

## 概述

在过去的许多年里，纯化技术在分离化合物上的应用增长迅速，无论是在数量上还是类型上。这就对纯化分析员的要求越来越严格，要求他们能更有效、更高质量的纯化产物。基于这些要求，选择合适的技术以完成特定目标和正确的设计纯化实验是很有必要的。

这篇文章研究了所需要的关键因素。首要的就是要选择合适的纯化仪器系统。这包括样品和溶剂系统、检测器、馏分收集器和色谱柱。

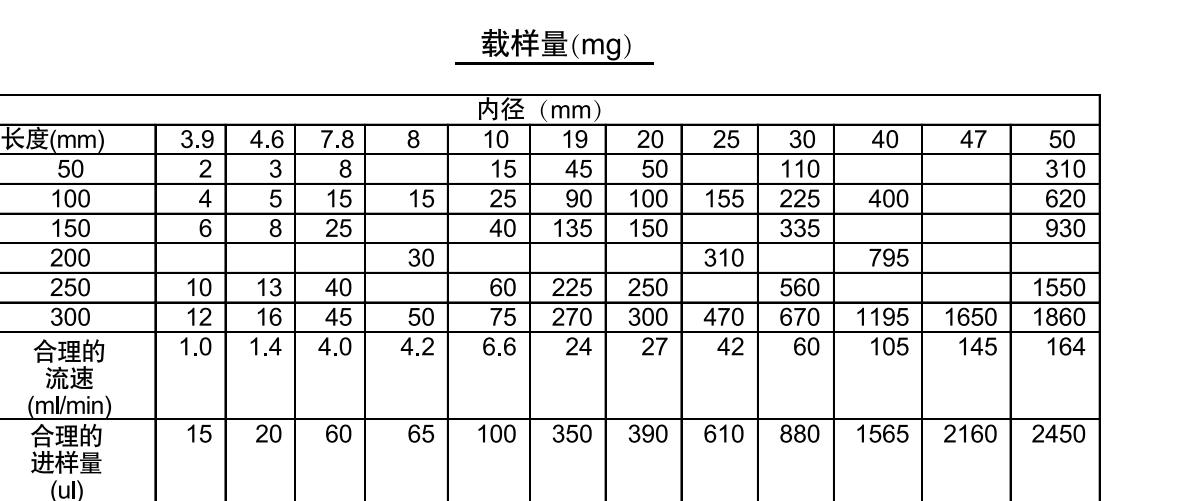
上样量是决定要使用系统能力的主要因素。它决定了选择的色谱柱规格、使用多大流速和对系统的压力要求。系统的其它部分取决于自动纯化所要求的通量和级别。

纯化过程其它的重要部分是样品和数据的处理。在这篇文章里，我们会探索软件和硬件如何有效结合以提高整个过程的功能和效率。我们也会介绍自动化的重要方面以及数据审查如何加速数据处理过程。

## 样品分析

### 上样量

原料的进样量是选择使用合适色谱柱的首要考虑因素。表1显示了上样量、柱大小和流速的关系。



许多因素会影响制备柱的载样能力，表格中的数据仅是“平均”估值。

表1 小分子药物化合物的合理的载样量：依据柱大小，化合物溶解在约30%的甲醇中。

### 分析信息

最初的信息可用来制定纯化方案。需回答的问题是：

样品需要纯化吗？  
纯化分离条件是什么？

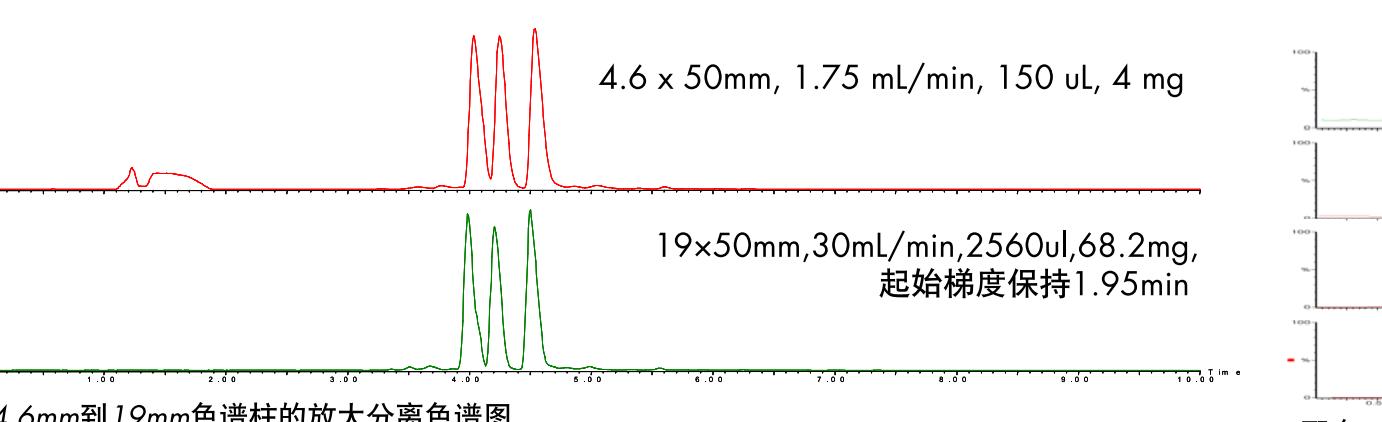
分析图谱上的保留时间可指示出目标物从梯度分离洗脱出来时有机相的百分比组成。制备梯度就可以自动集中在这个百分比组成周围，以增加分离度和通量。参考文章“带有自动梯度方法和增强馏分分析的纯化流程”

## 分离放大

分析方法中的分离度仍可在制备中实现，而不增加梯度时间。这需要保持柱子的颗粒度不变，然后成比例地放大上样量和流速。

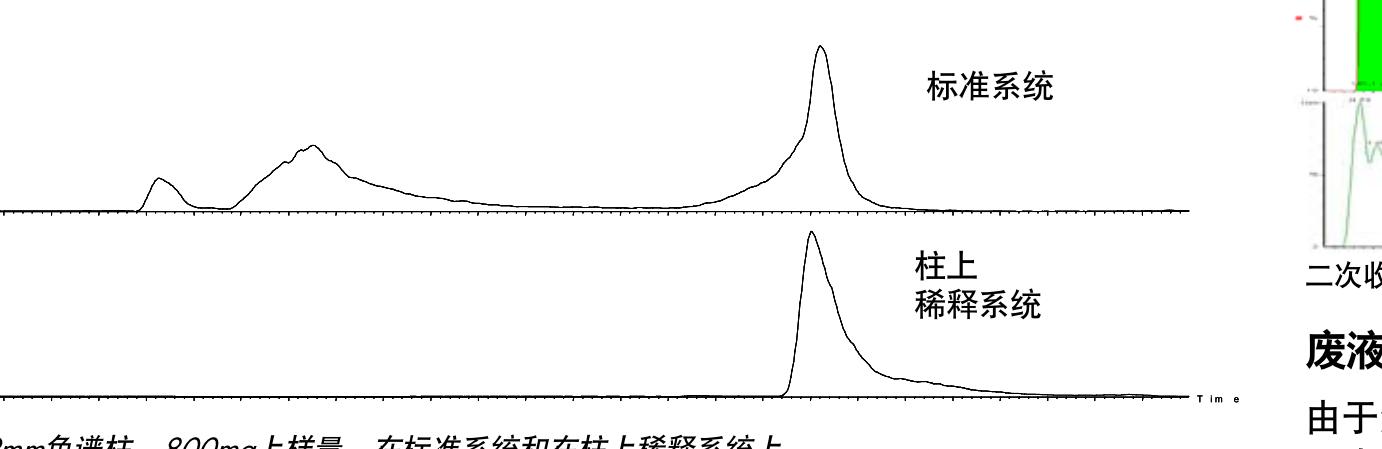
$$M_2 = M_1 \cdot L_2 / L_1 \cdot D_2^2 / D_1^2 \quad \text{和} \quad F_2 = F_1 \cdot x \cdot D_2^2 / D_1^2$$

$M$ =上样量， $L$ =柱长度， $D$ =内径， $F$ =流速，标识符1和2分别表示分析和制备放大。



## 柱上稀释技术 (美国专利 #6,790,361)

柱上稀释(ACD)技术是专为溶解度小并需大体积进样的样品开发的。在传统的系统中，这种进样会使色谱图扭曲。从而限制了上样量或色谱分辨率，现在您可应用柱上稀释技术减小这种影响。另外，柱上稀释可防止样品在定量环或色谱柱中大量的沉淀，从而增加系统耐用性和色谱柱寿命。更多关于ACD的信息，可以在Waters.com参考应用文献71500078010。



## 馏分触发

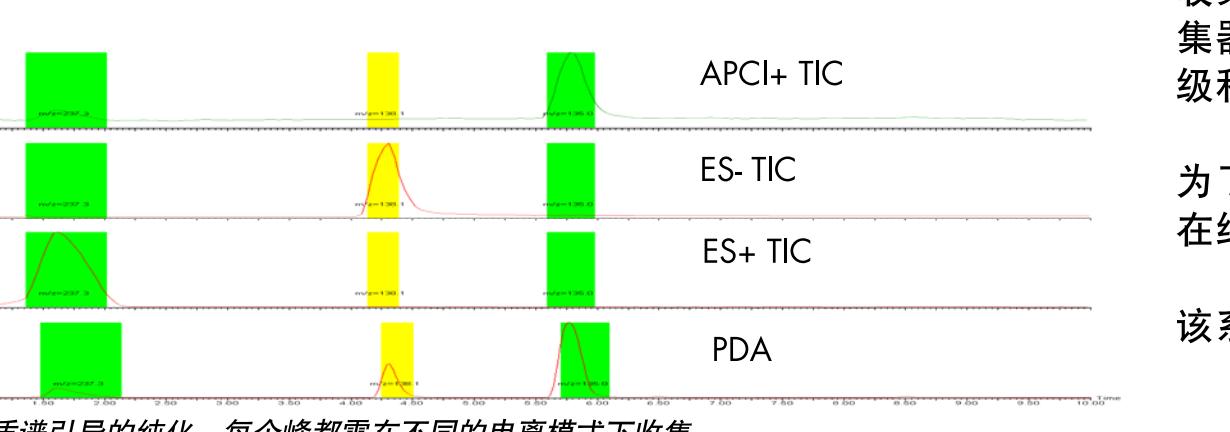
常用的检测器有时会存在选择性问题，例如紫外可见(UV)和蒸发光散射(ELSD)的选择性不如质谱。增加的选择性的需求会有助于决定使用什么类型的检测器。例如，使用没用选择性的检测器例如UV作为触发信号，被收集的馏分必须通过后期分析才可定性目标物。但使用质谱引导的纯化，可将目标的分子量馏分收集，所以不需要做后续的质谱定性工作。

检测触发器的选择性会决定每个样品有多少馏分被收集和是否需要另外的分析。这就增加了通量，使收集器只收集必要的馏分。

有不同选择性的检测器包括紫外可见、蒸发光散射、氯化学发光、质谱和串联质谱引导的纯化。另外，增强的软件功能可以使用融合多种检测器信号的混合触发模式。

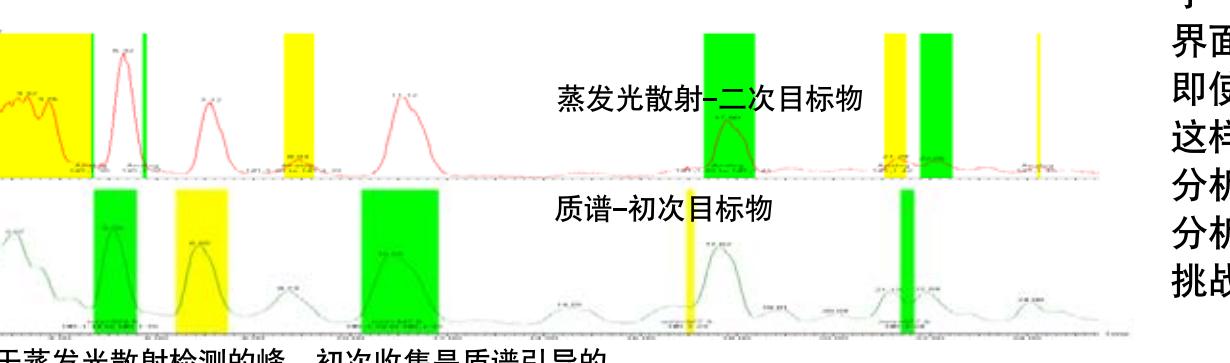
## 多模式离子化

对于增强的质谱检测能力，可以使用多模式离子源，因为不是所有化合物都在相同条件下电离。配有ESCI<sup>TM</sup>复合模式离子源的FractionLynx<sup>TM</sup>可使质谱引导的纯化在一针进样中同时得到ESI<sup>+</sup>、ESI<sup>-</sup>、APCI<sup>+</sup>和APCI<sup>-</sup>数据。这种模式的好处在于可以减少丢失目标物的数量，而且不需要分开样品在不同的条件下运行。因为不需要使用者换源，ESCI对Open Access是很理想的。



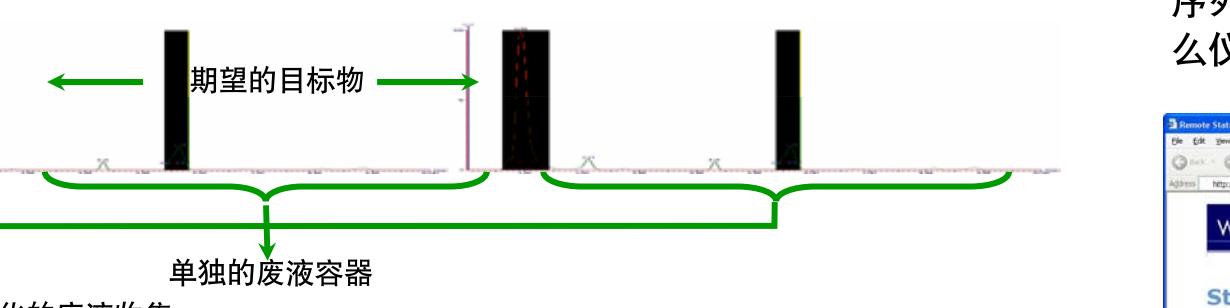
## 二次收集

通常，分析员会发现重要的化合物并不是最初感兴趣的化合物，所以就有必要把它们收集到不同的收集器。例如，在收集主要目标物的同时收集原始物质或杂质，或在收集主要目标物的同时收集所有其它的主要的峰。这从下面的复杂天然产物分离图中可看到。



## 废液收集

由于没有万能的检测器，所以有些化合物无法被检测到。为了进一步防止样品丢失，系统中可增加废液收集器以使所有的流出物分开收集，而不是更早的切换到收集器。



## 自动纯化系统



## 自动化的级别

决定所需要的自动化时，最重要的考虑因素是需要纯化的样品数量。系统每天都可处理单个样品到数以百计的样品。主要的影响部件是进样器和收集器。进样器类型从简单的手动进样器可以到大的开放式的、不需人员干预就可完成数百次进样的自动进样器。

收集器同样具有很大范围的样品数量和体积。最简单的是单独的小型的收集器。更大的收集器可由一系列多个大的初级收集器或由一系列初级、二级和废液收集器组成。

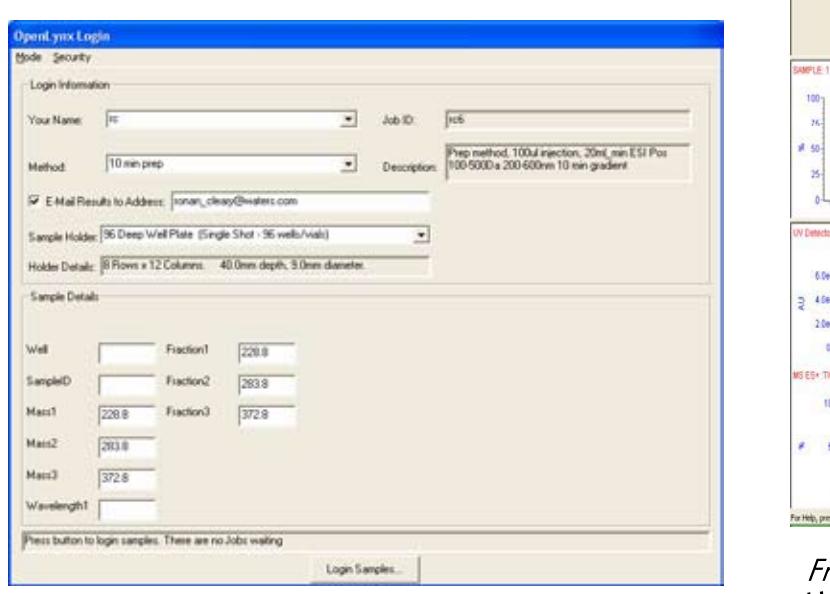
为了获得最大化效率和空间，需要有效组合进样器和收集器。这些仪器可在纯化前进行分析，然后纯化，最后分析收集的馏分。

该系统的图片展示的是带有进样和收集功能样品管理器的典型的系统。

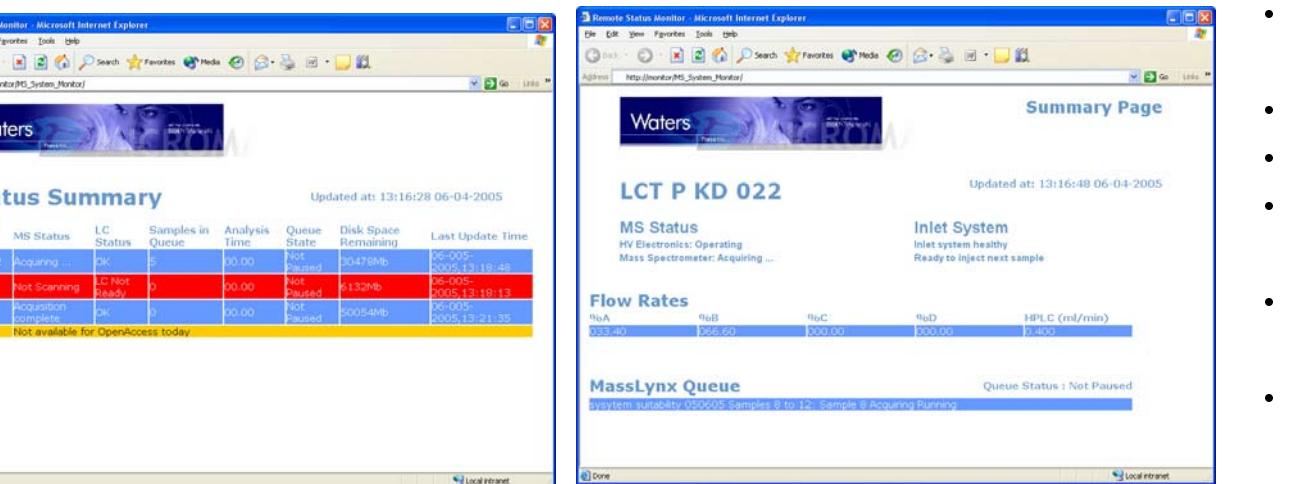
## 数据管理

### Open-Access工具

使提交样品更容易的一个选择是使用Open-Access。它提供了一个简单的信息输入的用户界面，允许系统被多用户使用，即使是只有很少经验的用户。这样，OA系统就可处理常规的分析，可以空出有经验的制备分析人员，允许他们处理更具挑战性的样品。



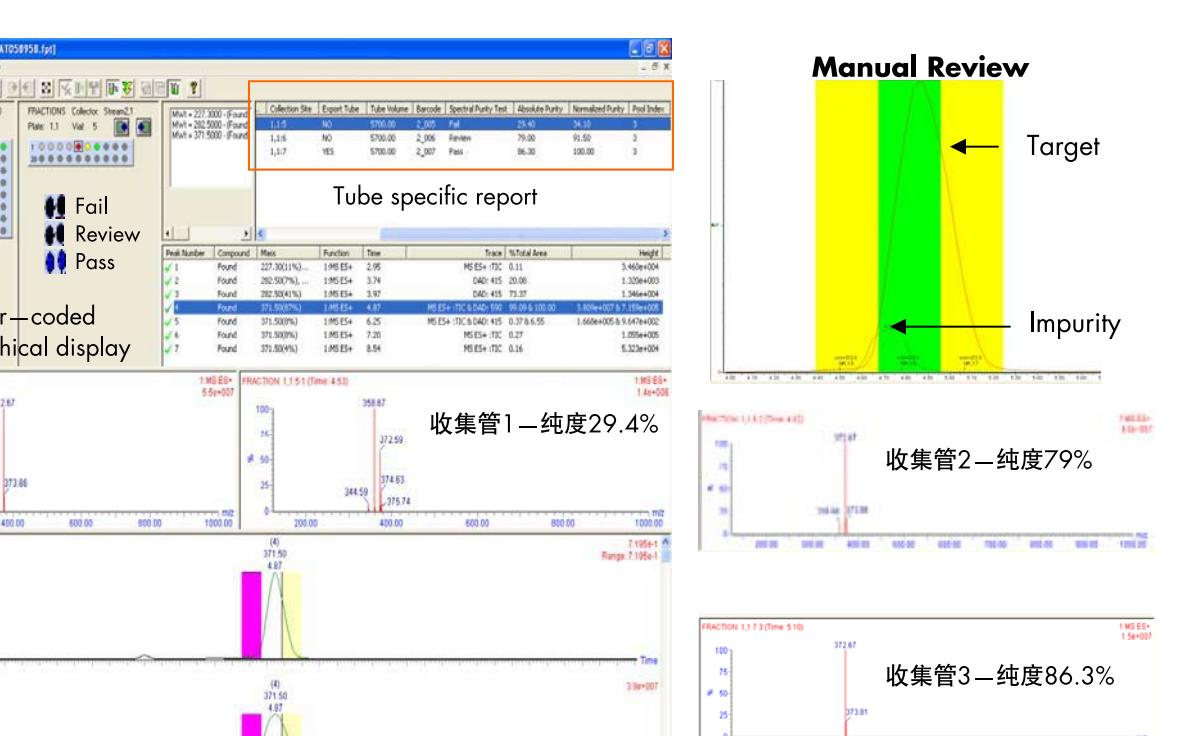
在很多情况下，Open-Access系统不和使用者在同一个实验室，所以要检查序列和仪器状态需要从其它地方到仪器旁。但是现在化学家们可以远程监控什么仪器现在可以使用，以及监视各样品的状态。



## 馏分数据处理和质量说明

一个重要的影响效率的因素就是数据处理和审查。FractionLynx Brower报告可以以交互性图片格式显示关于样品和馏分的所有重要信息。这就可以实现快速的数据审查和处理。另外，自动纯化能力可以自动的使样品信息贯穿分析、纯化和馏分分析整个过程；如果需要的话，甚至可以超过这些范围。

FractionLynx Brower有能力监测每个馏分每个收集管的质量。这是基于光谱纯度的。在下面的例子中， $m/z=372.5$ 的目标收集物，与在目标峰前沿洗脱出来的杂质具有相近的洗脱性。浏览器会显示每个收集管的光谱，计算目标物的光谱纯度。用户定义的纯度阈值可使浏览器显示每个收集管的纯度是通过、需要复查还是失败。另外，如果需要，简单审查的总结数据可以被手动修改，并产生新的报告。



## 结论

- 上样量是选择纯化系统类型的首要考虑因素。
- 样品的数量会决定所需自动化的级别。
- 分析信息可以智能化的应用于制备级别，可以增加放大的分离能力，可以使用窄梯度的制备方法。
- 具有选择性的馏分触发器可以决定需要多少附加的工作来定性目标物。
- 各种各样的收集器配置都是可能的，包括二次收集器和废液收集器。
- Open Access可为缺少经验的用户提供简单的用户界面。附加的工具可以增加易用性。
- 光谱纯度检测和阈值简化了多收集管收集中分离合格收集管的任务，而不需要大量的数据挖掘。
- FractionLynx Brower的概括数据报告可以以简单的图片格式显示数据以快速审查和处理数据。