管架布局名称: 10x6_4mL(FRC)
试验管架类型: [Icon]
试验管体积: 3.6 mL
试验管长度: 73.00 mm
开始位置: [Icon]
标注方式: AB 12, AB 123, 123
移动方向: [Icon]
偏移: [Icon]
FRC和INJ

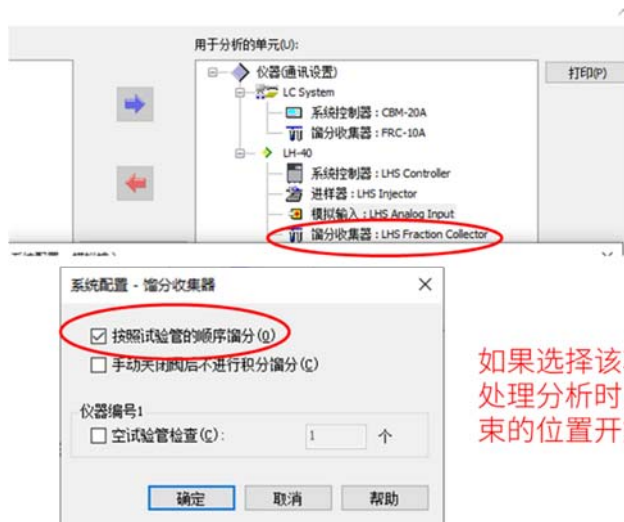
10 11 30 31 50 51
9 12 29 32 49 52
8 13 28 33 48 53
7 14 27 34 47 54
6 15 26 35 46 55
5 16 25 36 45 56
4 17 24 37 44 57
3 18 23 38 43 58
2 19 22 39 42 59
1 20 21 40 41 60

【注意】

试验管体积：馏分收集达到设置的试验管体积时，将会移动到下一个试验管开始收集。

2. 馏分收集命令

2.1 连续收集的设置



如果选择该项，则在执行批处理分析时，始终从上次结束的位置开始连续进行

2.2 收集参数

2.2.1 基本收集参数

基于时间方式：

依据馏分的保留时间及色谱峰峰宽，以时间作为馏分收集器的指令参数。

特点：参数设置方便，样品收益高、损失少，保留不稳定会影响纯度和收益。

命令：阀开/关

基于色谱峰方式：

根据色谱峰的强度和/或正负斜率作为馏分收集器的指令参数，触发馏分收集器。

特点：馏分纯度高，保留不稳定不会影响纯度和收益；需要设置参数，受色谱峰峰形改变的影响，样品收益低。

命令：常用“级别”（或称水平，Level），斜率（Slope）

基于质量数：

当 MS 检测器检测到含有目标质量数，且强度超过特定的阈值时触发馏分收集器。

特点：准确定位目标峰，制备效率更高，有益于得到更高纯度的馏分，特别适合含量低和 UV 响应弱的化合物分离纯化。需要提前输入目标物质量数进行监测。

【注意】

多种收集方式可以通过逻辑关系或者时间程序进行组合使用，达到最大收益效果。

2.2.2 斜率禁用级别

本功能可防止斜率判定使扩展峰或峰顶波动较大的峰精馏。输入信号超过设置的斜率禁用级别值后，仪器将无视斜率值的变化，继续馏分。使用相对斜率判定为开始馏分的峰高的百分比设置斜率禁用级别(%)。

级别

启用级别 (Y)

级别 (L): 1000 uV

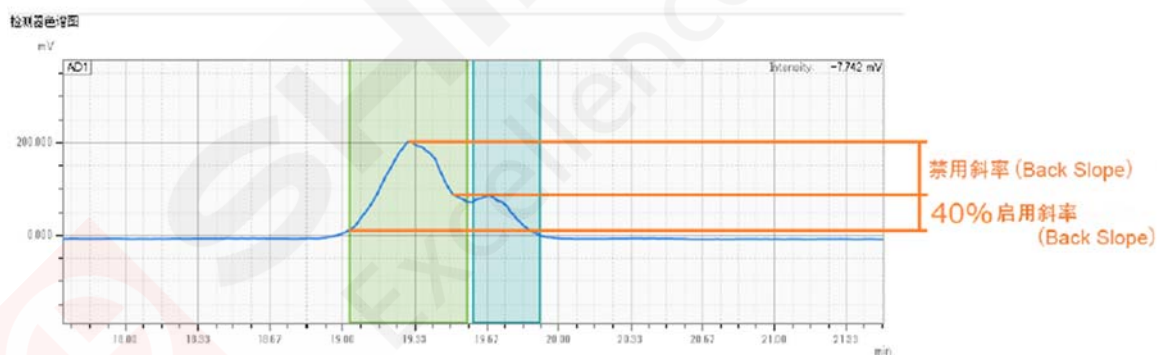
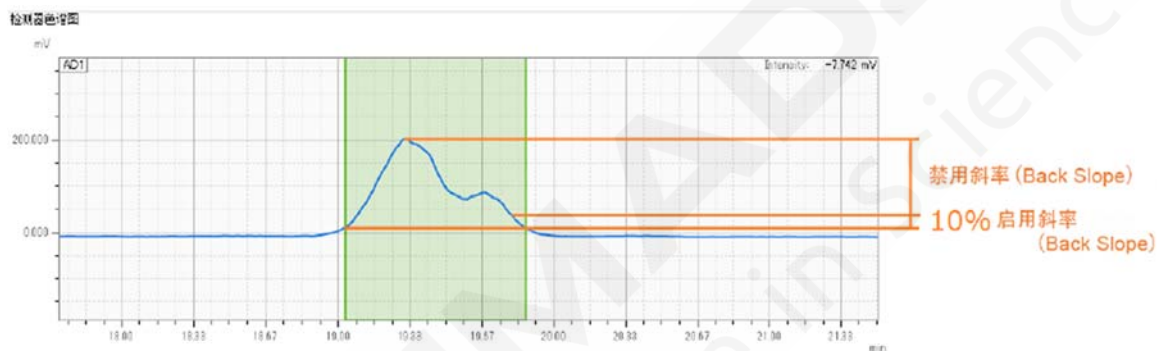
斜率禁用级别 (D) 10 %

峰判定灵敏度 (L): 3

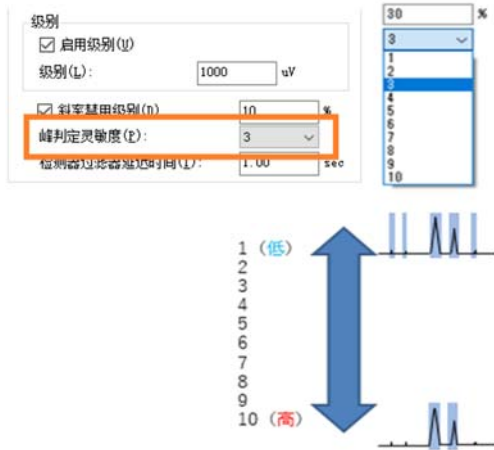
检测器过滤器延迟时间 (T): 1.00 sec

时间	处理命令	数值
1		
2		
3		

如果峰不完全分离，请使斜率禁用级别超过肩峰的高度。



峰判定灵敏度功能可防止因级别或斜率造成峰检测灵敏度下降而导致过度收集。LCMS 等存在噪音波动的色谱图可能在积分制备时错误地检测峰。本功能可以防止因峰判定灵敏度下降而导致检测错误,从而防止过度收集。



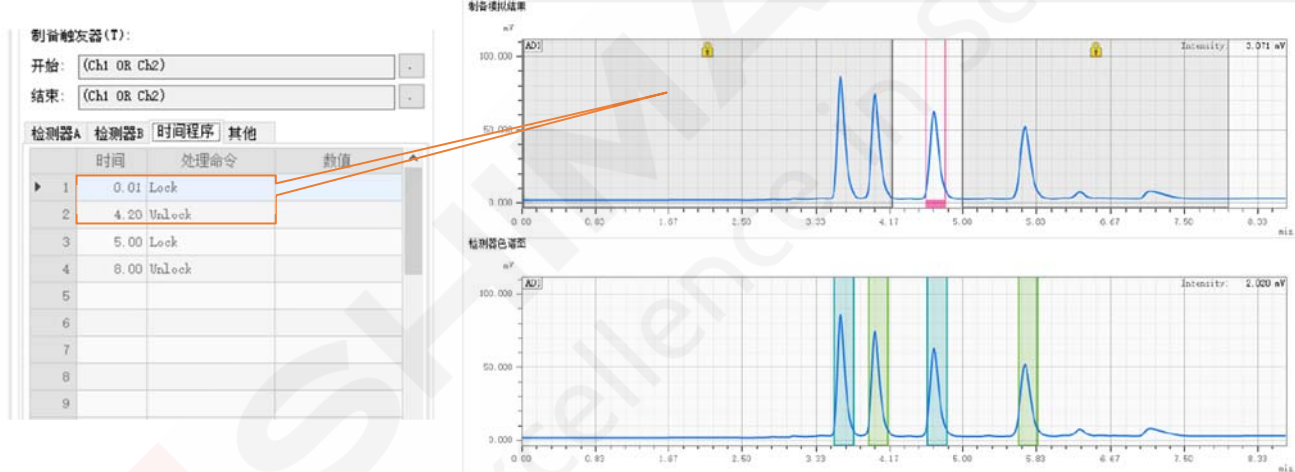
设置方法

- 在馏分收集器列表中的各检测器列表中设置峰判断灵敏度
- 峰判断灵敏度：**低**
尖锐的峰也会被准确回收。误分馏噪音的可能性增大。
- 峰判断灵敏度：**高**
噪音误分馏的情况减少。错过尖锐的峰的可能性增大。

2.2.3 时间程序

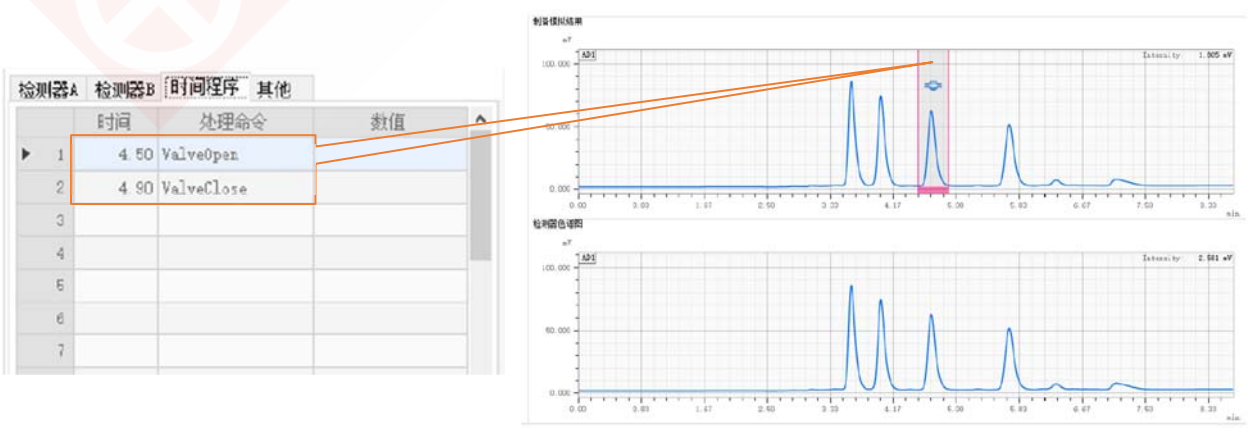
Lock/Unlock

对分析时间设置 Lock 后,在 Unlock 出现之前不会根据级别判定和斜率判定执行馏分收集动作。通过排除分析开始后的压力脉动区间及目标峰以外的杂质峰区间等无用区间,可以减少制备容器(如试验管)的消耗量。



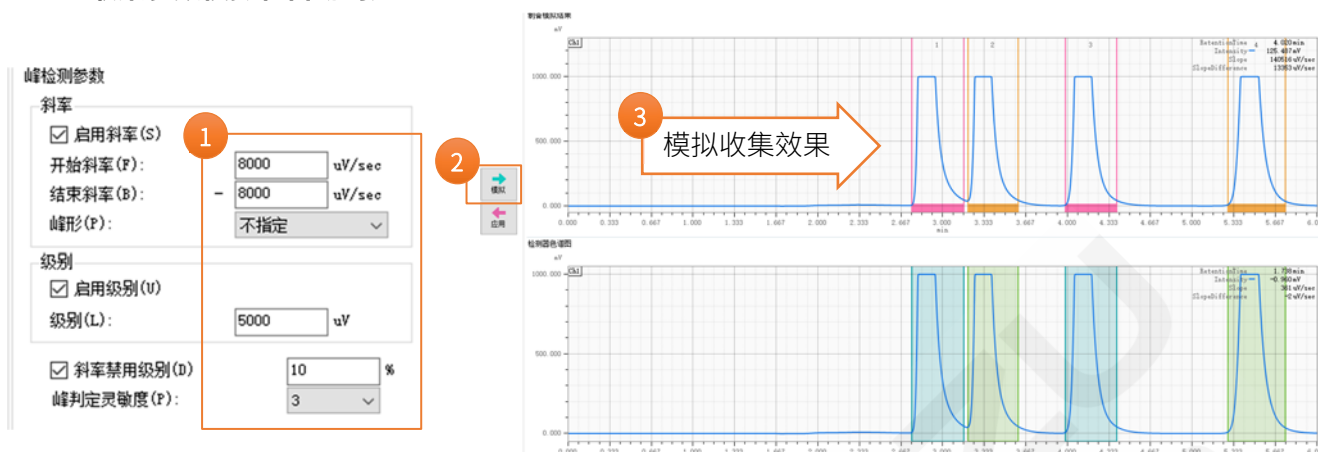
Valve open/Valve close

设置 Valve open 后可开始进行馏分收集阀。在 Valve close 时间后结束馏分收集。



【注意】收集阀的实际开关时间为设置的 Valve open/Valve close 命令时间和 Ch1 设置的延迟时间之和。

2.2.4 收集参数模拟和自动创建



加载拟收集的色谱数据后，通过对斜率和级别等参数的设置，可以一键模拟色谱峰收集的情况，从而对收集参数的精细化调整提供帮助，进而提高收集成功率。



通过对色谱峰积分结果的手动干预，可以直接作用到收集参数上，进而实现收集意图，操作步骤为：

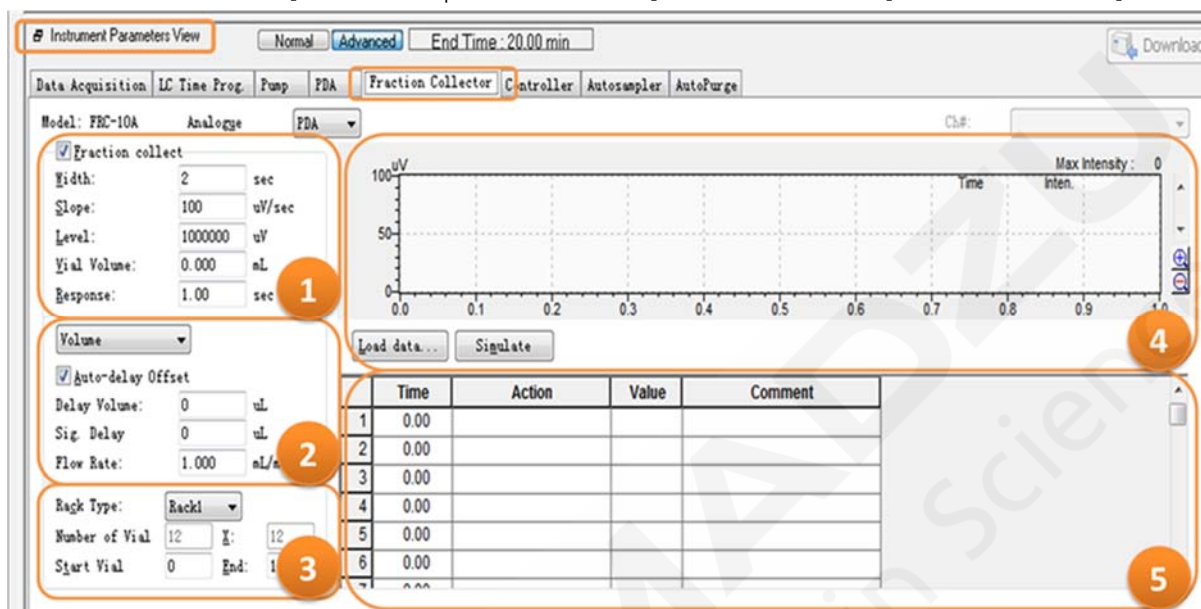
1. 打开拟进行收集的色谱图，选择色谱峰处理工具对目标峰区域进行选择；
2. 点击“应用”按钮；
3. 生成对应收集效果的收集参数，如斜率和级别的具体值
4. 自动生成的收集效果。

附录 3 馏分收集器 FRC-10A 基本操作

1. 基本参数设置

1.1 Fraction Collector 界面

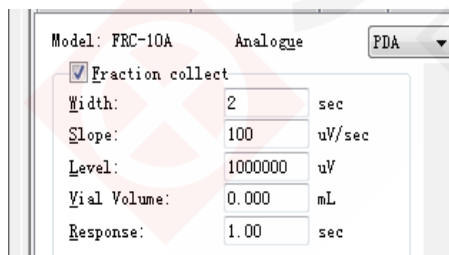
进入仪器参数视图[Instrument parameters view]，选择馏分收集器[Fraction Collector]选项卡



该界面由 5 部分组成：

1. 收集基本参数
2. 收集延迟设置
3. 馏分收集管设置
4. 收集结果模拟
5. 馏分收集时间程序

1.2 收集基本参数



- [Width]:从检测器读取的峰宽设置，执行积分操作。默认设置为 2 sec
- [Slope]:设置斜率参数，当检测到峰斜率大于设定值时，开始启动收集，小于该值时停止收集。
- [Level]:设置收集水平，当检测到峰高大于设定值时，开始启动收集，小于该值时停止收集。
- [Vial Volume]:设置每个收集管收集馏分的体积。一般为管容积的 80%。
- [Response]:纠正检测器的响应延迟。与检测器的响应值设置一致。

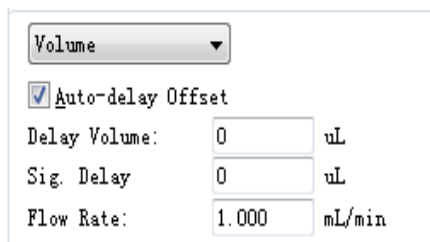
【注意】：

1. 为避免收集异常，[Width]的设定值最小为 2。收集的时间间隔也由该值决定，如果使用时间程序设定命令间隔为 0.01 min，则该值不得大于 5。

2. 当[Slope]和[Level]同时设置参数时，为逻辑与关系，即同时满足[Level]和[Slope]的条件时才启动收集，有一个值低于设定参数时收集便停止。如果仅以[Slope]收集，则[Level]值设定为-4500；如果仅以

[Level]收集，则[Slope]设置为 0。为防止收集异常，[Level]值设定需>1000 uV。

1.3 收集延迟设置

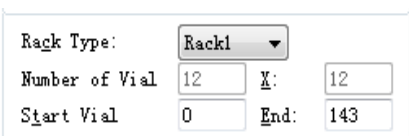


- 收集延迟计算方式可选择延迟体积[Volume]和延迟时间[Delay time]两种方式，为了方便测算，一般使用延迟体积。
- [Aotu-delay Offset]:勾选后，工作站按照输液泵[Pump]选项卡下设定的流速[Total Flow]和此处设定的[Delay Volume]自动计算延迟时间。
- [Delay Volume]:检测器流通池的中心到馏分收集头末端之间的容积。
- [Sig.Delay]:串联检测器的情况下，两个检测器间的延迟

【注意】

勾选[Aotu-delay Offset]，自动根据输液泵设定的总流速计算延迟时间，不用设置[Flow Rate]，方便使用流速不同的方法，建议勾选使用。

1.4 馏分收集管设置

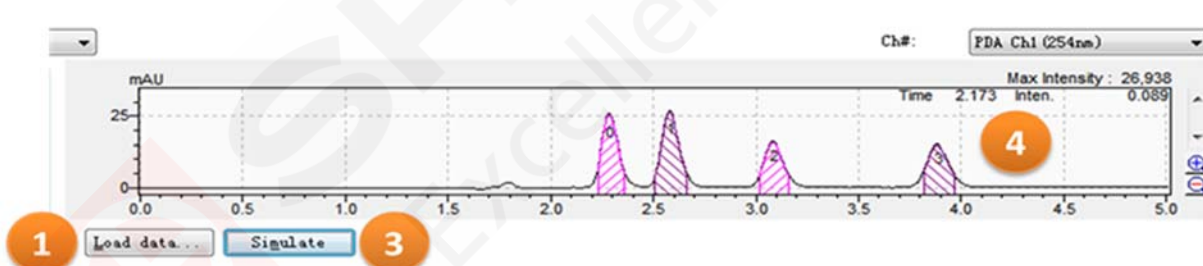


- [Rack Type]:收集架的类型。
- [Nuber of Vial Y] [Nuber of Vial X]:X 和 Y 方向的管号。
- [Start Vial][End Vial]开始和结束收集的管号。

【注意】

1. 根据实际使用的收集架类型选择对应的[Rack Type]，以避免收集错误造成馏分损失。
2. 使用岛津标准的[Rack1]-[Rack5]时，[Nuber of Vial Y] [Nuber of Vial X]不可更改。
3. 收集管号[Start Vial]默认为 0，即每次收集均从 0 号管开始。当该值设置为-1 时，收集开始管数将延续上一次收集结束时的管号。

1.5 馏分收集模拟



馏分收集模拟对 1.2 和 1.4 中设置的参数对收集的影响进行模拟，操作如下。

- 1.加载需要进行模拟的数据文件
- 2.根据需要选择检测通道
- 3.点击模拟
- 4.观察预测的馏分收集结果

【注意】

实际制备分离进行时由于基线漂移等因素造成实际收集结果与模拟有差异时，需通过调整 1.2 中的设置使实际收集更趋合理。

1.6 馏分收集时间程序

	Time	Action	Value	Comment
1	0.33	Lock	Lock	
2	0.00	Lock		
3	0.00	Slope		
4	0.00	Level		
5	0.00	Slope Override		
6	0.00	Valve Open		
6	0.00	Valve Close		
7	0.00	Initial Vial		

通过收集时间程序，可以实现多条件的收集方式。

1. 设置时间程序的时间节点，设置范围 0.33-9999.9 min
2. 收集命令
3. 命令参数

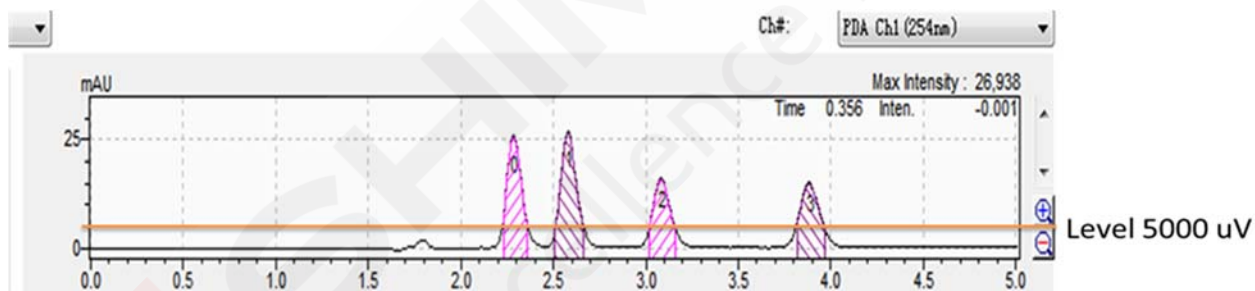
【注意】：

1. 收集时间程序只在设定的时间节点范围内起作用
2. 收集时间程序的优先级高于 1.2 中的设置

2. 馏分收集参数的应用

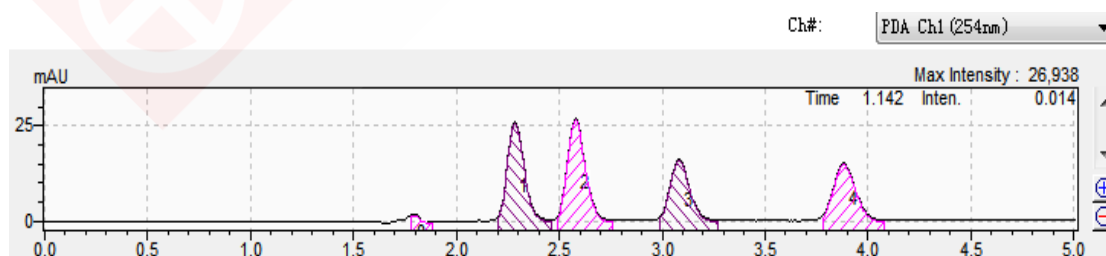
2.1 Level 收集

设置 Level 为 5000 uV，slope 为 0。



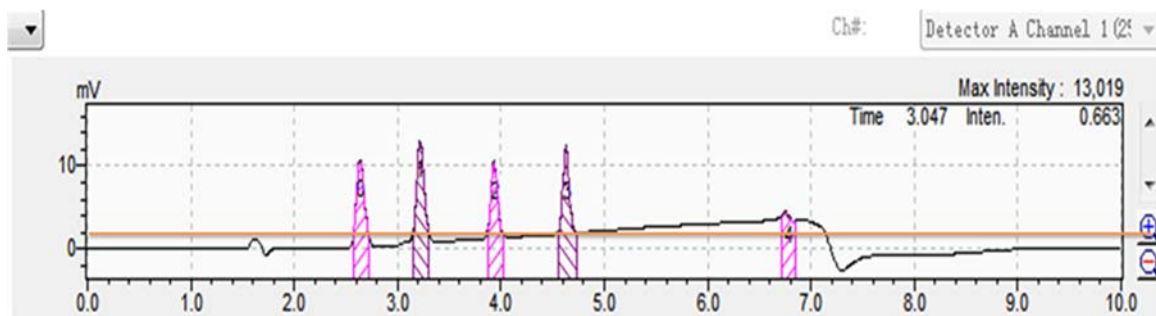
2.2 Slope 收集

设置 Slope 为 500 uV/sec，Level 为-4500 uV。



2.3 Level 和 Slope 收集

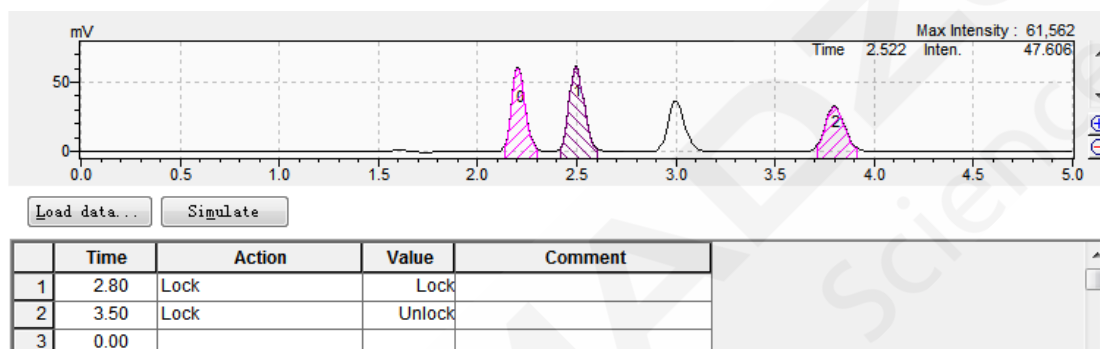
设置 Slope 为 200 uV/sec，Level 为 2000 uV。



2.4 时间程序的应用

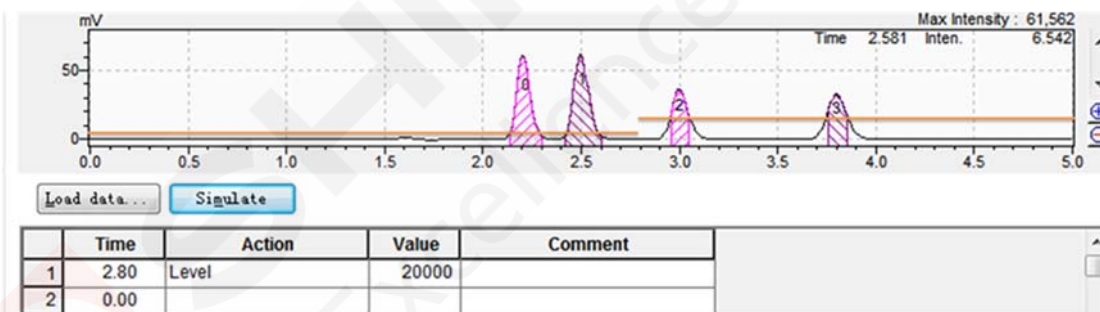
2.4.1 Lock

基本参数设置 Slope 为 500 uV/sec, Level 为 3000 uV。



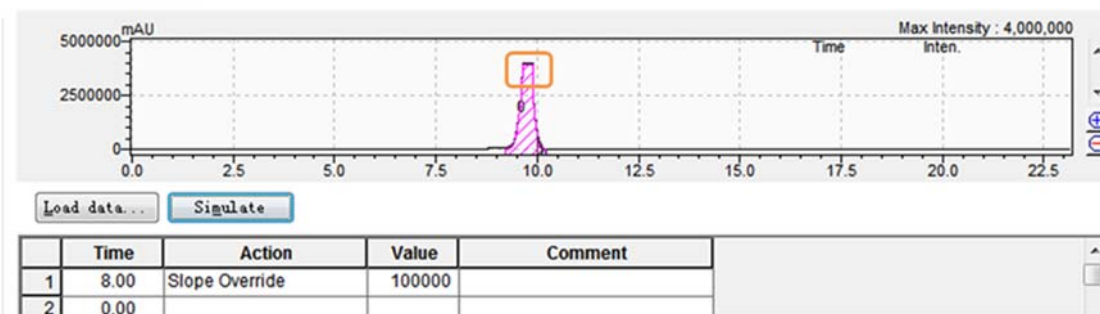
2.4.2 Slope 和 Level

目的在到达时间节点时替换之前基本参数设置的 Slope 或 Level。



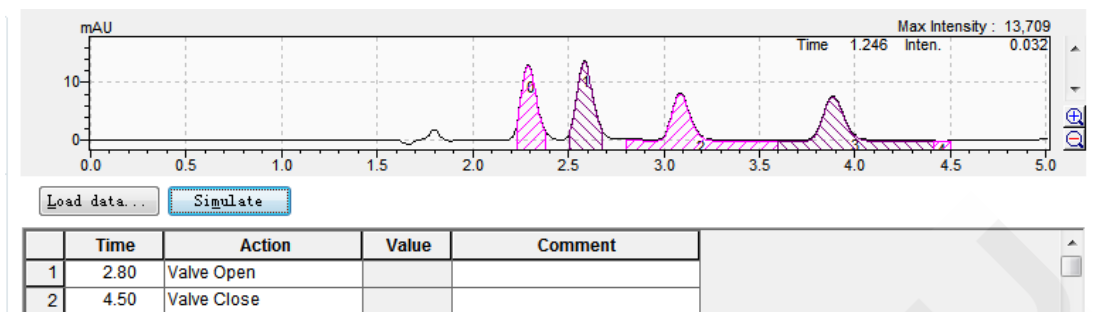
2.4.3 Slope override

如下图, 当出现平头峰时, 斜率的变化将低于设定的 Slope, 在原有设定 Slope 为 500 uV/sec 情况下, 收集会出现停止。设置[Slope Override]为 100000, 即当峰高高于 100000 uV 时, Slope 将不起作用, 满足[level]设定便可以收集。



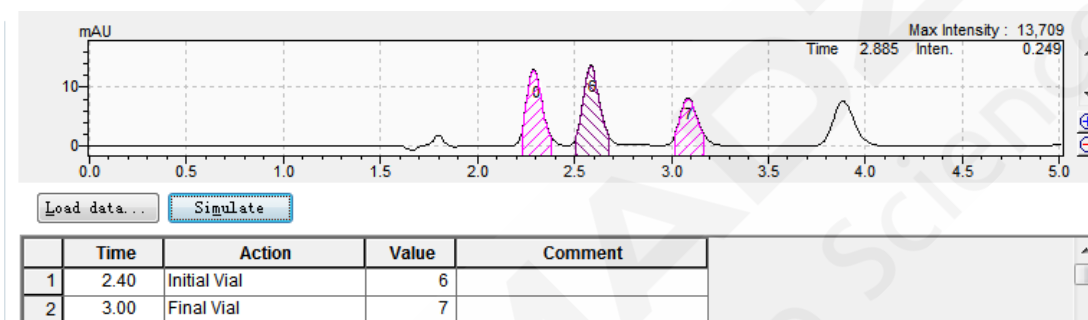
2.4.4 Valve on 和 Valve off

在设定的[Valve on]和[Valve off]时间点之间，收集阀打开，无条件收集。



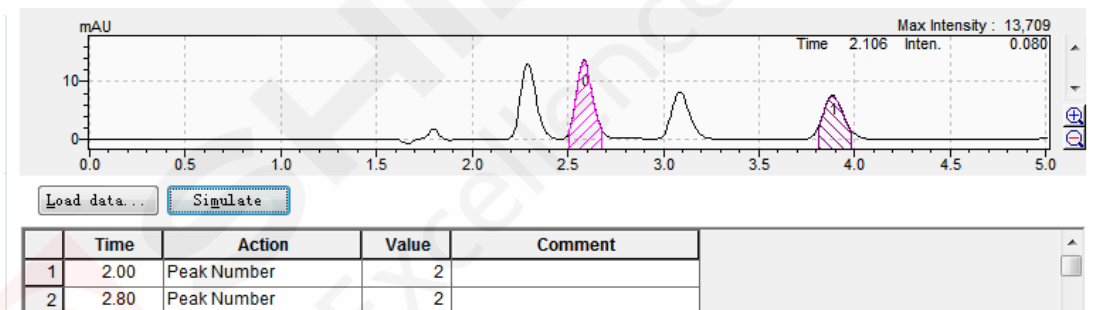
2.4.5 Initial 和 Final

根据时间重新制定收集的起止管数。



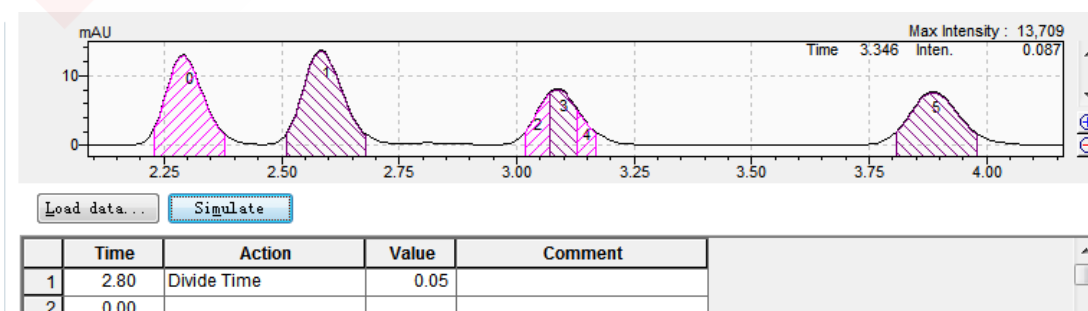
2.4.6 Peak number

收集在设定的时间点后峰号匹配的色谱峰。



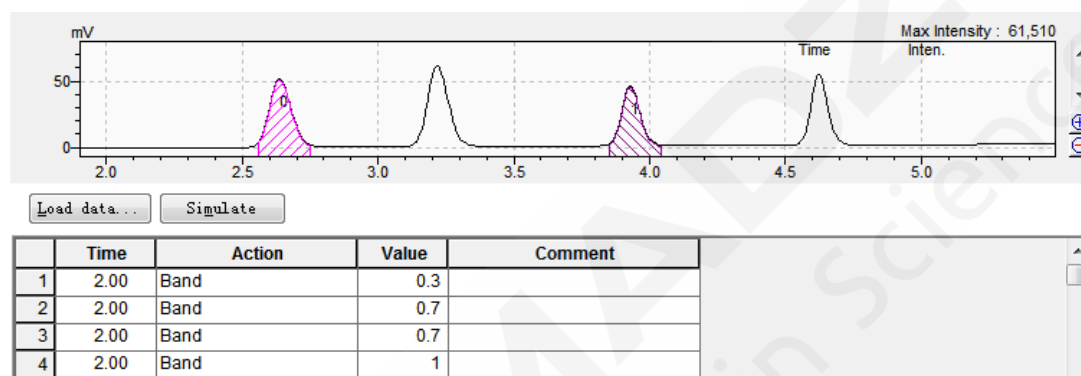
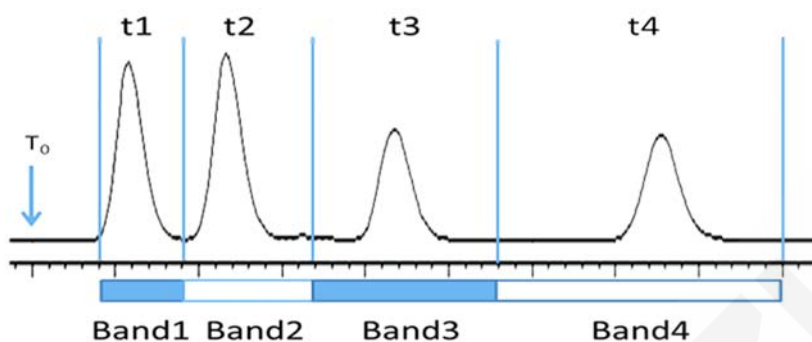
2.4.7 Divide time

将设定时间后距离最近的峰按照设定的[Divide Time] 0.05 min 分管收集，即收集 0.05 min 后切管收集。参数范围 0.05-9999.99 min。



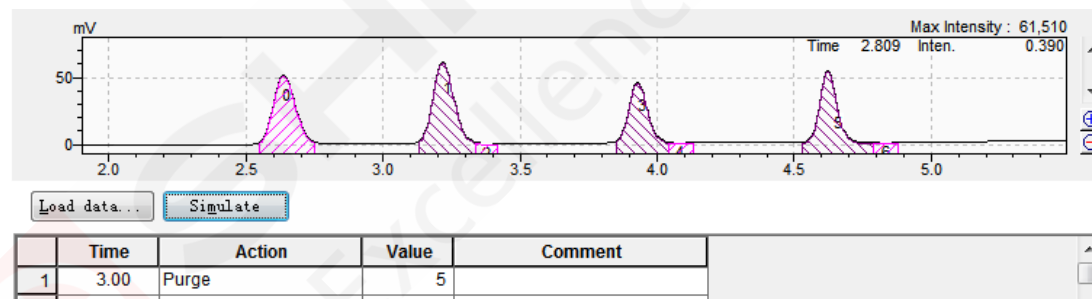
2.4.8 Band

在设定的时间 T_0 后，当检测到满足收集条件色谱峰时开始计时，到 t_1 时为 Band1，经过 t_2 时间为 Band2，依次产生 Band3，Band4。收集特点为 Band1，Band3 收集，Band2，Band4 不收集。



2.4.9 Purge

设定冲洗馏分收集头时间，参数范围 0-300 sec。



分析测试仪器客服热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

本公司在此对中国地图标注信息的行为仅限于表明本公司在中国各地分支机构区域分布状况, 不作为任何测绘、绘制或其他用途。

本产品资料所宣传的内容, 以本版本为准, 资料中的试验数据除注明外均为本公司的试验数据。本资料所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知。

印刷日期: 2024

岛津企业管理(中国)有限公司 / 岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14层
邮政编码: 100020
电话: (010)8525-2310/2312 传真: (010)8525-2531

沈阳

沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11层
邮政编码: 110016
电话: 024-23255577 传真: (024)2325-5577

西安

西安市锦业一路56号研祥城市广场A座501
邮政编码: 710065
电话: 029-62737878 传真: (029) 6273-7879

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14H座
邮政编码: 830002
电话: (0991)230-6271/6272 传真: (0991)230-6273

郑州

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室
邮政编码: 450007
电话: (0371)8663-2981/2983 传真: (0371)8663-2982

上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫慧享城B2栋
邮政编码: 200233
电话: (021)3419-3888 传真: (021)3419-3666

成都

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞·创意成都写字楼
邮政编码: 610063 B座12层
电话: (028)8619-8421/8422 传真: (028)8619-8420

南京

南京市鼓楼区汉中路2号亚太商务楼27层B座
邮政编码: 210005
电话: (025)8689-0258 传真: (025)8689-0237

重庆

重庆市渝中区长滨路2号来福士A座601
邮政编码: 400011
电话: (023)6380-6057 传真: (023)6380-6551

武汉

武汉市武昌区临江大道96号武汉万达中心31层3112室
邮政编码: 430060
电话: (027) 5908-0488 传真: (027) 5908-0470

广州

广州市天河区高唐路230号广电智慧大厦
邮政编码: 510656
电话: (020) 3718-3888 传真: (020) 3718-3804

昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店 908室
邮政编码: 650021
电话: (0871)6315-2986/2987 传真: (0871)6315-2991

深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼 F2.6-1C
邮政编码: 518040
电话: (0755)8340-2852 传真: (0755)8389-3100

长沙

湖南省长沙市芙蓉区解放西路188号国金中心T1大楼3115室
邮政编码: 410005

香港

香港九龙尖沙咀海洋中心1028室
SUITE 1028, OCEAN CENTRE, HARBOUR CITY,
TSIM SHA TSUI, KOWLOON, HONG KONG
电话: (00852)2375-4979 传真: (00852)2199-7438

株式会社 岛津制作所

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
电话: 81(75)823-1111 传真: 81(75)811-3188
URL: <http://www.shimadzu.com>

本书中所记载的公司名称、产品服务名称及商标均为株式会社岛津制作所
的注册商标或商标。本书中有未标明 TM 标志和 © 标志之处。
本书中所使用的其他公司的商号、商标的所有权非株式会社岛津制作所所有。