

UPC² 方法放大到SFC的策略：应用于制备色谱

Christopher J. Hudalla,¹ Abhijit Tarafder,¹ Jo-Ann Jablonski,¹ Roman Roshchin,¹ Kenneth J. Fountain,¹ Manisha A. Patel,²

Mark A. Hardink,² Tony Yan² 和 Frank W. Riley²

¹沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

²辉瑞公司(美国康涅狄格州格罗顿)

应用优势

- 基于密度调整的放大策略可在不同的系统/色谱柱配置之间高效地进行方法转移。
- 实现SFC分析级应用的快速方法开发，随后可转移至制备型SFC，同时维持色谱完整性。
- 集中梯度的使用有利于目标分析物的纯化。

沃特世解决方案

[ACQUITY UPC²™系统](#)

[Prep 100q SFC系统](#)

[ACQUITY UPC² BEH 2-EP色谱柱](#)

[ACQUITY UPC² BEH色谱柱](#)

[ACQUITY UPC² CSH™氟苯基柱](#)

[Viridis® BEH 2-EP色谱柱](#)

[LCMS认证最大回收样品瓶](#)

关键词

UPC², SFC, 制备, 缩放, 方法转移, 方法开发, 纯化, 手性

简介

在一份先前的应用纪要中，密度调整作为一种有效的放大SFC分离方法被用于制备型SFC纯化¹。这一策略所基于的原理是，使用CO₂作为主要流动相组分进行分离时，分析物保留因子受到流动相密度和温度的显著影响。通过调整流动相的密度进行放大分离，使其接近初始分离的平均密度，获得可预测的分离效果，并维持初始分离色谱完整性。密度的调整可通过以下方式获得，以适当的方式调节任何会影响整个分离系统压力的参数，进而调节流动相的密度来实现，例如改变自动背压调节器(ABPR)设置、流速或色谱柱配置。在这些选项中，调节ABPR更加方便，将在本应用纪要作为示例。在某些情况下，液相色谱中常用的放大方法，既通过维持色谱柱长度与粒度的比率(L/dp)进行放大，是调整密度以放大SFC方法的第一步。在任何情况下，密度模拟都可被用于了解分离的密度特征，以使用系统化的方式完成密度调整。在本应用纪要中，我们将此策略运用于实际应用中，重点介绍两个案例研究——使用超高效合相色谱(ACQUITY® UltraPerformance Convergence Chromatography™, UPC²®)系统进行分析级的快速方法开发并放大到制备型SFC进行纯化。第一个研究侧重于活性药物成分(API) Imatinib合成过程中的反应中间体及产物的非手性分析和纯化。第二个研究则针对一种专利手性药物化合物的纯化。利用这种策略能够按照预期有效地缩放方法，有助于在较快速的分析级进行快速方法筛选，并在维持分离兼色谱完整性的同时直接将最终方法转换为制备型色谱法。最终结果显示，可显著节省时间和流动相成本(原材料和废物处理)。

实验

案例研究1(非手性纯化)

样品制备

伊马替尼 (Imatinib) 是一种用于治疗多种癌症的酪氨酸激酶抑制剂^{2,3}, 我们从作为其化学合成一部分的图1所示反应中收集了最终中间体和产物。以异丙醇/己烷/DMSO/乙腈 (40:13:27:20) 作为稀释剂, 将用于制备纯化的样品稀释至浓度为10 mg/mL。用相同的稀释剂进一步将样品稀释至0.2 mg/mL, 用于分析进样。

方法条件

UPC² 条件

系统: ACQUITY UPC², 配备 ACQUITY UPC² PDA 检测器

色谱柱: ACQUITY UPC² BEH 2-EP, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, [部件号: 186006576](#)
ACQUITY UPC² BEH, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, [部件号: 186006558](#)
ACQUITY UPC² CSH 氟苯基柱, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm, [部件号: 186006567](#)

流动相A: CO₂ (罐装, 医用级)

流动相B: 甲醇或甲醇的 0.3% 氨水 (NH₄OH) 溶液

流速: 1.5 mL/min

梯度: 改性剂在2分钟内从4%增加至40% (约26倍柱体积)

柱温: 40 °C

ABPR: 1800 psi

UV检测: 235 nm (补偿380—480 nm) (40点/秒)

进样体积: 2.0 μ L

强洗针液: 异丙醇 (IPA)

弱洗针液: 异丙醇 (IPA)

密封清洗液: 异丙醇 (IPA)

样品瓶: LCMS 认证最大回收样品瓶

制备型SFC条件

系统: Prep 100q SFC 系统, 配备 PDA 和 MS 检测器

色谱柱: Viridis BEH 2-EP OBD™ Prep, 5 μ m, 19 x 150 mm, [部件号: 186005764](#)

流动相A: CO₂ (内部CO₂传输系统)

流动相B: 甲醇 + 0.3% 氨水 (NH₄OH) 溶液作为添加剂

流速: 80 mL/min

梯度: 改性剂在9.2分钟内从4% - 40% (约26倍柱体积)

柱温: 40 °C

ABPR: 1800 psi

UV检测: 235 nm

进样体积: 120 μ L

清洗溶剂: 甲醇

案例研究2(手性纯化)

样品制备

所用样品是一种遇到水或醇类容易降解的专利手性化合物。出于这个原因，准备样品时以乙腈作为稀释剂。可应对遇水不稳定的化合物是SFC的另一个优点。

方法条件

UPC² 条件

系统:	ACQUITY UPC ² , 配备 ACQUITY UPC ² PDA检测器
色谱柱:	纤维素-三(3,5-二甲基 苯基氨基甲酸酯)固定相, 3 μm, 4.6 x 150 mm
流动相A:	CO ₂
流动相B:	乙腈
流速:	2 mL/min
梯度:	改性剂在3分钟内 从20%增加至50% (约3.6倍柱体积)
柱温:	40 °C
ABPR:	2175 psi
UV检测:	212 nm
进样体积:	1.0 μL
强洗针液:	异丙醇(IPA)
弱洗针液:	异丙醇(IPA)
密封清洗液:	异丙醇(IPA)

制备型SFC条件

系统:	Prep 100q SFC系统, 配备PDA和MS检测器
色谱柱:	纤维素-三(3,5-二甲 基苯基氨基甲酸酯) 固定相, 5 μm, 21 x 250 mm
流动相A:	CO ₂ (内部CO ₂ 传输系统)
流动相B:	乙腈
流速:	70 mL/min
梯度:	改性剂在2.8分钟内 从20%增加至50% (约3.6倍柱体积)
柱温:	40 °C
ABPR:	1827psi
UV检测:	212 nm
进样体积:	300 μL

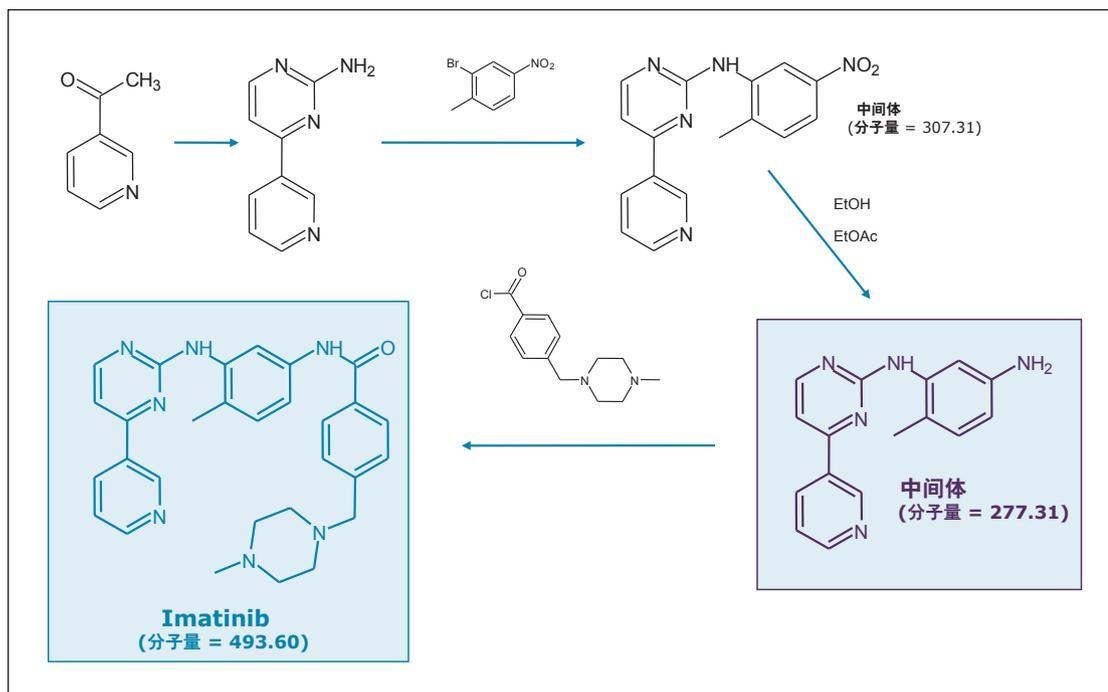


图1. 酪氨酸激酶抑制剂Imatinib的合成路径。在本研究中，最终中间体和产物的样品被收集用于方法开发和纯化。

结果与讨论

密度模拟

本文中介绍的密度特征模拟基于一个假设，即沿着色谱柱的压力特征变化呈线性。使用来自NIST的REFPROP软件计算CO₂/甲醇混合物的密度⁴。REFPROP按照Span和Wanger状态方程(EOS)计算净CO₂密度，并使用Kunz和Wanger模型计算CO₂/MeOH混合物密度^{5,6}。对于梯度法而言，密度不仅随色谱柱变化，还会随着时间变化。在梯度中增大改性剂浓度会导致流动相黏度增加，因此压力增加，进而影响流动相密度特征。在梯度分离中，密度调整策略应当考虑改性剂从低浓度转变为高浓度时密度特征的变化。

图2是该方法的一个例子，展示了标准品混合物的分析级分离以及密度调整后的制备级分离。对分析型和制备型两种配置下的色谱柱入口和出口处的密度特征都进行了计算。对于制备型配置，通过密度调整获得与分析型配置计算所得相近的密度特征平均值。所得的色谱图(图2, 左侧)表明，使用该方法进行分析级和制备级分离，每个化合物均可达到相似的分离效果，获得相似的分离度和选择性。所观察到的两个样品之间的差异可归因于系统延迟体积或进样模式(改性剂流进样与混合流进样)的差别，二者都不是这些实验的考虑因素。

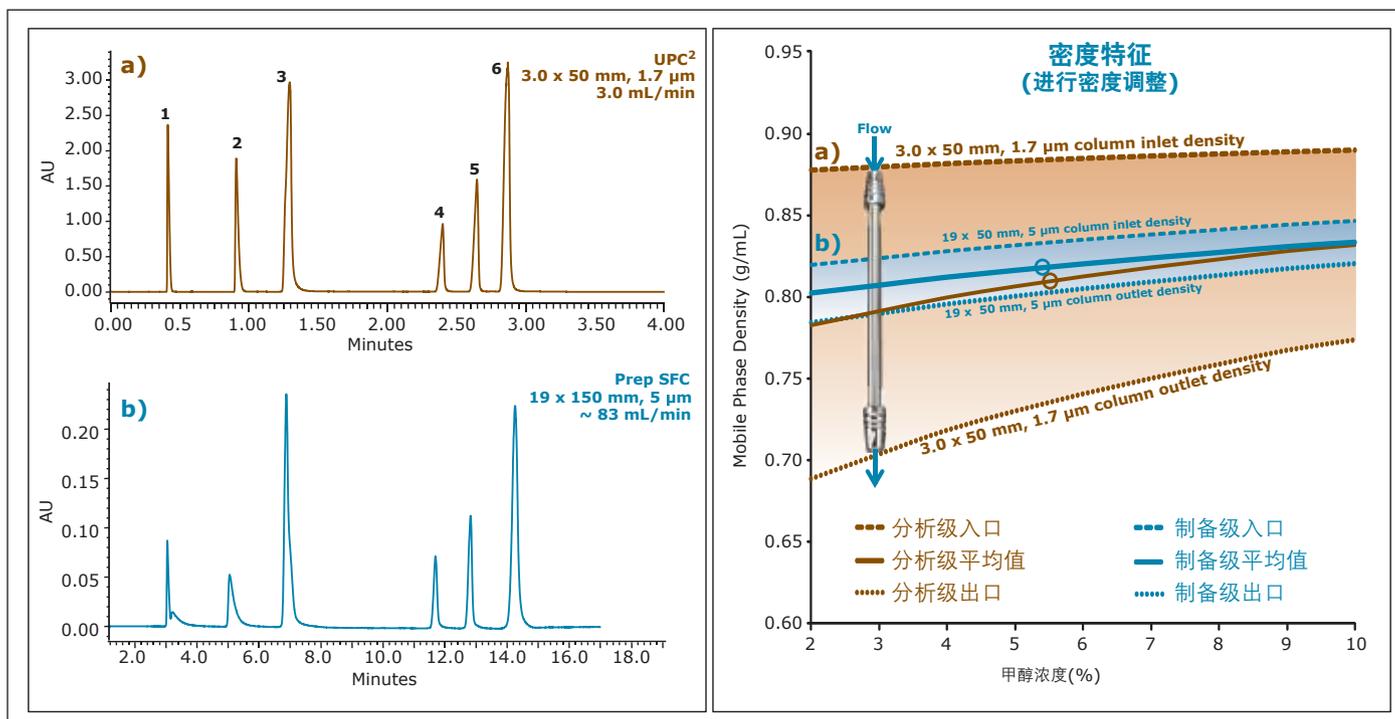


图2. 使用ACQUITY UPC² BEH 2-EP, 1.7 μm色谱柱(a)以及Viridis BEH 2-EP, 5 μm OBD Prep色谱柱(b)两种不同配置进行的标准品混合物梯度分离。通过密度调整直接从分析型放大为制备型条件，所使用的梯度是甲醇以3.0 mL/min和83 mL/min的流速从2%增加至10%。缩放梯度时间(3分钟和13.5分钟)以使每个梯度分离的色谱柱体积相同。ABPR设置分别为1500和2103 psi。分析物为：咖啡因(1)、卡马西平(2)、尿嘧啶(3)、氢化可的松(4)、泼尼松龙(5)和磺胺(6)，每种分析物在甲醇中的浓度为0.2 mg/mL。

案例研究1：非手性纯化(imatinib)

在最初的方法开发中，将中间体和产物的样品在包含三种不同填料的ACQUITY UPC²色谱柱上进行筛查，使用甲醇作为改性剂，采用通用筛查梯度，即改性剂从4%增加至40%。由于两种中间体化合物都带有胺官能团，因此，产生了严重的拖尾，并且在其中两个UPC²色谱柱上都没有观察到产物的洗脱。在甲醇改性剂中添加0.3%的碱性添加剂氨水后，再次对化合物进行筛查，发现峰形得到了显著改善。筛查结果如图3所示。

根据这些初始结果，选择使用BEH 2-EP填料对制备纯化放大进行进一步的评估，使用添加0.3%氨水的甲醇作为改性剂。

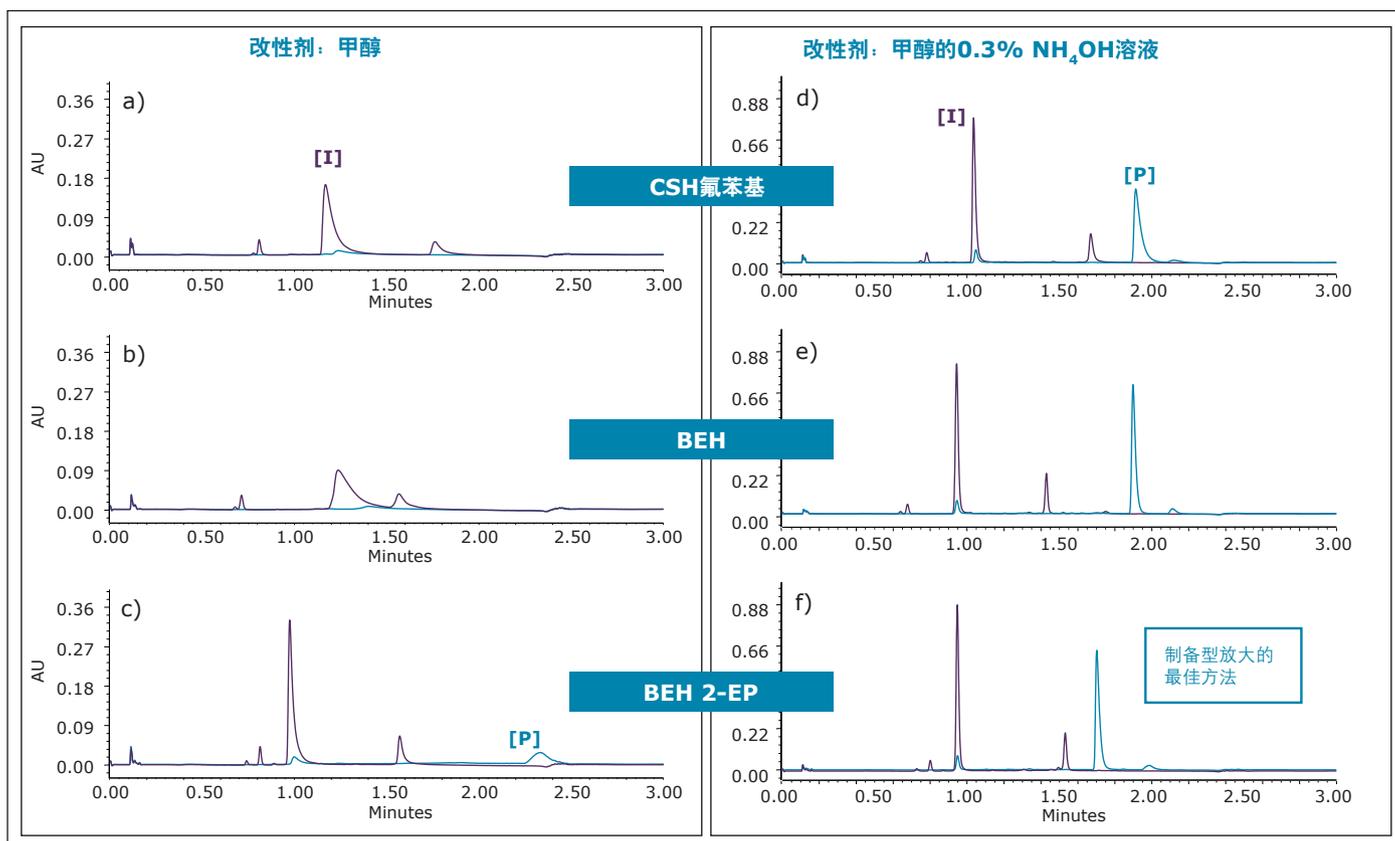


图3. 初始色谱柱筛查实验，分别使用甲醇(左)和甲醇的0.3% NH₄OH溶液(右)作为改性剂。中间体[I]和最终产物[P]的筛查使用2.1 x 50 mm的色谱柱配置，以及1.7 μm粒度的三种ACQUITY UPC²填料：CSH氟苯基(a和d)，BEH(b和e)以及BEH 2-乙基吡啶(c和f)。筛查梯度为改性剂在2分钟内以1.5 mL/min的速度从4%增加至40%。温度为40°C，自动背压调节器(ABPR)设置为1800psi

缩放至制备型(几何缩放)

如前所述, 要以可预测的方式对SFC分离进行缩放, 关键是要了解每个分离的密度特征。对于选出的如图3(f)所示的筛查梯度, 在改性剂从4%转变为40%的过程中, 我们在梯度中的多个点对色谱柱入口和出口的密度进行了模拟。利用这些值可计算出分析物在分离过程中的流动相平均密度为0.857 g/mL。为了缩放至制备级, 采用了维持色谱柱长度与粒度的比率(L/dp)的策略。根据1.7 μm , 50 mm分析柱规格, 选择了一个5 μm , 19 x 150 mm配置的制备柱。将方法进行几何放大, 以便在配备UV和MS检测器的Prep 100q SFC系统上进行分离。基于系统在该流速下表现出的最佳性能, 选择了80 mL/min的制备型流速。梯度时间(t_g)从分析型条件进行了缩放, 使得每个梯度的色谱柱体积(CV)的总和都是一样的(约26倍柱体积), 最终制备型的梯度时间为9.2分钟。改性剂的浓度梯度与分析型分离一样(4-40%)。我们收集了中间体[I]和产物[P]在10 mg/mL浓度下使用制备型方法得到的色谱图。与分析型分离相同, 我们在分离过程中的多个点对制备柱入口和出口的密度特征进行了计算, 并且考虑了由改性剂浓度改变而导致的流动相密度变化。通过这些模拟计算出制备型分离的平均密度为0.847 mg/mL。为分析型和制备型缩放而进行的密度模拟以及所得到的色谱图如下方图4所示。

选择可维持L/dp的色谱柱配置进行方法的几何缩放, 两种分离方法计算所得的平均密度非常相近, 因而无需进行额外的密度模拟即可得到相似的色谱图(参见图4a和4b)。尽管此结果适用于这个特定的例子, 但是由于流速的差异, 维持不变的L/dp也不一定总能获得相近的平均密度。只有通过密度模拟才能确证这一结果。

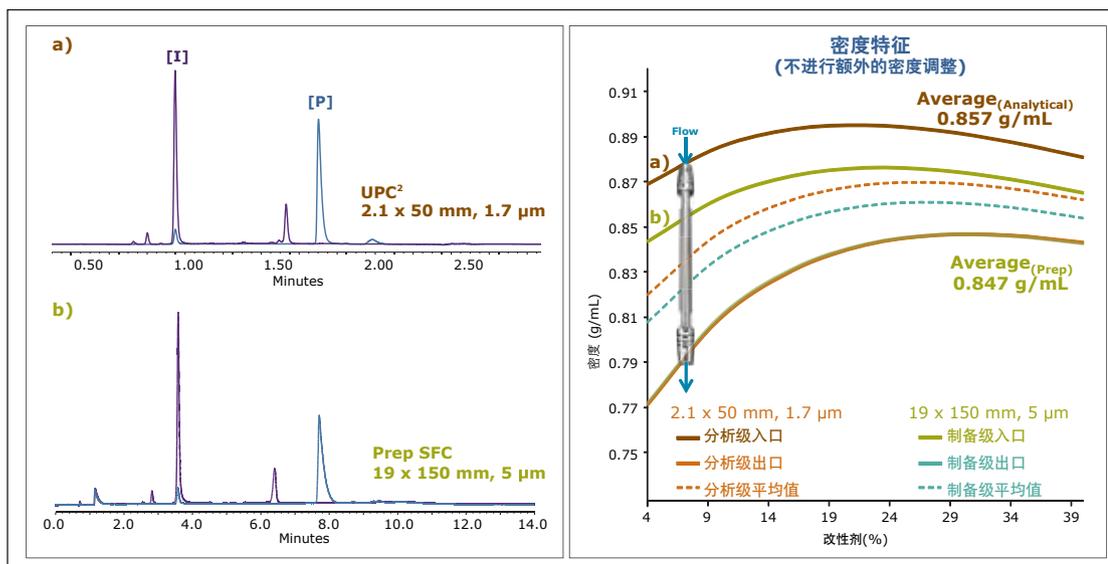


图4. 使用ACQUITY UPC² BEH 2-EP, 1.7 μm , 2.1 x 50 mm色谱柱(a)和ACQUITY UPC² BEH 2-EP, 5 μm , 19 x 150 mm色谱柱(b)在梯度条件下对Imatinib合成的中间体[I]和产物[P]进行评估。维持色谱柱长度与粒度的比率(L/dp)不变, 从分析型直接放大到制备型条件, 所使用的梯度是甲醇(添加0.3%的NH₄OH)以1.5 mL/min和80 mL/min的流速从4%增加至40%。缩放梯度时间(2分钟和9.2分钟)以使每个梯度分离的色谱柱体积相同(约26倍柱体积)。在温度为40 °C, ABPR设置为1800 psi的条件下, 流动相的平均密度分别为0.857和0.847 g/mL。

集中梯度

理想的纯化分离方案是在分析级快速筛选出方法以建立纯化条件，随后使用集中梯度针对目标分析物直接放大到制备型纯化方法。集中梯度或分段梯度通常用于液相色谱分离。然而，对于SFC分离而言，流动相的密度发挥着重要作用，其用途尚未得到充分认识。为了更好地理解这一点，使用分析型筛查分离(如图3f所示)开发分析级集中梯度分离。开发分析型集中梯度方法的这一中间步骤是单独进行的，以测试集中梯度的概念。在我们的理想方案中，不需要此中间步骤。由于最终方法将会是一样的，因此一定要注意，制备级集中梯度所用的条件来源于分析型筛查梯度(图3f)，并不是来自此中间步骤的分析型集中梯度。这样就能通过使用集中梯度直接将分析型筛查梯度转换为制备型纯化。

根据分析型分离的梯度斜率和每个目标峰的保留时间，计算出每个峰洗脱时的改性剂浓度，中间物为14%的改性剂，产物为29%的改性剂。根据这些计算结果，以这些百分比为中心构建2分钟的集中梯度，并且使用比目标百分比低5%和高5%的值分别作为改性剂起始和结束浓度。对于合成中间体，使用了9-19%的梯度，而对于产物，使用了24-34%的梯度。其他所有分析条件保持不变。使用中间体[I]和产物[P]各自的集中梯度所得到的色谱图以及初始筛查梯度的结果如图5所示。

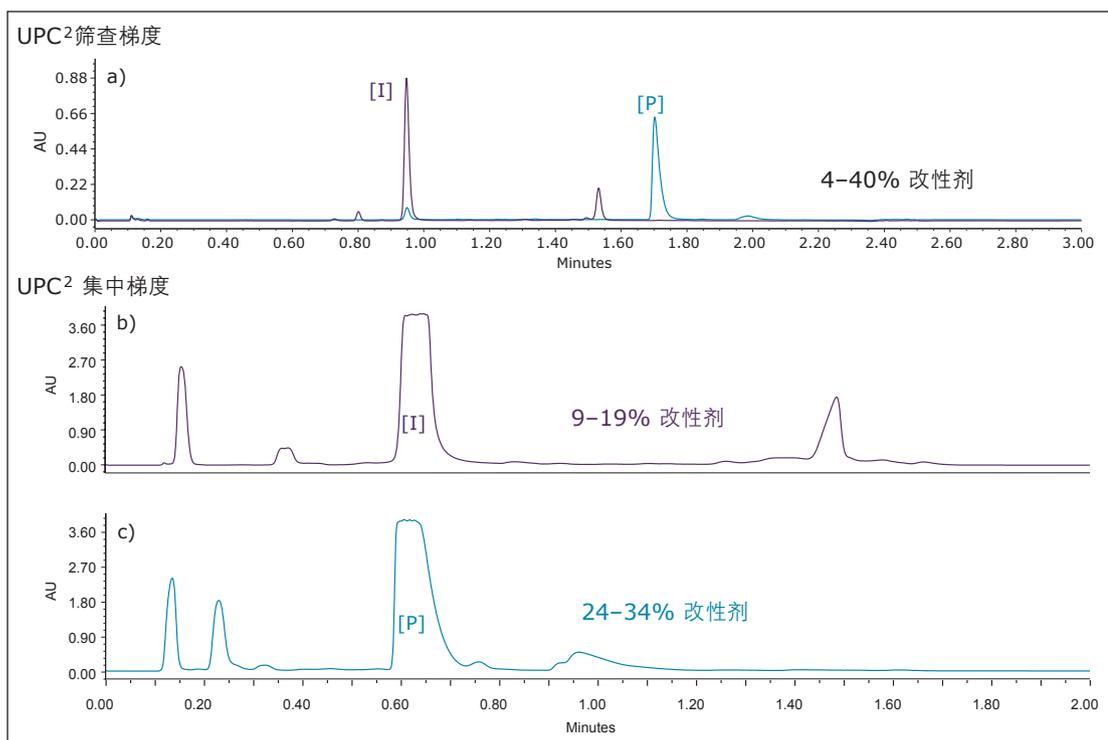


图5.通过UPC²对中间体[I]和产物[P]进行评估，使用ACQUITY UPC² BEH 2-EP, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm色谱柱。分离使用甲醇的0.3% NH₄OH溶液作为改性剂，以在2分钟内从4%增加至40%的梯度用于初始筛查条件(a)，9-19%的改性剂集中梯度用于中间体[I]峰(b)，24-34%的改性剂集中梯度用于产物[P]峰(c)。

这些结果似乎支持集中梯度在SFC中的应用，并且扩展为接近制备型的分离。证明可通过从分析型筛查直接转变为集中制备型分离以便最大程度地发挥效用和节省时间是极其重要的。图6显示了中间体(上)和产物(下)的制备型分离结果及其各自的集中梯度。每个样品混合物的多次进样都使用质谱引导的馏分收集方法收集目标馏分。

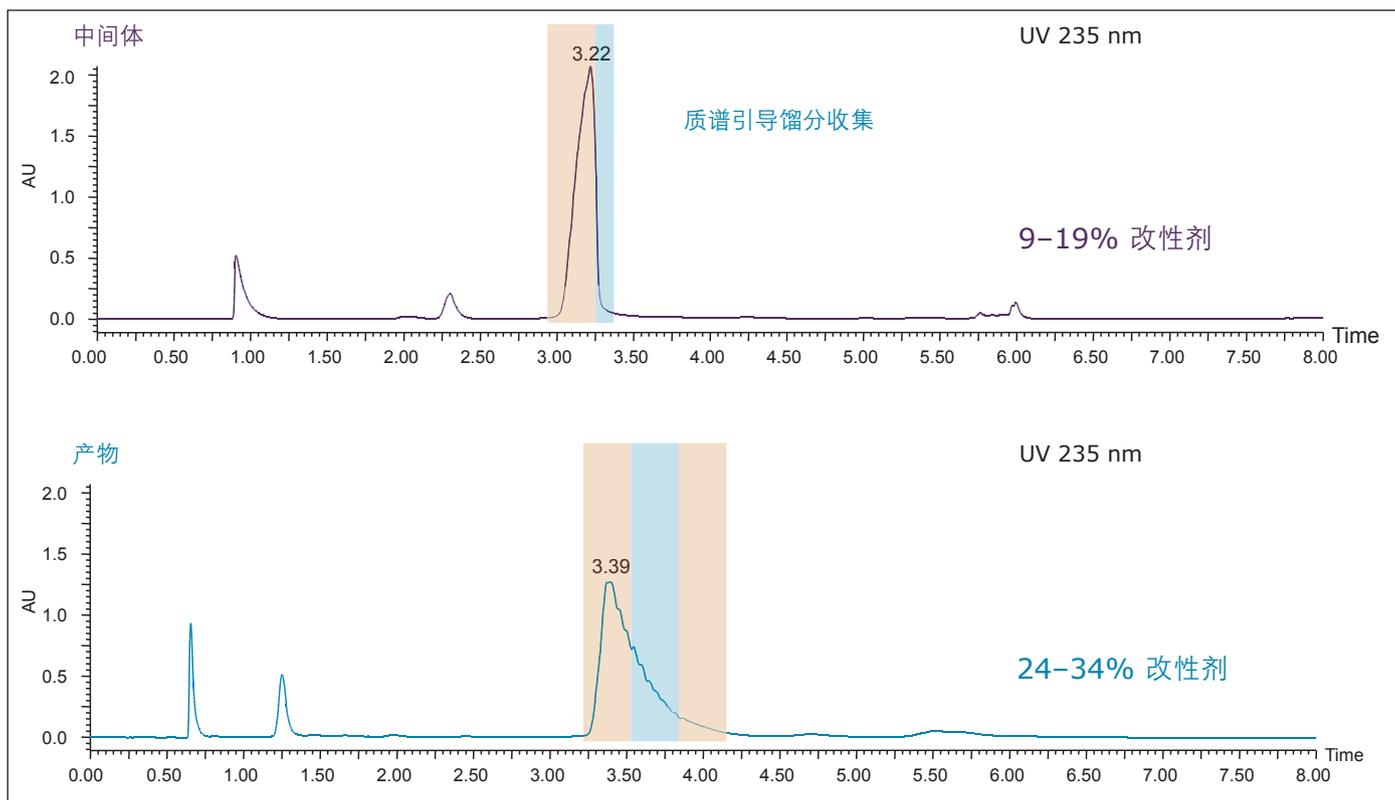


图6.在Viridis BEH 2-EP OBD Prep, 5 μ m, 19 x 150 mm色谱柱上进行中间体(上)和产物(下)的制备型纯化。分离使用甲醇的0.3% NH_4OH 溶液作为改性剂,采用5.1分钟的梯度。9-19%的改性剂集中梯度用于中间体峰, 24-34%的改性剂集中梯度用于产物峰。使用质量导向馏分收集方法进行纯化。

将收集到的每一种分析物的馏分进行混合，然后在UPC²系统上使用初始筛查梯度进行分析，以确认纯度。每一种分析物都收集到大约120 mg，并且其纯度超过99% (如图7所示)。

这个例子凸显了整个工作流程在纯化方面的潜能，它能够快速开发分析级方法并随后使用靶向集中梯度将其直接放大为制备型纯化方法。UPC²的初始方法可用于纯化产物的最终纯度确认。在这个例子中，通过色谱柱规格 (与L/dp匹配) 与流速的结合，使分析型和制备型分离获得了相近的密度特征，不需要额外的密度调整即可成功地进行方法转移。

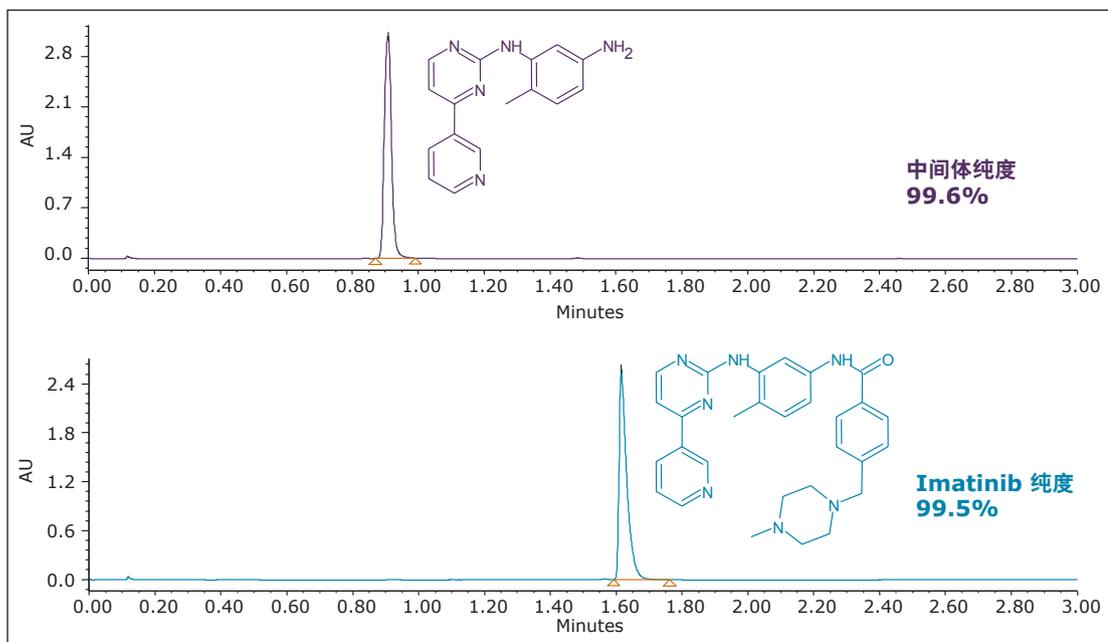


图7. 在分析型UPC²条件下，使用初始筛查参数，以4-40%的改性剂梯度对Imatinib合成的中间体(上)和最终产物(下)进行制备型纯化后的混合馏分进行测试。所得馏分的纯度分别为99.6%和99.5%。

案例研究2：手性纯化

由于本案例研究中分析的手性化合物的性质极不稳定，因此不能使用典型的反相色谱方法。出于同样的原因，UPC²的一般方法开发工具(如改性剂或添加剂变化)不适用于本研究。所开发的方法仅限于使用乙腈作为改性剂，因为化合物在乙腈中表现出最高的稳定性。因此方法的开发被限制为评估色谱柱填料、温度、压力和流速的影响。色谱柱的选择基于几种市售手性色谱柱进行筛选。使用UPC²系统在分析型条件下获得某种可接受的方法之后，就会在L/dp保持不变的条件下将其参数放大用于纯化。与Imatinib案例研究中所述的放大不同，流速和色谱柱规格的特定组合并未在分析型和制备型分离中获得相似的平均密度特征。采用密度模拟进一步指导从分析型到制备型条件的放大，将制备级分离的密度调整到接近分析型分离计算所得的平均密度。所得的色谱图和密度计算结果如下图8所示。

需要注意的是，在此次练习中使用NIST REFPROP数据库进行的密度计算基于甲醇的物理性质，而不是乙腈的物理性质。这是因为NIST或任何其他可靠来源都未提供CO₂/乙腈二元混合物的性质。但是，这两种溶剂的密度是相近的(在常温、常压下，甲醇密度=791.8 g/mL，乙腈密度=786.0 g/mL)。采用密度调整方法的目的是在不取决于其中任何一个系统的绝对密度值的条件下，使两种系统的平均密度差异最小化。这就意味着，如果我们假设从CO₂/甲醇混合物中可得出CO₂/乙腈混合物的密度值呈线性变化，那么根据CO₂/甲醇的性质计算所得的平均密度值之间的差异与根据CO₂/乙腈的性质计算所得的结果就不会有很大的不同。即使有这样的警示，但在使用UPC²开发的分析级SFC方法的基础之上，这个例子仍再次凸显了实现可预测级别的分离的能力。

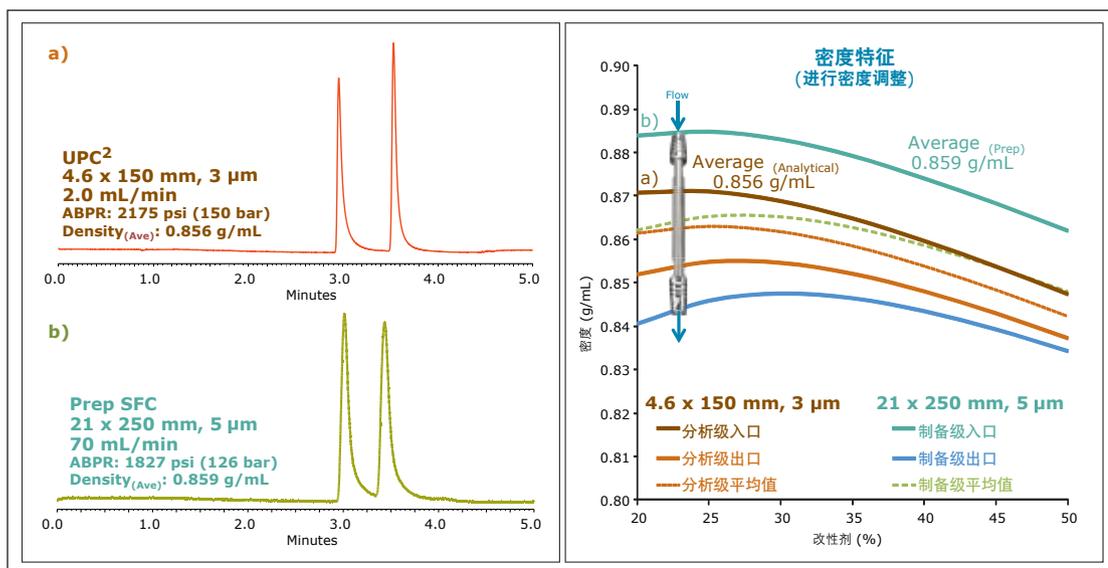


图8. 在3 μm, 4.6 x 150 mm手性色谱柱(a)和等同的5 μm, 21 x 250 mm手性制备柱(b)上进行的手性化合物的梯度分离。通过密度调整直接从分析型放大为制备型条件，所使用的梯度是乙腈以2.0 mL/min和70 mL/min的流速从20%增加至50%。缩放梯度时间(3分钟和2.8分钟)以使每个梯度分离的色谱柱体积相同(约3.6倍柱体积)。ABPR设置为2175和1827 psi，平均流动相密度分别为0.856和0.859 g/mL。分析型分离的进样体积是1 μL，制备型分离的进样体积是300 μL。

结论

利用密度调整进行缩放的系统化方法有利于实现SFC方法从分析级到制备纯化级的高效、可预测的转换。在某些情况下，在应用密度调整策略之前，第一个合理步骤是明确选择色谱柱规格和流速。在其他情况下，例如本文中介绍的Imatinib案例研究，色谱柱规格的选择基于色谱柱的可用性以及 L/dp 的维持，流速的选择则基于最佳仪器参数，因而密度特征可能本身就已经匹配，无需再进行额外的密度调整。在任何情况下，密度模拟都是一种很有用的工具，它可以帮助我们理解分离的本质，还可以用于通过调整ABPR引导进一步的密度调整，从而使分析级和制备级分离具有相似的平均密度特征。除此之外，常用于液相色谱应用中的集中梯度可用作制备型SFC纯化的有效工具。通过在UPC²上利用集中梯度和流动相密度调整实现从分析级筛查分离到制备级纯化的直接转化，可显著节省与制备型SFC纯化的方法开发相关的时间和成本。

参考文献

1. Hudalla C, Tarafder A, Jablonski J, and Fountain K. Waters Application Note 720004818en, 2013.
2. Novartis Pharma AG. Gleevec® (imatinibmesylate) tablets prescribing information, Anon. drugs of choice for cancer, Treat Guidel Med Lett., East Hanover, NJ; 2006 Sep,1:41–52, 2003.
3. Goldman JM, Melo JV, *N. Engl. J. Med.*, 349 (15): 1451–64, 2003.
4. Lemmon EW, Huber M, McLinden MO, Friend DG, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program, Gaithersburg 9.1.
5. Span R, Wagner W, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 25(6):1509–1596, 1996.
6. Kunz O, Wagner W, *J. Chem. Eng. Data*, 57(11):3032–3091, 2012.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY, UPC²和Viridis是沃特世公司的注册商标。ACQUITY UPC², CSH, OBD和UltraPerformance Convergence Chromatography是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014年 沃特世公司 印制于中国 2014年5月 720005064ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010-5209 3866
上海: 021-6156 2666
广州: 020-2829 5999
成都: 028-6578 4990
香港: 852-2964 1800

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