

【应用合集】 No. 24 | 使用SiliaSep Premium Flash柱纯化杂环混合物

实验介绍

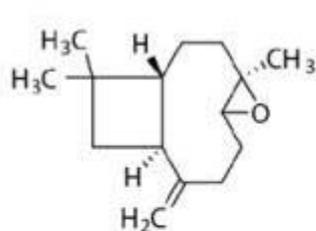
药物研究中待提取的分子通常具有复杂的结构，并伴随着难纯化的挑战。为了解决纯化问题，Flash色谱法是分离目标化合物的首选方法。

使用纯硅胶填料作为正相进行制备色谱操作的便利性由来已久，因为其洗脱液沸点低可以在色谱运行结束后更容易地去除流动相。许多制造商都可以提供类似规格的Flash柱。但使用方案不尽相同，当你的分离工作有优化需求时，需要考虑改变制造商品牌。

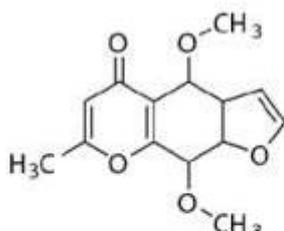
SiliCycle针对不同制造商的类似的预填充Flash柱进行相同物质的分离，并对使用同一种已经过优化的方案在不同的柱上会有怎样的结果区别进行了总结。纯硅胶常用于纯化市面上可售的植物提取物和油脂的极性亲脂性杂环溶液(图1)。通过分析不同品牌球形硅胶的峰分离度和分辨率来确定性能。

此外，我们先比较了使用SiliCycle的SiliaSep PREMIUM (球形硅胶)和SiliaSep柱(不规则硅胶)之间的区别，确认了球形硅胶可以更好地分离这种混合物。

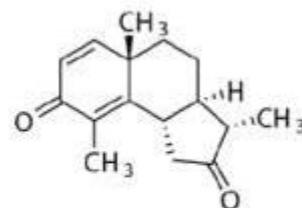
图1:样品混合物中存在杂环化合物



石竹素
Caryophyllin Oxide



凯林
Khellin



α-细蒿素
Artemisinin

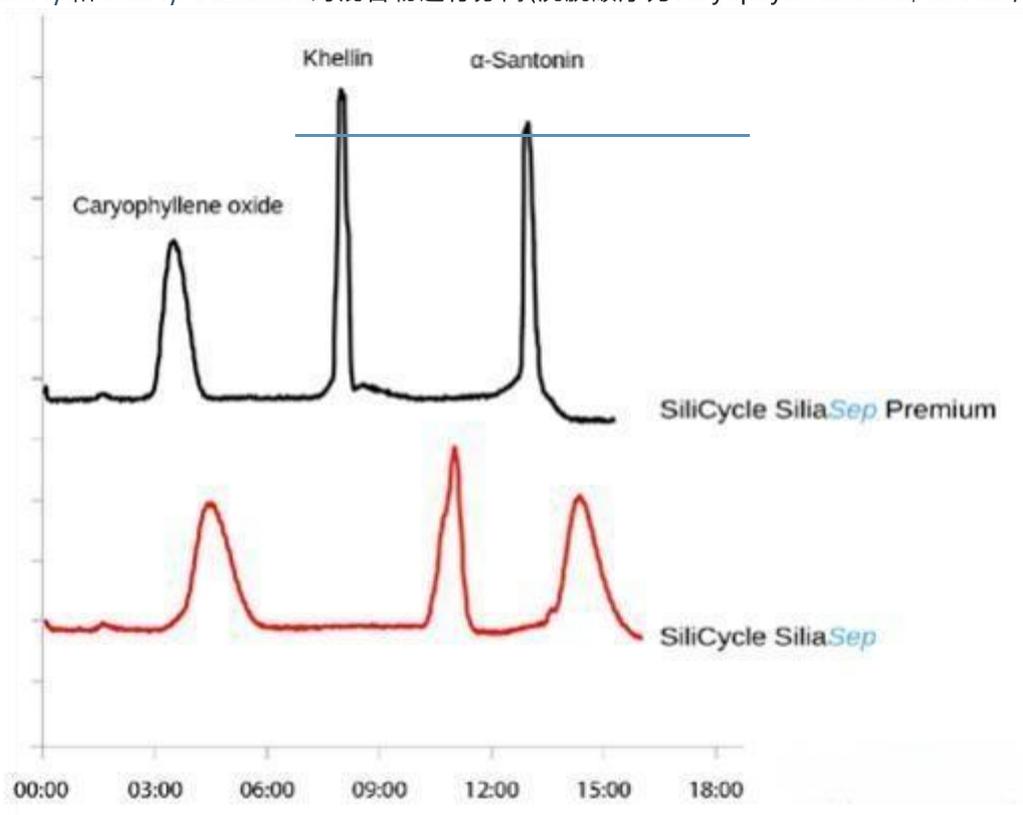
表1:色谱条件

色谱条件	
参数	数值
柱类型	#1: SiliaSep PREMIUM Flash 柱, 纯硅胶, 25 μm, 90 Å #2: SiliaSep Flash 柱, 纯硅胶, 40 - 63 μm, 60 Å
产品编号	#1: FLH-10095D-A-ISO40 #2: FLH-R10030B-ISO40
梯度	1. 100 % 二氯甲烷 (1.25 CV) 2. 99.4 % 二氯甲烷 0.6 % 异丙醇 (11 CV) 3. 97 % 二氯甲烷, 3 % 异丙醇 (7 CV)
温度	25°C
流速	60 mL/min
检测	UV 215 nm
上样	取一半混合物溶液溶于甲醇中

缩写使用:CV =柱体积

SiliCycle SiliaSep PREMIUM 球形和SiliaSep不规则硅胶柱效果比较

图2: 使用SiliaSep和SiliaSep PREMIUM对混合物进行分离(洗脱顺序为Caryophyllene oxide, Khellin, α -Santonin)



与不规则硅胶相比，球形硅胶提供了更高的分离效率，更好的分辨率和更大的上样能力，特别是对于那些难分离的化合物。如图2所示，SiliaSep PREMIUM Flash柱的分离效果更好，谱带更窄，分离度更明显。

因此，我们选择使用球形硅胶作为余下这些步骤的实验材料。同样的方法和实验方案被应用于五个不同品牌的Flash柱上(在形状，粒径和孔径方面都相似)。

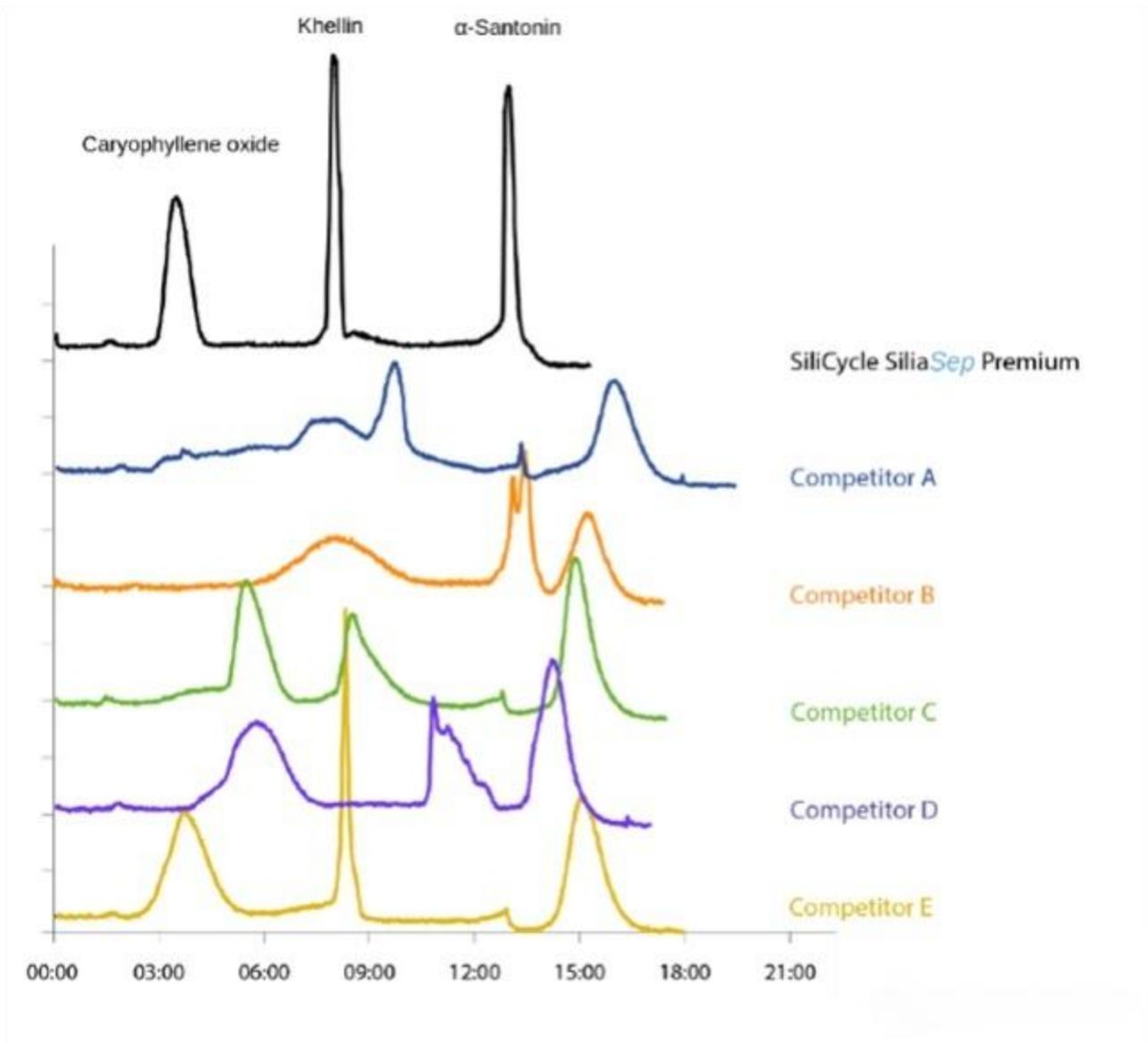
不同品牌球形硅胶比较

本实验使用的柱规格如表2所示。

表2：不同品牌柱子和硅胶的比较

不同品牌柱子和硅胶的比较			
	柱规格 (g)	粒径 (μm)	孔径 (\AA)
SiliaSep PREMIUM	40	25	81.5
厂商 A	40	20 - 35	67.6
厂商 B	50	25	49.9
厂商 C	40	30	62.8
厂商 D	40	25	88.1
厂商 E	40	30	67.7

图3:使用不同厂家的Flash分离混合物



如图3所示，五个品牌的Flash柱中有四个性能不佳，只有竞争对手E按照表1所示的方案也提供了较好的分离。

竞争对手A的柱子产生的色谱图在第二个峰上有一个肩峰并且没有返回到基线。没有形成水平的基线可能是出现了上样过载。在色谱柱的选择中，比较两个具有相似性能但载样能力不同的柱子是非常有必要的。更大的上样能力可以节省时间和溶剂，因为在相同的数量的样品下，上样量越大，运行次数越少。如果从这一维度上比较，那么SiliCycle的SiliaSep Premium系列比这个竞争对手有更大的上样能力。

在竞争对手B的色谱图中，发现谱峰很宽并且存在裂峰，保留时间也较长，峰间的分离度差。分析物进样的浓度超过了固定相的吸附容量可能导致保留时间的偏移和不理想峰形的产生。这是上样过载的表现。

竞争者C的谱图表现出基线漂移和拖尾现象。拖尾表明有一些分子比其他分子保留得更多(与固定相的相互作用更多)。固定相的吸附平衡过程缓慢也可能是造成拖尾的一个原因，同样上样过载也会造成平衡缓慢。

第4个竞争对手的谱图(竞争对手D)显示所有的峰都存在峰过宽。第二峰的峰尾和最后一个峰的峰前分离也不完全。

最后，竞争对手E的谱图有两个宽峰(第一和第三)并且第二个峰很尖。但这些峰的形状足以做到完全分离。因此，这个柱提供了除SiliCycle的柱子之外相对可接受的分离。

需要注意的是，该色谱运行条件是在SiliCycle的SiliaSep PREMIUM Flash柱上优化的，而不是针对每个竞争对手的柱进行单独优化的。使用该色谱条件得到的结果可能与其他条件下不同。因此在没有花时间优化方案的情况下，不应在更换不同厂商的柱子时直接复制色谱条件。

影响分离效果的因素很多，吸附剂的选择及其性能是其中比较重要的。如图2所示，硅胶的形状(即不规则或球形)是需要考虑的，球形硅胶可以提供了更好的分离效率和针对更难分离化合物时的分辨率。如前所述，上样能力是另一个因素：吸附剂的上样能力越大，分离效率就越高。较宽的粒径分布也会导致床层结构较差，化合物的行径会遵循优先路径，导致峰不均匀。填料的装填也需要纳入考虑，因为不均匀的装填会造成与宽粒度分布相同的结果。在采购硅胶Flash柱改善色谱结果时，应考虑以上所有这些标准。

结论

综上所述，一些色谱分离上的难题可以通过优化运行条件来解决，但有时只有更换不同供应商的柱子才能改善色谱结果。如上所述，并非所有的Flash柱在相同的条件下都能提供相同的分离结果，尽管这些柱的参数非常相似。宽粒度分布、填料装填、低上样能力以及其他相关填料材料问题都最好避免。在杂环类化合物的分离中，SiliCycle的Flash柱粒径分布窄，填充方式均匀，上样能力大，因此SiliaSep PREMIUM在六种测试的柱中分离效率最高。