

【应用合集】No.4 | SiliaChrom Plus C18 HPLC 柱分离皮质类固醇物质的可放大性应用

实验

皮质类固醇物质的高效液相分离简介

高效液相色谱是一种针对有机化合物纯化，如皮质类固醇物质，非常有效的方法。泼尼松，泼尼松龙，甲强龙以及去炎松都是常用的皮质类固醇物质（如图 1 所示），他们十分便宜并且药效很快。

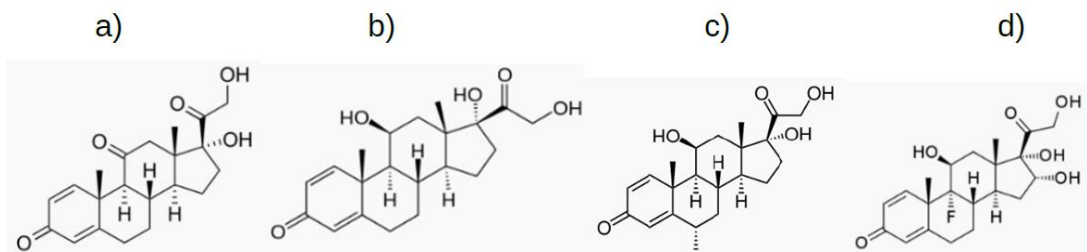


图 1. a) 泼尼松, b) 泼尼松龙, c) 甲强龙 d) 去炎松的化学结构式

如图所示这四种物质结构十分相似，这也使得他们的分离变得很有挑战性，尤其是针对量大时的分离。这篇应用案例将详细描述将泼尼松和泼尼松龙从皮质类固醇物质中分离的方法开发，以及使用 SiliaChrom Plus C18 柱子从分析级到半制备级的转换。

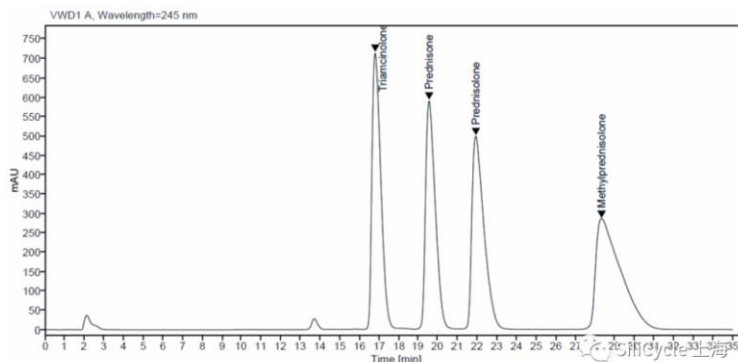
分析级色谱条件开发

我们首先对 4.6 x 250 mm 的 C18 分析柱的分离条件进行优化（表 1 所示）。这些分离条件最终实现了有效的分离，如图 2 的谱图所示。

表 1. 4.6 x 250 mm 色谱条件

色谱条件	
参数	数值
柱型号	SiliaChrom Plus HPLC, C18, 4.6 x 250 mm, 10 μ m, 100 Å
产品编号	HPL-S03207E-A-N250
流动相	梯度 流动相 A: 水 流动相 B: 甲醇 1. 80 % A 到 50 % A (15 min) 2. 50 % A (17 min) 3. 80 % A (3 min)
流速	2.0 mL/min
检测	245 nm

图 2. 使用 SiliaChrom Plus C18 分析柱分离皮质类固醇物质混合物



在分析柱上确定最大上样量

为了放大 HPLC 的方法，一旦在分析柱上确定了洗脱条件，可以在同一分析柱上通过增加注射体积中的样品质量逐步增加上样量。持续这样的操作直到该分离的分辨率达到一个能接受的最低下限，在这个点下一旦再增加载样量分辨率就会变得不合格。因此我们使用了 6 个依次增加的样品量打入分析柱使其达到了上面所提及的这个点(0.25, 0.40, 3.35, 5.00, 6.35 和 13.30 mg)。在分析柱上测试好的条件及可能的最大上样量将被转换至半制备柱中应用。

放大至半制备柱上参数的确定

选取和分析柱相同长度的一根半制备柱 (10 x 250 mm)。这确保了泼尼松和泼尼松龙的保留时间和分辨率可以在两种不同内径的柱上在可放大性上能进行比较。

半制备柱的流速由方程 1 决定：

方程 1. 半制备柱的流速

$$V_2 = \frac{V_1(r_2)^2}{(r_1)^2}$$

 SiliCycle 上海

其中: V2 = 半制备柱的流速

V1 = 分析柱的流速

r2 = 半制备柱半径

r1 = 分析柱半径

最终算出半制备柱的流速为 9.45 mL/min。再使用方程 2 决定半制备柱的上样量：

方程 2. 上样量的计算

$$X_2 = \frac{X_1(r_2)^2 C_1}{(r_1)^2}$$

 SiliCycle 上海

其中: X2 = 半制备柱的最大上样量

X1 = 分析柱的最大上样量

r2 = 半制备柱半径

r1 = 分析柱半径

C1 = 半制备柱长度/分析柱长度

计算得到半制备柱的上样量为 1.18, 1.89, 15.83, 23.63, 31.43 和 62.85 mg。DMSO 因其对有机化合物的良好溶解性被选择为上样用的溶液，尤其是在半制备色谱中需要高浓度上样时。另外，DMSO 洗脱也非常快速，确保了不会覆盖或影响所关注的峰。

放大至半制备柱上运行结果

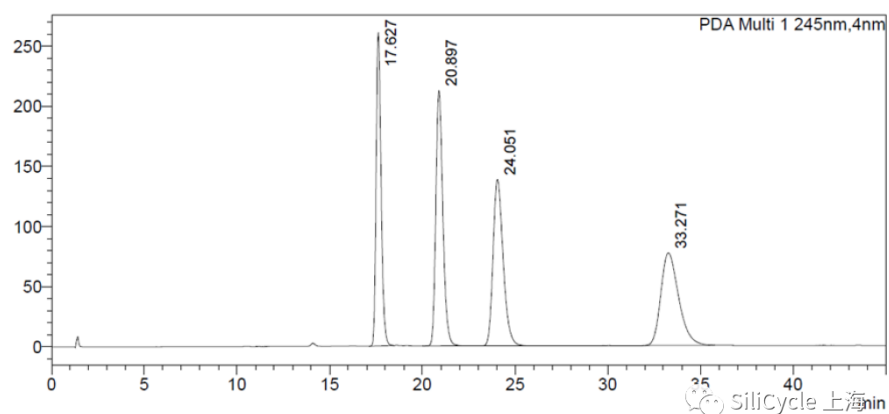
色谱条件如表 2 所示。实验得到的谱图如图 3。

表 2. 半制备柱色谱条件

色谱条件	
参数	数值
柱子	SiliaChrom Plus HPLC, C18, 10 x 250 mm, 10 μ m, 100 \AA
产品编号	HPL-S03207E-A- Q250
流动相	梯度 流动相 A: 水 流动相 B: 甲醇 4. 80 % A 至 50 % A (15 min) 5. 50 % A (17 min) 6. 80 % A (8 min)
流速	9.45 mL/min
检测	245 nm

SiliCycle 上海

图 3. 使用 SiliaChrom Plus C18 半制备柱分离皮质类固醇物质谱图



在半制备级别上对皮质类固醇物质的保留时间和在分析级别上是几乎相似的。轻微的差别可能是由于所使用仪器空隙体积的不同和用了不同的泵(二元泵用于半制备, 四元泵用于分析)。相似保留时间的呈现说明了在不同内径的 SiliaChrom Plus HPLC 柱上具有可放大性, 并且对于梯度分离来说这种这种放大是近乎线性的。

总结

该案例使用 SiliaChrom Plus C18 分析柱分离了一种皮质类固醇物质的混合物。并且使用 SiliaChrom Plus C18 半制备柱进行了放大。在半制备柱上得到了与分析柱相似的保留时间, 说明了使用该 HPLC 柱的可线性放大性。