

HPLC phân tích đến HPLC chuẩn bị: Kỹ thuật mở rộng quy mô bằng cách sử dụng chiết xuất sản phẩm tự nhiên

Andrew Aubin và Ronan Cleary
 Waters Corporation, Milford, MA, US

GIỚI THIỆU

Các phương pháp tách sắc ký có thể được phát triển trên mọi quy mô. Để giảm thiểu việc tiêu thụ mẫu và dung môi, có một lợi ích trong việc phát triển các phương pháp tách ở quy mô nhỏ và chuyển chúng sang quy mô lớn hơn. Việc tính đến các thông số quan trọng và áp dụng các hệ số tỷ lệ thích hợp, theo cách hợp lý, cho phép người dùng mở rộng quy mô từ sắc ký phân tích sang các phân tách điều chế quy mô lớn hơn một cách dễ dàng và thành công. Trong ứng dụng này, lưu ý sự phân tách ở quy mô phân tích của Kudzu (*Pueraria lobata*) chiết xuất từ rễ được sử dụng để chứng minh các tính toán và kỹ thuật được sử dụng để di chuyển từ cột phân tích 4,6 mm, qua cột điều chế có đường kính trong 10, 19 và 30 mm.

Kudzu là một loại cây leo, thân gỗ hoặc nửa thân gỗ, sống lâu năm, có rễ củ. Rễ của cây sắn dây có chứa một số isoflavone có khả năng hữu ích, bao gồm daidzein, daidzin, genistein, genistin và quercetin. Sắn dây cũng là một nguồn độc nhất của isoflavone puerarin. Chất chiết xuất từ rễ cây sắn dây được cho là có thể làm giảm lượng rượu và giảm các triệu chứng cai rượu. Tác dụng kháng khuẩn, chống ung thư, chống viêm và chống oxy hóa cũng đã được ghi nhận.



Hình 1. Hệ thống AutoPurification.

THỰC NGHIỆM

Khai thác

Phần rễ cây Kudzu (20 g) được thêm vào 100 mL nước / methanol 9: 1 và lắc trong 1 giờ, để yên qua đêm và lắc thêm 1 giờ. Dịch chiết được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng / phút trong 20 phút và được sử dụng mà không cần xử lý thêm.

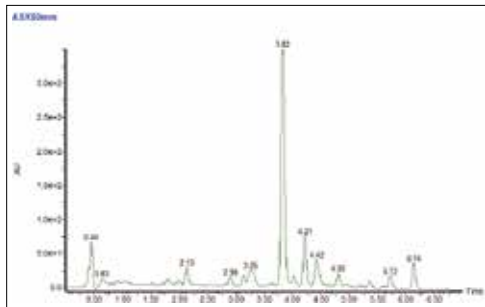
Sự tách biệt Sự phân tách sắc ký, ở tất cả các quy mô, được thực hiện bằng cách sử dụng Waters® Hệ thống AutoPurification™ (Hình 1), bao gồm các thành phần sau:

Bơm	Waters 2545 Binary Gradient
Đầu dò	Module Waters 2998 Photodiode Array Waters 3100 Mass Detector
Bộ tiêm mẫu/ thu mẫu	Waters 2767 Sample Manager
Bộ quản lý cột	Waters System Fluidics Organizer

Sự phân tách ở quy mô phân tích ban đầu được phát triển trên cột 5,6 x 50 mm Waters SunFire™ C18, 5 µm, sử dụng các điều kiện được mô tả bên dưới.

Nhiệt độ cột:	Môi trường xung quanh
Tốc độ dòng:	1,5 mL / phút
Pha động A:	Nước + 0,1% axit fomic
Pha động B:	Metanol
Gradient	5 đến 70% B trong 7 phút
Thể tích tiêm	20 µL
Điều kiện phát hiện:	UV (200 đến 400 nm) và MS Full Scan 150 đến 700 m / z

Sắc ký đồ thu được (Hình 2) cho thấy một số hợp chất đã phân giải và được coi là một ứng cử viên chấp nhận được để mở rộng quy mô.



Hình 2. Phân tích phân tích (4,6 mm ID) của chiết xuất rễ Kudzu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phương pháp mở rộng quy mô

Một cách tiếp cận có hệ thống để mở rộng quy mô sẽ mang lại kết quả tốt nhất có thể. Mục đích cuối cùng là duy trì độ phân giải sắc ký giữa các thành phần chính và cho phép người dùng dự đoán tốt hơn hiệu suất sắc ký giữa sắc ký phân tích và sắc ký điều chế.

Có một số yếu tố chính cần xem xét khi tiếp cận quá trình mở rộng quy mô này.

Hóa học cột

Yếu tố quyết định của sự phân tách là cột. Tốt nhất là bạn nên chọn các hóa chất cột giống hệt nhau. Nếu cột phân tích và cột chuẩn bị có hóa học khác nhau thì việc dự đoán sự phân tách chuẩn bị dựa trên kết quả phân tích trở nên rất khó khăn.

Waters cung cấp một loạt các lựa chọn hóa học cột có sẵn trong các kích thước quy mô phân tích và chuẩn bị. Cũng như bản thân hóa học, kích thước hạt cũng cần được xem xét. Các cột có cùng kích thước hạt sẽ cung cấp độ phân giải tương tự của các cặp quan trọng ở cả hai thang phân tách. Chiều dài cột cũng ảnh hưởng đến hiệu quả phân tách; các cột có độ dài giống nhau, khi được chia tỷ lệ, cho khả năng phân tách tương tự. Có thể chia tỷ lệ thành các cột ngắn hơn hoặc dài hơn, nhưng hãy nhớ rằng sự phân tách sẽ thay đổi.

Thể tích tiêm

Để duy trì hình dạng đỉnh và khả năng chịu tải, thể tích phun cần được điều chỉnh tỷ lệ thích hợp bằng cách sử dụng công thức sau:

$$Vol_{PREP} = Vol_{ANALYTICAL} \cdot \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{ANALYTICAL}} \cdot \frac{L_{PREP}}{L_{ANALYTICAL}}$$

trong đó Vol là thể tích bơm (μL), D là đường kính trong của cột (mm) và L là chiều dài cột (mm). Ví dụ, tiêm 20 μL trên cột 4,6 x 50 mm tương ứng với tiêm 341 μL trên cột chuẩn bị 19 x 50 mm.

Lưu lượng dòng chảy

Để duy trì chất lượng phân tách, tốc độ dòng chảy phải được chia tỷ lệ dựa trên kích thước cột. Với các cột có kích thước hạt giống hệt nhau, phương trình sau được sử dụng để chia tỷ lệ hình học về tốc độ dòng chảy:

$$F_{PREP} = F_{ANALYTICAL} \cdot \frac{D^2_{PREP}}{D^2_{ANALYTICAL}}$$

trong đó F là tốc độ dòng (mL / phút) và D là đường kính trong của cột (mm). Ví dụ, tốc độ dòng 1,5 mL / phút trên cột ID 4,6 mm tương đương với tốc độ dòng 25,6 mL / phút trên cột ID 19 mm.

Gradient

Khi các cột có cùng độ dài, không cần thay đổi cấu hình gradient. Nếu mở rộng quy mô thành các cột dài hơn hoặc ngắn hơn, khối lượng phân đoạn gradient phải được duy trì để bảo toàn cấu hình phân tách.

Phần mềm chuẩn bị cho mật độ giường tối ưu của Waters (OBD™), bản tải xuống miễn phí, (Hình 3) là một công cụ để sử dụng hỗ trợ trong các phép tính chia tỷ lệ từ phân tích đến chuẩn bị này (tìm kiếm trên

www.waters.com cho "Prep Máy tính" hoặc truy cập

www.waters.com/prepcalculator). Waters OBD Prep Calculator

được sử dụng để chuyển đổi phương pháp tách phân tích thành

các phương pháp tách chuẩn bị được mô tả trong ghi chú ứng dụng này.



Hình 3. Phần mềm OBDPrep

Sử dụng Phần mềm OBDPrep

Để tính toán khối lượng phun và tốc độ dòng chảy, hãy chọn tính toán chia tỷ lệ khối lượng tải (Hình 4) từ màn hình mở. Nhập kích thước cột phân tích và chuẩn bị, tốc độ dòng phân tích và thể tích bơm và máy tính trả về các giá trị chuẩn bị chính xác.



Hình 4. Tính toán tỷ lệ tải trong khối lượng Waters OBD Prep Calculator.

Nếu độ dài cột của bạn giống hệt nhau, bạn có thể chỉ cần nhập tốc độ dòng chuẩn vào bảng gradient của mình bằng cách sử dụng cùng thời gian phân đoạn gradient như phương pháp phân tích của bạn. Ngoài ra, đối với phương pháp gradient, hãy chọn phép tính vô hướng gradient cơ bản (Hình 5) từ màn hình mở, chọn kích thước cột phân tích và cột chuẩn bị của bạn, nhập bảng gradient phân tích của bạn và nhấp vào nút Tính toán. Bảng gradient chuẩn bị được tự động tính toán và hiển thị ở nửa dưới của trang. Hướng dẫn Sử dụng Máy tính Waters OBD Prep cung cấp hướng dẫn chi tiết về cách sử dụng tất cả các chức năng của máy tính.



Hình 5. Tính toán vô hướng gradient cơ bản của Waters OBD Prep Calculator.

KẾT QUẢ

Để chứng minh các kỹ thuật được mô tả trước đó, phương pháp phân tách phân tích được mô tả trong phần thử nghiệm được chia tỷ lệ thành ba cột kích thước chuẩn bị khác nhau (10,0, 19,0 và 30,0 mm ID). Tốc độ dòng chảy được chia tỷ lệ và khối lượng phun (tất cả được tính bằng Máy tính chuẩn bị OBĐ của Waters) được thể hiện trong Bảng 1.

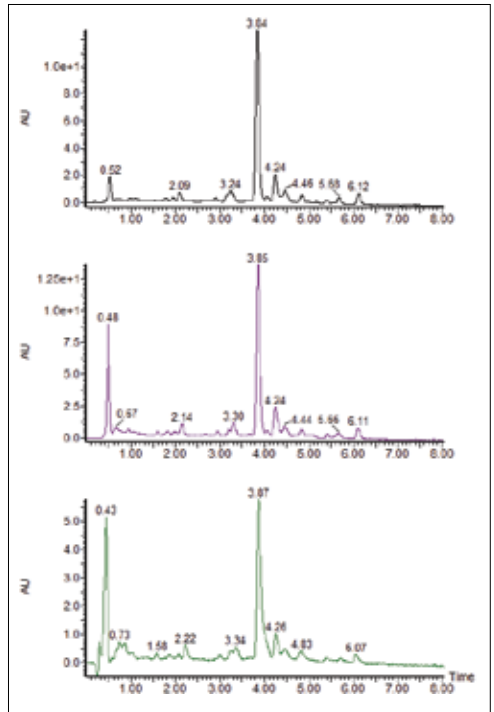
Đường kính trong (mm)	Tốc độ dòng (mL / phút)	Thể tích tiêm (L)
4,6	1,5	20
10.0	7.1	95
19.0	25,6	341
30.0	63,8	851

Bảng 1. Waters OBĐ Prep Calculator đã điều chỉnh tốc độ dòng chảy và thể tích tiêm.

Tất cả các cột điều chế đều là SunFire Prep C18 OBĐ, dài 5 μm , 50 mm và tất cả các phép phân tách được thực hiện trên cùng một hệ thống như sắc ký quy mô phân tích.

Như có thể thấy trong Hình 6, bất kể tỷ lệ, sắc ký (UV TIC) là rất giống nhau. Khi so sánh với đường kính trong 4,6 mm ban đầu (Hình 2), có thể thấy rằng về độ phân giải và thời gian lưu của sắc ký lại rất giống nhau.

Thí nghiệm đơn giản này chứng minh rằng cách tiếp cận có hệ thống để mở rộng quy mô đáp ứng mục tiêu duy trì độ phân giải sắc ký giữa các thành phần chính và cho phép người dùng dự đoán tốt hơn hiệu suất sắc ký giữa sắc ký phân tích và sắc ký điều chế. Ví dụ này cũng thể hiện khả năng độc đáo của Hệ thống tự động làm sạch Waters, cho phép người dùng thực hiện cả sắc ký phân tích và chuẩn bị trên cùng một hệ thống mà không ảnh hưởng đến hiệu suất.



Hình 6. Các khoảng phân cách chuẩn bị theo tỷ lệ, 10 mm ID (trên), 19 mm ID (giữa), 30 ID (dưới).

KẾT LUẬN

Sắc ký phân tích có thể được mở rộng thành sắc ký điều chế một cách dễ dàng bằng cách sử dụng phương pháp hệ thống.

- Việc sử dụng hóa học cột giống hệt nhau và độ dài cột giống hệt nhau duy trì chất lượng phân tách.
- Thiết kế cột Mật độ giường tối ưu (OBD) độc quyền của Waters cung cấp khả năng tải mẫu tuyệt vời và độ ổn định của cột trong nhiều loại hóa chất và cấu hình.
- Waters Prep OBD hỗ trợ tính toán tỷ lệ.
- Sử dụng Hệ thống lọc tự động Waters, các phương pháp tách có thể được phát triển trên quy mô phân tích và chuyển sang quy mô điều chế trên cùng một hệ thống, giảm đầu tư vốn tổng thể của phòng thí nghiệm.
- Việc phát triển các phương pháp trên quy mô phân tích và chuyển chúng sang quy mô chuẩn bị làm giảm tiêu thụ dung môi và mẫu, đồng thời giảm chi phí xử lý chất thải, so với

chỉ phát triển các phương pháp phân tách ở quy mô chuẩn bị.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters là thương hiệu đã đăng ký của Waters Corporation.

AutoPurification, OBD, SunFire và The Science of What's Possible là các thương hiệu của Waters Corporation. Tất cả các nhãn hiệu khác là tài sản của chủ sở hữu tương ứng của họ.

© 2009 Waters Corporation. Được sản xuất tại Hoa Kỳ vào tháng 6 năm 2009. 720003120en AG-PDF

Reference

1. DR for Herbal Medicines. Thompson Healthcare Inc, Montvale NJ, U.S.A. 2007; 4th Ed.