

# 质谱引导的制备型超临界流体色谱： 一种在进行高通量纯化时可减少液体溶剂用量的正交工具

Rui Chen, 药学博士

沃特世公司, 美国马萨诸塞州米尔福德

## 应用效益

Prep 100型SFC-MS引导系统在高通量纯化中具有显著的优点。RPLC与SFC之间的正交性可以纯化更多的化合物，从而节省运行成本，确保研发工作的顺利进行。Prep 100型SFC-MS系统将二氧化碳用作主要流动相，从而减少了液体溶剂的消耗量，并缩短了纯化后的样品干燥时间。

## 沃特世解决方案

Prep 100型SFC-MS系统

2767型样品管理器

3100型质谱检测器

2998型光电二极管阵列 (Photodiode Array, PDA) 检测器

气液分离器

MassLynx™软件

FractionLynx™应用管理程序

## 关键词

开放式馏分收集

质谱引导的制备型SFC

高通量纯化

SFC

纯化

## 引言

近年来，提高产能并降低成本已经成为药物研发领域的重要举措。新型高通量合成技术的面世使人们可用过去制备一种化合物的时间制备多达48种化合物<sup>1</sup>。因此，开发和运行用以支持总体高通量工艺的高效率纯化平台面临越来越大的压力。

使用质谱引导反相液相色谱 (reversed-phase liquid chromatography, RPLC) 进行纯化能在每次进样时收集一种馏分，从而使从事药物发现工作的化学技师的工作

流程出现了革命性变化，而这主要归因于质谱检测所具有的专属性。因此，质谱引导RPLC迅速成为高通量纯化环境中最常用的技术。我们为精简分析过程付出了相当大的努力，所以仪器所需的人工干预极少。然而，该分析过程仍存在一种主要不足，那就是水溶性馏分的干燥时间较长。

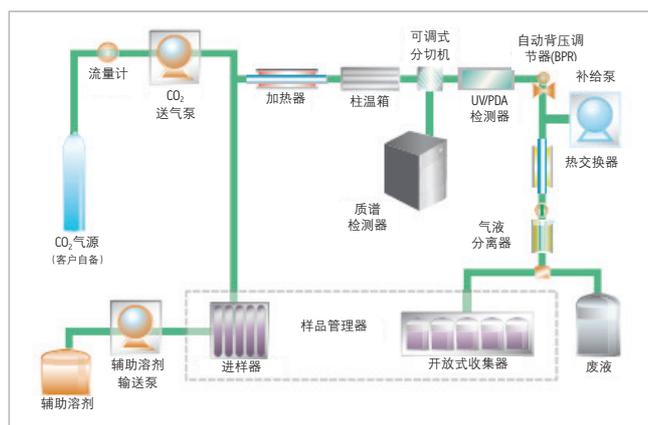


图1 Prep 100型SFC-MS系统简图。

超临界流体色谱 (supercritical fluid chromatography, SFC) 最初用于手性分析，制药业在二十世纪九十年代初将其用于产品纯化，SFC的应用普及程度在过去十年内迅猛复苏。许多人尤其认为制备型SFC最有可能获得主流认可。SFC使用CO<sub>2</sub>作为主要流动相以及等度或梯度运行模式下的一种有机辅助溶剂。液体溶剂用量的减少以及挥发性有机溶剂回收量的相对缩小节省了相当多的运行费用。例如，Ripka等计算得出的结果表明使用SFC而非RPLC纯化2万份样品可将溶剂用量缩减48倍<sup>2</sup>。

质谱引导的制备型SFC系统和其在RPLC中的对应仪器一样，也是一种用于高通量纯化不同药用化合物库的理想平台。然而，用途单一且容量受限的收集系统以及功能不足的软件已经成为使用制备型SFC进行库化合物纯化和

质量定向式靶标收集的关键障碍。Waters® Prep 100型SFC-MS系统可解决这些难题。

这篇应用笔记以具体结果证明Prep 100型SFC-MS系统具有适合进行高通量纯化的关键特征。通过比较使用AutoPurification™和Prep 100型SFC-MS系统得出的库化合物纯化结果也表明联合应用这两种技术具有显著的优势。

### 系统配置

所有制备试验均在沃特世Prep 100型SFC-MS定向系统中进行。

- 2767型样品管理器
- 3100型质谱检测器
- 2998型光电二极管阵列 (PDA) 检测器
- CO<sub>2</sub>送气泵
- 液体泵
- 515 HPLC泵
- Analytical-2-Prep™柱温箱
- 自动背压调节器 (Automated Back Pressure Regulator, ABPR)
- 气液分离器 (Gas-Liquid Separator, GLS)
- 可调式分切机
- MassLynx™软件

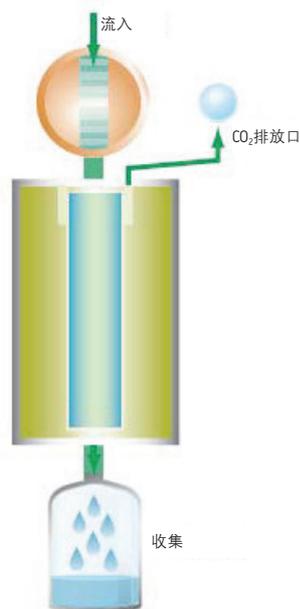


图2 气液分离器 (GLS) 简图。

### 结果与讨论

使用制备型SFC进行高通量纯化时需要配备收集托架及收集管。气体流动相CO<sub>2</sub>必须排放出去，只有含已溶化合物的液体溶剂才能被收集进开口管结构中。在高流速SFC中进行开放式馏分收集的重大挑战之一是CO<sub>2</sub>会出现膨胀。退出ABPR后，高压液态CO<sub>2</sub>将以大约1:500的体积比减压变成气态。体积的这种迅速膨胀将导致气溶胶形成并进而可能引起样品损失和交叉污染。如图2所示，这一难题可通过使用一种专利型GLS而得以解决。

所收集馏分具有较高的回收率和纯度可证明GLS的有效性。例如，Aurigemma等报道了他们对Prep 100型SFC-MS系统的评价结果<sup>3</sup>。在他们的试验中，一种由黄酮 (flavone, A)、卡巴咪嗪 (carbamazepine, B)、对乙酰氨基酚 (acetaminophen, C) 和磺胺二甲嘞啶 (sulfamethazine, D) 组成的混合物 (每种组分的浓度为8 mg/mL) 进样，并对三次重复进样进行了馏分收集，如表1所示。总的来说，样品回收率和纯度在梯度洗脱期间达到95%以上 (第一次进样的C峰除外)。特别地，两种相继洗脱出来的组分 (C和D) 均具有较高的纯度，这表明两峰之间的交叉污染可忽略不计。在另一项试验中，使用一种由咖啡因 (caffeine)、硫康唑 (sulconazole) 和苯氟噻嗪 (bendroflumethazide) 组成的混合物进行了类似评价。平均来看，使用紫外式触发、质谱式触发和紫外+质谱式触发得出的所有化合物的回收率大于90%，纯度大于99%。

	色谱峰	UV纯度	TIC纯度	回收率 (TIC)
第1次进样	A	100.0	100.0	99
	B	100.0	100.0	97
	C	100.0	100.0	86
	D	98.7	99.1	98
第2次进样	A	100.0	100.0	97
	B	100.0	100.0	96
	C	100.0	100.0	97
	D	100.0	99.2	97
第3次进样	A	100.0	100.0	97
	B	100.0	99.5	95
	C	100.0	100.0	99
	D	100.0	99.4	98

表1 SFC收集物的纯度和回收率。

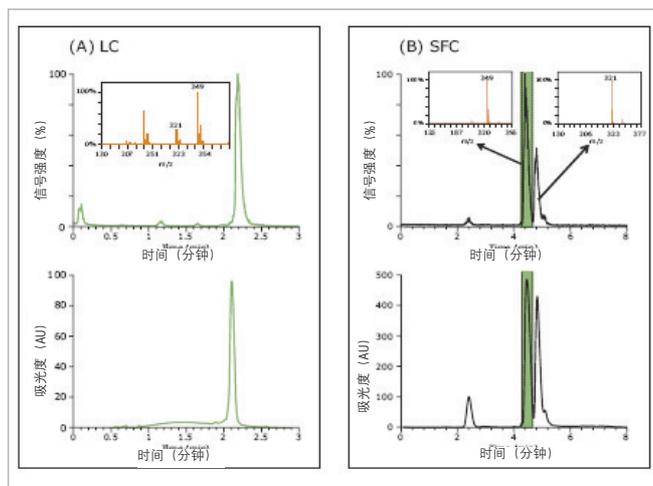


图3 色谱图显示RPLC和SFC之间的选择性差异。

同样重要的是要认识到在高通量纯化环境中运行Prep 100型SFC-MS系统可降低成本。减少溶剂消耗量和缩短干燥时间可节省运行费用这一点现已得到充分证实<sup>2,4</sup>，除此之外，SFC与RPLC的正交作用也能通过将源自化学药物的更多化合物分离而进一步降低成本。大致说来，SFC被认为是一种正相色谱技术，在选择性方面可与RPLC形成互补。例如，图3比较了质谱引导RPLC与SFC对一种直接获取自化学合成过程的真实药用化合物的纯化效果；在此图中可以看出，使用SFC进行分析时，杂质与目标化合物能在基线水平分离开来，但RPLC则做不到这一点。之前进行的一项研究<sup>5</sup>报道称与单用每种技术相比，两种技术联用时的成功率增加30%。这项研究的结果也表明与RPLC相比，SFC的批次总体处理时间因纯化后干燥的时间缩短而减少20%。

图4所示的另一个实例涉及化合物分离；在此例中，通过将系统特征与软件功能相结合而对可能存在于库中并能触发收集的少量化合物进行质量选择性检测。在这里，两种混合重量为0.55%（重量比）的加标杂质在主峰周围分离开来。通过使用质谱触发器的设置值，这种仪器系统能在进样后检出并收集到1号峰（280 $\mu$ g卡咪嗪）和3号峰（205 $\mu$ g磺胺二甲嘧啶），并使其与2号主峰（87.2 mg酮洛芬，ketoprofen）分离开来。

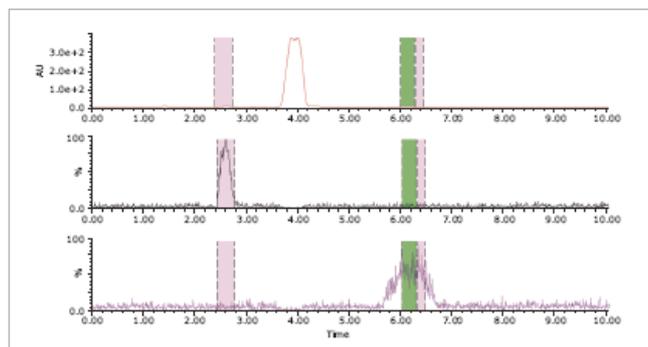


图4 显示从主峰中分离出少量杂质的SFC色谱图。

## 结论

这篇应用证明Prep 100型SFC-MS定向系统能用于诸如需要在每次进样时分离出一种馏分的高通量或库纯化等应用项目。借助源自MassLynx软件的MassLynx应用管理程序，智能仪器控制器可满足馏分收集工作流程的苛刻要求。正交分离装置为同步处理多种不同化合物额外提供了一个维度。最后，液体溶剂用量的减少以及干燥时间的缩短可通过增加处理量并降低每份样品的处理成本而对实验室的运营产生积极影响。

## 参考文献

1. McClain RT, et al. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2009; 32: 483-499.
2. Ripka WC, Barker G, and Krakover J. *Drug Discovery Today*, 2001 6 (9): 471-477.
3. Aurigemma C, Zulli S, Wang Z, and Lefler JL. Poster presentation, LabAutomation, 2009.
4. White C, Burnett J. *J. Chromatog. A.*, 2005; 1074, 175.
5. Mich A, Matthes B, Chen R, and Buehler S. LCGC Europe, The Application Book, March 2010.