

使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 制备型液相色谱柱开发天然产物的快速纯化方法

作者

Lakshmi Subbarao
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 制备型液相色谱柱开发出一种简单、快速的南非醉茄提取物中醉茄素 A 的纯化方法。与传统的制备型色谱柱相比，InfinityLab Poroshell 120 色谱柱提供了更好的分离度，运行时间缩短 45%。InfinityLab Poroshell 制备型色谱柱的性能优势（尤其是在高流速下）完全满足药物发现实验室及其他高通量环境的需求。

前言

表面多孔颗粒 (SPP) 色谱柱常用于分析方法开发。填充 SPPs 的色谱柱与相应全多孔颗粒 (TPP) 色谱柱相比具有更高的柱效和更低的反压^[1]。图 1 对这两种颗粒类型进行了比较^[1]。表面多孔颗粒由环绕多孔外层的实心硅胶内核组成。实心内核可防止分析物向颗粒中移动太远，缩短其扩散路径，使色谱峰变窄。

Van Deemter 曲线为比较 SPP 和 TPP 的柱效提供了一种简单的方法。死体积标记物和分析物混合物的等度分离在各种样品流速下进行。使用公式 1 计算分析物的效率或板数 (N)，其中 t_r 为分析物保留时间， $W_{1/2}$ 为半峰宽。

$$N = 5.54 (t_r/W_{1/2})^2$$

公式 1. USP 塔板数计算

使用公式 2 可以由 N 计算塔板高度 (H)，其中 L 为色谱柱长度。

$$H = L/N$$

公式 2. 塔板高度计算

使用公式 3，由死体积标记物的保留时间 (t_0) 计算得到线速度 (u)，用 H 对线速度 (u) 作图。

$$u = L/t_0$$

公式 3. 线速度计算

相同规格的 4 μm SPP 色谱柱和 5 μm TPP 色谱柱的 Van Deemter 曲线如图 2 所示。

请注意 H 与 N 成反比，H 值越小的曲线性能越好。从曲线上可以看出，4 μm 色谱柱比 5 μm 色谱柱的性能更出色。每条曲线最低点的线速度 (u_{opt}) 对应于柱效最高时的流速。SPP 色谱柱的 u_{opt} 是 TPP 色谱柱的 u_{opt} 的 1.5 倍，意味着 SPP 色谱柱能够在比 TPP 色谱柱更短的时间内实现更出色的分离。

然后将数据拟合到 Van Deemter 方程中，计算 A、B 和 C (公式 4)。

$$H = A + B/u + Cu$$

公式 4. Van Deemter 方程

这些常数代表谱带展宽的主要贡献。A (涡流扩散) 和 B (纵向扩散) 的影响在低线速度 (< 0.5 mm/s) 下较为显著，其他文献对此进行了讨论^[2]。在正常或高于正常色谱线速度 (> 1.5 mm/s) 下，C (传质阻力) 是谱带展宽的主要原因。对于 TPP 色谱柱，分析物在颗粒内的长扩散路径导致谱带展宽。随着速度的加快，传质阻力只会越来越大。相比之下，SPP 色谱柱中的多孔层要短得多。因此，SPP 色谱柱的 H 非常低，高流速 (> 3 mm/s) 下的 Van Deemter 曲线斜率比 TPP 色谱柱小。较小的 H 值使用户能够以更高的流速运行 SPP 色谱柱，且不会使性能明显降低。

药物发现实验室及其他高通量环境常常利用制备型色谱法纯化大批样品。它们需要少量 (10–100 mg) 的高纯度馏分来进行下游检测和表征。这些环境的节奏非常快，不允许在方法开发上耗费过多时间。因此，这些客户可使用高分离度和高通量的 SPP 色谱柱。

但出于几种原因，SPP 色谱柱并未在制备型液相色谱领域得到广泛的应用。大多数分析仪器的设计旨在尽量减小系统体积，并使耐压超过 400 bar，而大多数制备型仪器都具有较大的系统体积，以防止泵过压。在制备型色谱柱中使用尺寸较小的 SPPs 可能会导致压力过大，而较大的系统体积可能会抵消色谱优势。

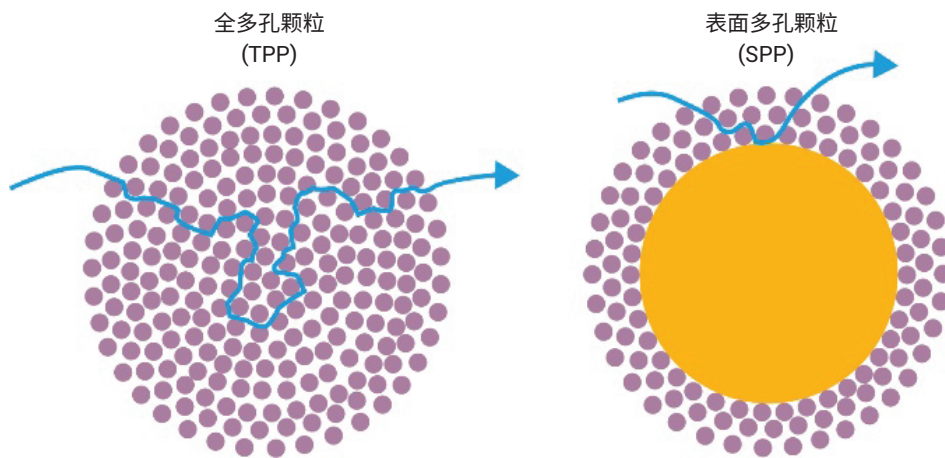


图 1. 全多孔颗粒与表面多孔颗粒的分析物扩散路径

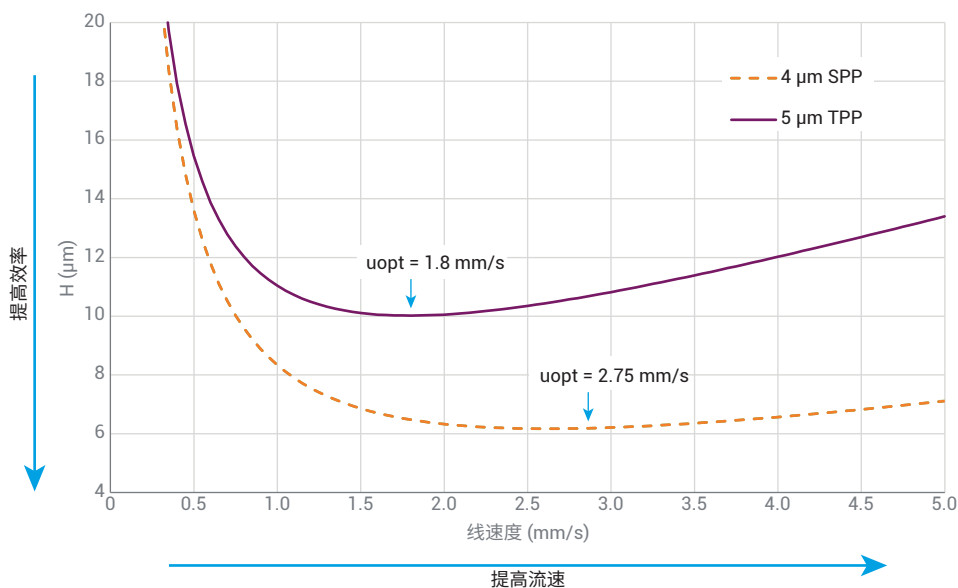


图 2. 4 μm 表面多孔颗粒 (SPP) 和 5 μm 全多孔颗粒 (TPP) 色谱柱的 Van Deemter 图

填充 4 μm 表面多孔填料颗粒的全新 Agilent InfinityLab Poroshell 120 制备型液相色谱柱系列可缓解这些问题。这种填料粒径足够大，可以在传统制备型仪器的压力范围内正常工作，而不会出现明显的谱带展宽，同时可提供比传统 TPP 制备型色谱柱更出色的性能，尤其是在较高的流速下。

天然产物中生物活性成分的纯化与未加工混合物中候选药物的纯化面临相似的挑战——两者均含复杂的基质。催眠睡茄（即人们熟知的南非醉茄）是一种含有多种天然类固醇醉茄内酯的植物。醉茄素 A (WFA) 是南非醉茄中生物活性最高的醉茄内酯。本研究的重点在于使用通用方法，在标准流速和较高的流速条件下，测量 4 μm SPP 和传统 5 μm TPP 色谱柱对 WFA 的纯化效率。

实验部分

仪器

所有研究均使用 Agilent 1290 Infinity II 自动制备型液相色谱系统完成。

色谱柱与备件

利用两种色谱柱开发了纯化方法。第一种为 InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 21.2 × 150 mm, 4 μm 制备型液相色谱柱（部件号 670150-902）。第二种为传统 C18, 19 × 150 mm, 5 μm 制备型液相色谱柱。南非醉茄提取物的 2:1 乙醇:水 (100 mg/mL) 溶液购自 Banyan Botanicals (Albuquerque, NM)。醉茄素 A 标准品购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。LC 级溶剂购自 Burdick and Jackson。使用 Agilent Captiva 优级针头过滤器 (0.2 μm, 部件号 5190-5116) 对提取液进行了过滤。

最佳流速下的梯度分离

各色谱柱的最佳流速分别由相应的 Van Deemter 曲线（未显示）确定。采用之前发表的分析方法对流动相进行了选择^[3]。在两种色谱柱上运行了一个通用梯度，调整梯度时间，保持梯度中色谱柱体积数一致。运行条件汇总于表 1 中。

表 1. 最佳流速下的数据采集参数汇总

| 参数 | 安捷伦 | 竞争产品 |
|-----|---|-----------------------------|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 21.2 × 150 mm, 4 μm | 竞争产品 C18, 19 × 150 mm, 5 μm |
| 流速 | 25 mL/min | 17 mL/min |
| 流动相 | A: 乙腈 + 0.1% 甲酸 B: 水 + 0.1% 甲酸 | |
| 梯度 | 15 min 内 B 从 5% 升至 95% | 18 min 内 B 从 5% 升至 95% |
| 进样量 | 1000 μL | |
| 波长 | 220 nm | |

高流速下的梯度分离

各色谱柱在高于其最佳流速 50% 的条件下运行。对梯度时间进行了调整，以保持梯度中色谱柱体积数一致。运行条件汇总于表 2 中。

表 2. 较高流速下的数据采集参数汇总

| 参数 | 安捷伦 | 竞争产品 |
|-----|---|-----------------------------|
| 色谱柱 | Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 21.2 × 150 mm, 4 μm | 竞争产品 C18, 19 × 150 mm, 5 μm |
| 流速 | 37.5 mL/min | 25.5 mL/min |
| 流动相 | A: 乙腈 + 0.1% 甲酸 B: 水 + 0.1% 甲酸 | |
| 梯度 | 10 min 内 B 从 5% 升至 95% | 12 min 内 B 从 5% 升至 95% |
| 进样量 | 1000 μL | |
| 波长 | 220 nm | |

结果与讨论

图 3 比较了两种色谱柱在各自的最佳流速下的性能。各色谱柱的总质量为 100 mg。对于 Poroshell 色谱柱，WFA 峰在 8.59 分钟处洗脱，而竞争对手色谱柱则为 9.66 分钟处。两种色谱柱均实现了 WFA 峰与相邻杂质的分离。在 Poroshell 色谱柱上，杂质与 WFA 基线分离。然而在竞争对手色谱柱上，其中一种杂质呈现为 WFA 峰的肩峰。

当流速增大 50% 时 (图 4)，Poroshell 色谱柱保持 WFA (保留时间 = 5.77 分钟) 与其杂质的分离。在竞争对手色谱柱上，先导杂质与 WFA (保留时间 = 6.47 分钟) 部分共洗脱，后续杂质与目标化合物完全共洗脱。

竞争对手色谱柱只能在其最佳流速 (18 分钟梯度) 下分离杂质。同时，Poroshell 柱的更快梯度能够在 10 分钟内分离所有峰，将运行时间缩短 45%。

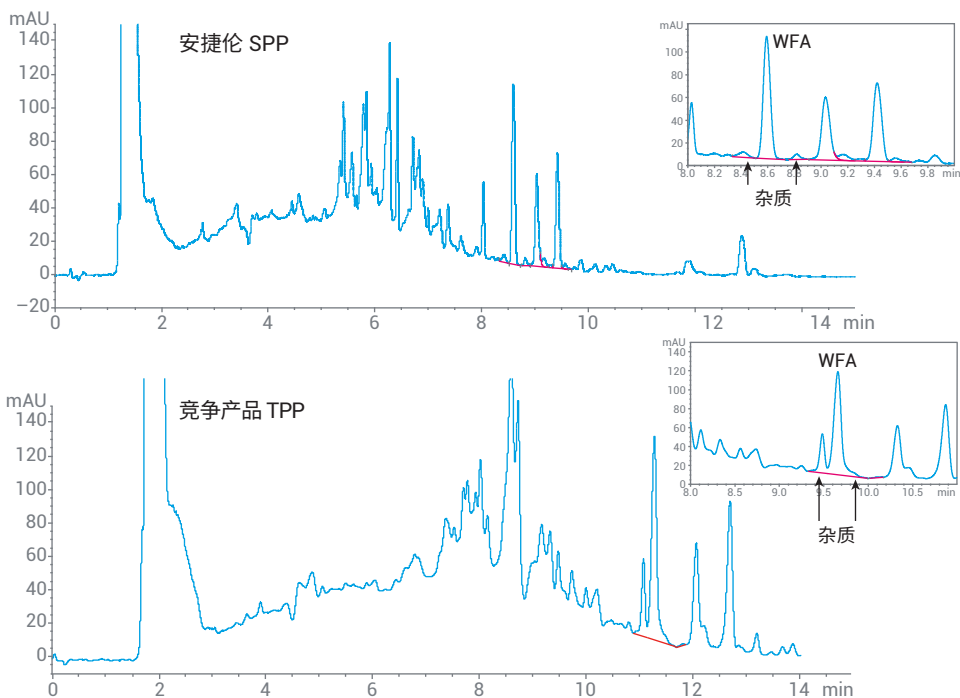


图 3. 制备型液相色谱柱上醉茄素 A 的分离。梯度时间：安捷伦 — 15 分钟；竞争产品 — 18 分钟

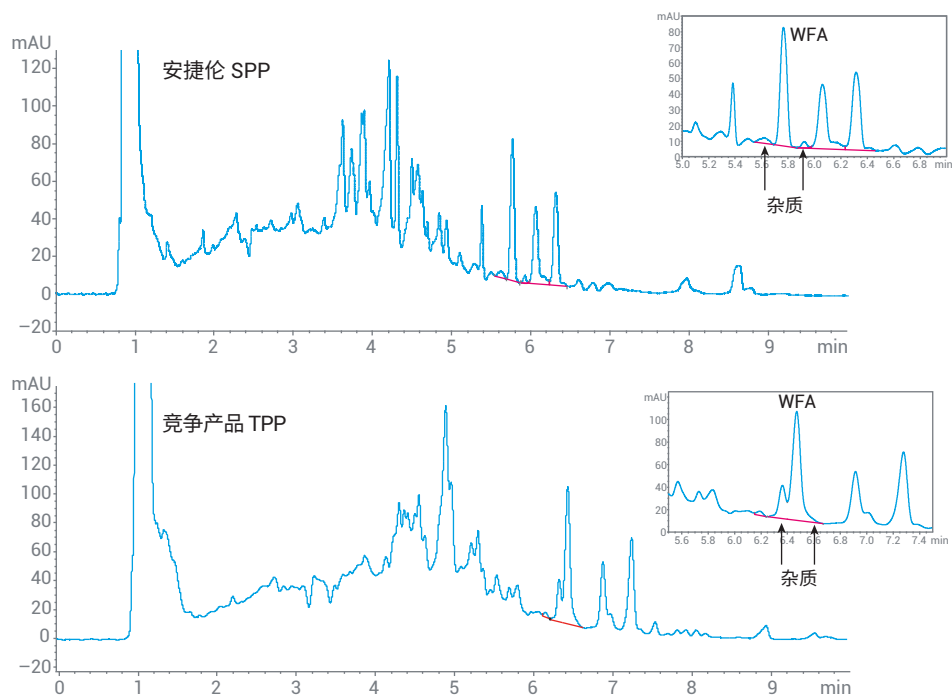


图 4. 制备型液相色谱柱上醉茄素 A 的分离。梯度时间：安捷伦 — 10 分钟；竞争产品 — 12 分钟

结论

Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 21.2 × 150 mm, 4 μm 制备型液相色谱柱仅需极少的方法开发便成功实现了醉茄素 A 与相邻杂质的分离。在 1.5 倍最佳流速条件下运行时, InfinityLab Poroshell 120 色谱柱可保持分离能力, 而竞争对手色谱柱则呈现出明显的共洗脱。在标准流速下, 更快的 Poroshell 方法比竞争对手方法的运行时间缩短了 45%。InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 21.2 × 150 mm, 4 μm 制备型液相色谱柱的速度和载样量完全满足高通量发现实验室的需求。

参考文献

1. Gratzfeld-Huesgen, A.; Naegele, E. 使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 色谱柱尽力提高柱效, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-5602CHCN, **2016**
2. Alvarez-Suegura, T. Study of the Column Efficiency using Gradient Elution Based on Van Deemter Plots. *Journal of Chromatography A* **2019**, 1584(11), 126–134
3. Bolleddula, J. Identification of Metabolites in *Withania somnifera* Fruits by Liquid Chromatography and High-Resolution Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 26(11), 1277–1290

www.agilent.com

DE44313.2277662037

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2021
2021年5月18日, 中国出版
5994-3518ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

