

开发用于分离和纯化的聚焦梯度

Jo-Ann M. Jablonski, Thomas E. Wheat and Diane M. Diehl ;
Waters Corporation, Milford, MA, U.S.

引言

用于进行分离和纯化的色谱分离方法与分析型分离方法受到相同物理和化学原理的制约。然而，在制备型试验中，科学家通常在大型柱上和高质量负载下分离化合物，并需要更高的分离度以提高所收集组分的纯度和回收率。虽然设计更缓的梯度是提高分离度的一种较好的首选方法，但改变整个分离过程的梯度斜率可导致峰宽加大和总运行时间增加。可替代普通更缓梯度的聚焦梯度仅对需要增加分离度的色谱图部分减小梯度斜率，从而可在不增加总运行时间的情况下提高对洗脱时间接近的色谱峰的分离度。聚焦梯度可根据搜索运行或者直接从第一次制备运行进行定义。

试验方法

梯度开发步骤

- 确定制备规模的系统体积
- 运行搜索梯度
- 设计聚焦梯度
- 在制备柱上运行聚焦梯度

试验条件

仪器

液相色谱系统：沃特世 2525型二元梯度模块、2767型样品管理系统、系统流路组织器、2996型光电二极管阵列检测器、AutoPurification™流通池

色谱柱：XBridge™制备型OBD™ C₁₈柱19 x 50 mm、5μm (货号186002977)

流速：25mL/分钟

流动相A：0.1%的甲酸水溶液

流动相B：0.1%甲酸-乙腈溶液

波长：260 nm

样品混合物

磺胺：10 mg/mL

磺胺噻唑：10 mg/mL

磺胺二甲嘧啶：20 mg/mL*

磺胺甲二唑：10 mg/mL

磺胺甲唑：10 mg/mL

磺胺二甲异唑：4 mg/mL

总浓度：64 mg/mL (溶于二甲基亚砜)

*选定用于聚焦梯度的色谱峰

结果和讨论

确定制备规模的系统体积

- 取下色谱柱并更换成两通。
- 流动相A使用乙腈，流动相B使用包含0.05 mg/mL尿嘧啶的乙腈 (解决了非加成性混合和粘滞问题)。

在254 nm下进行监测。

沃特世科技(上海)有限公司
上海：上海市浦东新区张东路1387号41栋01室
北京：北京市朝阳区铜牛国际大厦光华路15号院2号楼9层
广州：广州市荔湾区中山七路50号西门口广场1707-08室

免费售后服务热线：800(400) 820 2676  www.waters.com

邮编：201203  +86 21 6156 2666  +86 21 6879 4588
邮编：100026  +86 10 5209 3866  +86 10 5293 2298
邮编：510170  +86 20 2829 6555  +86 20 2829 6556

- 采集100% A的基线数据5分钟。
- 在5.01分钟时，将梯度设置为100% B并再采集5分钟数据。
- 测定100% A和100% B之间的吸光度差异。
- 计算存在50%吸光度差异时的时间。
- 计算步骤开始时（5.01分钟）和50%时间点之间的时间差异。
- 将时间差异乘以流速。

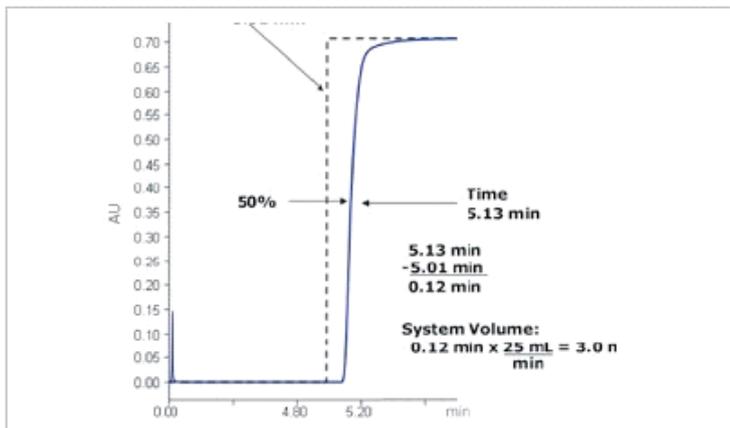


图1 系统体积的确定。

系统体积被定义为从梯度形成点到色谱柱前端的体积。系统体积用于聚焦梯度的设计。如图1所示，本试验所用仪器配置下的系统体积是3.0 mL。

运行样品的搜索梯度

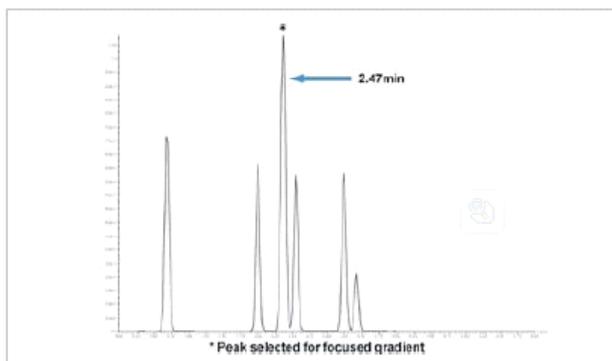


图2 六种化合物组成的样品混合物的制备色谱图。色谱方法在初始条件下存在0.39分钟的保留。梯度在5分钟内洗脱5-50% B。

设计聚焦梯度

第1步

在2.47分钟洗脱3号色谱峰的溶剂浓度在较早的时间点上形成。如图3所示，检测器和梯度形成点之间的偏移量等于系统体积加上柱体积。用于这台特定系统的偏移量等于早期确定的3 mL系统体积再加上19 x 50 mm制备柱的体积（11.9 mL），即14.9 mL。在25 mL/分钟的流速下，溶剂浓度到达检测器需要0.59分钟。2.47分钟的洗脱时间减去0.59分钟的偏移时间等于1.88分钟。由于初始大规模梯度有0.39分钟的保留时间，因此形成洗脱色谱峰的乙腈百分比的时间是1.88分钟减去0.39分钟，即1.49分钟。

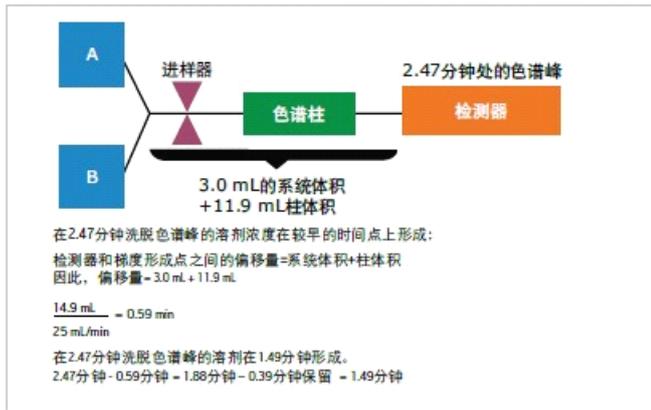


图3 偏移量计算的系统示意图。

第2步

计算在2.47分钟洗脱色谱峰的乙腈百分比。原始大规模梯度在5分钟内洗脱 5-50% B，最初梯度的驻留时间为0.39分钟。

$$\frac{45\%}{5 \text{ min}} = 9\% \text{ per min}$$

并且

$$\frac{9\% \times 1.49 \text{ min}}{\text{min}} = 13.4\% \text{ 乙腈}$$

计算乙腈百分比的另一种方法：

$$\frac{1.49 \text{ min} \times 45\%}{5.00 \text{ min}} = 13.4\% \text{ 乙腈}$$

根据在2.47分钟洗脱出色谱峰的梯度计算得到的乙腈百分比是13.4%，但由于梯度开始于5%乙腈，因此洗脱该峰的乙腈实际浓度是13.4% + 5%，或者说18.4%乙腈。

第3步

旨在分离梯度中部洗脱时间接近的色谱峰的聚焦梯度应开始于原始小规模试验条件，通常为 0-5% B。进样开始后应立即将梯度快速增加至比能洗脱目标峰的预期乙腈百分比浓度低5%的乙腈百分比。在搜索梯度中所用的1/5斜率下继续进行缓的聚焦梯度部分。预计一个五倍的更缓梯度可为洗脱时间接近的色谱峰提供更高的分离度。终止高出可洗脱目标峰的预期乙腈百分比浓度5%的聚焦梯度部分。原始梯度在5分钟内洗脱5-50% B，或者说在5分钟内梯度变化45%。这样，乙腈浓度每分钟变化9%（从9%-10%左右简化得到）。然后，新的梯度斜率应为10%的1/5，或者说每分钟变化2%。10%的乙腈浓度改变通过每分钟变化2%而达到，说明用于分离3号和4号峰的聚焦梯度时间片段应持续5分钟。一旦梯度的聚焦部分完成，乙腈百分比快速增加至95% B，以清洗色谱柱。平衡色谱柱后，终止初始条件下的梯度。5-45% B = 每分钟9%（舍入至每分钟10%）梯度斜率每分钟变化2%。

$$10\% \text{ 乙腈} \times \frac{1 \text{ min}}{2\%} = 5 \text{ min}$$

用于分离2.47分钟处色谱峰的新型聚焦梯度：

时间	流速	A%	B%
0	25	95	5
1	25	86.6	13.4
6	25	76.6	23.4
7	25	5	95
7.4	25	5	95
7.5	25	95	5
10.5	25	95	5

相比于搜索梯度的聚焦梯度

搜索梯度

时间	流速	A%	B%
0	25	95	5
0.39	25	95	5
5.39	25	50	50
5.89	25	5	95
6.89	25	5	95
7.39	25	95	5
10.50	25	95	5

聚焦梯度

时间	流速	A%	B%
0	25	95	5
1	25	86.6	13.4
6	25	76.6	23.4
7	25	5	95
7.4	25	5	95
7.4	25	95	5
10.50	25	95	5

运行聚焦梯度

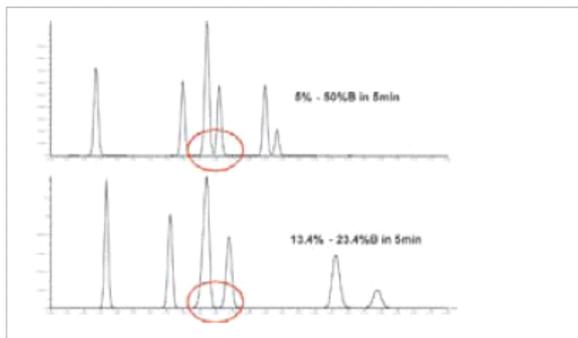


图4 靠上的图谱——用搜索型制备梯度（5分钟洗脱5%-50% B）分离六种化合物组成的混合物。靠下的图谱——用聚焦大规模梯度（5分钟洗脱13.4%-23.4% B）分离六种化合物组成的混合物（分离3号峰和4号峰）。

聚焦梯度可明显提高图4所示色谱图中3号峰和4号峰的分度度。5号峰和6号峰因受到梯度聚焦部分的影响而出现移位，梯度部分继续在较缓的斜率下洗脱化合物，直至设定用于进行柱清洗的较高百分比的乙腈进入色谱柱。较缓的聚焦梯度能在不增加运行时间的情况下对天然混合组分提供更高的分离度，因而使色谱分析师能够获得更纯的产物和更好的回收率。

结论

当科学家为后续试验进行产物纯化时，需要在高质量负载下分离化合物。聚焦梯度可在不增加运行时间的情况下提高对洗脱时间接近色谱峰的分度度，从而改善分离效果。系统体积信息可以对制备型梯度进行直接优化。使用聚焦梯度可提高产物产率和纯度，同时不会增加溶剂消耗量和废液生成量。聚焦梯度方法可实现分离，因而有助于控制纯化成本。

关于沃特世公司 (www.waters.com)

50 多年来，沃特世公司(NYSE:WAT)通过提供实用和可持续的创新，使医疗服务、环境管理、食品安全和全球水质监测领域有了显著进步，从而为实验室相关机构创造了业务优势。

作为一系列分离科学、实验室信息管理、质谱分析和热分析技术的开创者，沃特世技术的重大突破和实验室解决方案为客户的成功创造了持久的平台。2010 年沃特世拥有 16.4 亿美元的收入和 5,400 名员工，它将继续带领全世界的客户探索科学并取得卓越成就。