

重叠进样功能在手性化合物拆分与纯化中的应用

SFC-020

摘要：本文简述利用 Nexera UC 和 UC Prep 开发超临界流体色谱制备方法的过程，介绍了重叠进样方式在手性化合物拆分制备系统中的应用方式。实际案例结果比对，使用重叠进样方式分离效率较传统提升 2.3 倍，时间和试剂的消耗量在相同制备量下减少 134%，可显著提升工作效率。11 次重叠进样过程中，各主要色谱峰对应的峰面积和面积 / 峰高比的 RSD 在 5.5% 以内，保留时间差 RSD 在 0.6% 以内，各峰峰宽和分离度变化在 7% 以内，体现出良好的系统稳定性。

关键词：Nexera UC Prep 手性化合物 超临界流体色谱

超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 尤其是以超临界 CO₂ 为主要流动相的分析分离体系，因具有分析速度快、立体选择性好、分离效率高、溶剂消耗少，并且具有环境友好、廉价易得、馏分后处理简单等特点，在包括手性药物在内的光学

异构体分析和拆分中具有重要作用。

本文简述了利用 Nexera UC 和 UC Prep 开发超临界流体色谱制备方法的过程，并着重就重叠进样制备方式进行介绍，在所举案例中使用重叠进样方式分离效率较传统提升 2.3 倍。

■ 手性化合物的色谱分离

手性化合物拆分是手性化合物研究中重要的组成部分，常见的手性化合物拆分方法包括动力学拆分法、结晶法、化学拆分法、生物拆分法及色谱分离法等。这其中以色谱分离法最为常见。手性色谱分离方法有薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、毛细管电泳法及超临界流体色谱法 (SFC) 等。SFC 具有分离速度快、分离效率高、有机溶剂消耗少、馏分后处理简单等特点，越来越多在现在的手性化合物分离分析中得到应用。同时二氧化碳具有价廉易得、无毒低活性等特点，让以二氧化碳为主要流动相的 SFC 在手性化合物拆分领域得到更多的应用。

同分析型 SFC 相比，制备型 SFC 不仅是所有色谱组件进行了相应的放大，最主要的区别在于分离规模和目的的不同，表现在固定相、时间和原料的最大化利用。当需要多次进样来处理某个样品时，常常使用重叠进样方式来实现，利用 SFC 等度分离过程中，完成前一次运行之前注入第二次样品溶液的方法使生产量和生产率最大化。本例通过手性化合物的制备分离演示了重叠进样的优势。

■ 仪器与配置

Nexera UC 超临界流体色谱分析系统

CO₂ 输送泵：LC-30AD SF

自动进样器：SIL-30AC

背压调节器：SFC-30A

控制器：CBM-20A

Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统

CO₂ 输送泵：LC-40P SF

热交换器：HEX-40

背压调节器：SFC-40P

控制器：CBM-40

自动进样及馏分收集器：FRS-40

改性剂输液泵：LC-30AD

柱温箱：CTO-20AC

检测器：SPD-M20A

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

改性剂输液泵：LC-20AP

补偿泵：LC-20AR

柱温箱：CTO-40C

检测器：SPD-M40

色谱工作站：LabSolutions V. 5.98; PrepSolution V.1.0



图1 Nexera UC 手性筛选系统和 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

■ 结果与讨论

3.1 拆分条件的探索

超临界流体色谱方式进行手性化合物拆分，成功与否极大程度上取决于所采用的色谱柱填料类型。虽然改性剂类型、添加剂、超临界流体温度和压力等因素对拆分效果也有作用，但相比于色谱柱的贡献较为薄弱。因此，适合填料的色谱柱类型筛选工作效率提升对于后期手性样品拆分成功具有事半功倍的作用。

Method Scouting 系统是专门用于自动化进行拆分条件筛选的 SFC 分析系统。通过专用软件控制自动化进行多个待用色谱柱切换和批量进样分析，可 24 小时不间断实现样品分离条件的筛选，为之后使用 UC Prep 规模放大进行纯化操作时提供色谱柱使用方案。

本例中所分析合成化合物具有两个手性中心，因此合成产物有四个异构体，相较于一般单手性中心化合物分离有一定的难度。采用 Method Scouting 进行方法筛选后，确定使用 CHIRALPAK IB 色谱柱作为下一步手性拆分纯化使用。

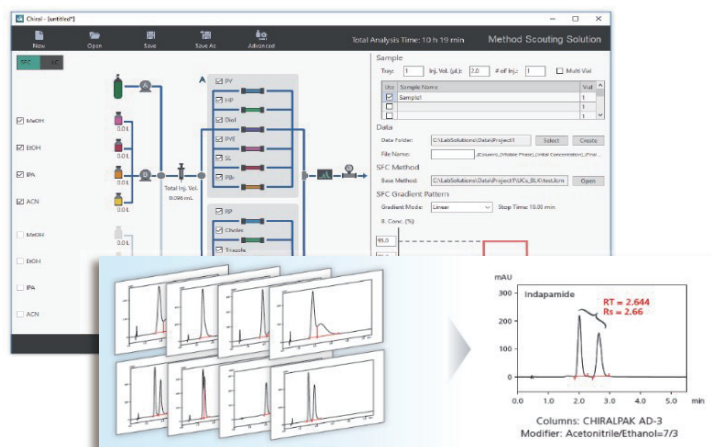


图2 Method Scouting 系统用于手性拆分条件筛选

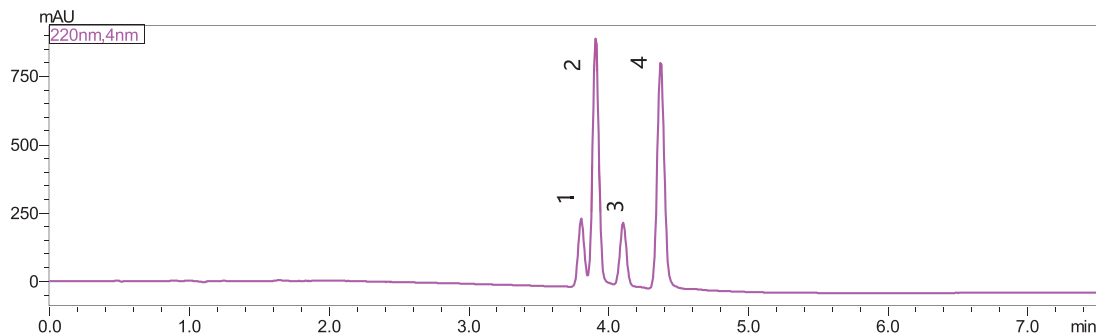


图3 合成化合物 SFC 分析色谱图显示具有明显 4 个异构体色谱峰

Nexera UC 色谱条件：

色谱柱：CHIRALPAK® IB/SFC 100 mm×4.6 mmI.D., 5 μm

流动相：A相 -scCO₂ B相 - 甲醇 流速：2.5 mL/min

BPR 压力：10 MPa BPR 温度：50°C

柱温：40°C 进样量：2 μL

洗脱程序：0-1 min(10%B)-4.5-7 min(40%B)-7.01-8 min(10 min)

3.2 手性拆分和重叠进样

根据拆分结果提示，选择如下色谱柱和改性剂体系，对样品进行拆分纯化。单次进样 700 μL，在 8 min 内实现目标物的分离。由于制备型色谱柱柱效较分析型低，1# 和 2# 异构体色谱峰未能完全分离，做合并收集处理；2#、3# 与 4# 色谱峰之间呈基线分离态势，予以分别收集。

Nexera UC Prep 色谱条件：

色谱柱：CHIRALPAK® IB/SFC 250 mm × 20 mm I.D., 5 μm

流动相：A相 -scCO₂ B相 - 甲醇 流速：40 mL/min

BPR 压力：10 MPa BPR 温度：50°C

柱温：40°C 进样量：700 μL

洗脱程序：等度洗脱，32% B相 补偿流速：2 mL/min

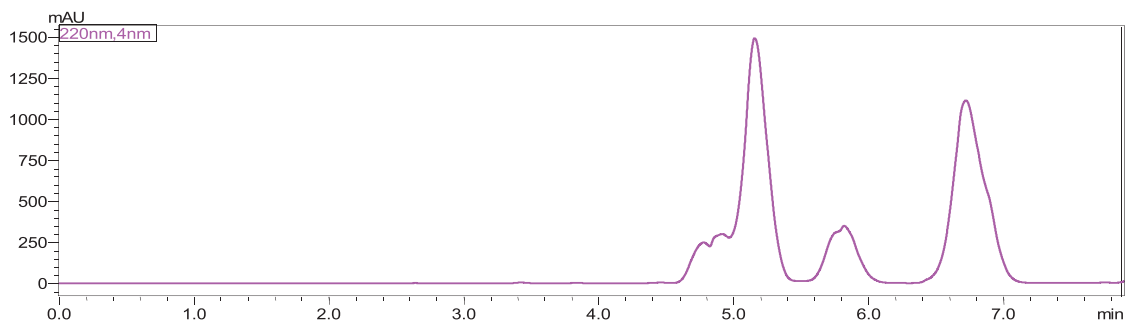


图 4 手性化合物拆分制备条件探索

在 LabSolutions 工作站“实时分析”窗口 - “方法参数”界面 - “进样器”页面下，可以通过简单设置完成重叠进样功能的开启。

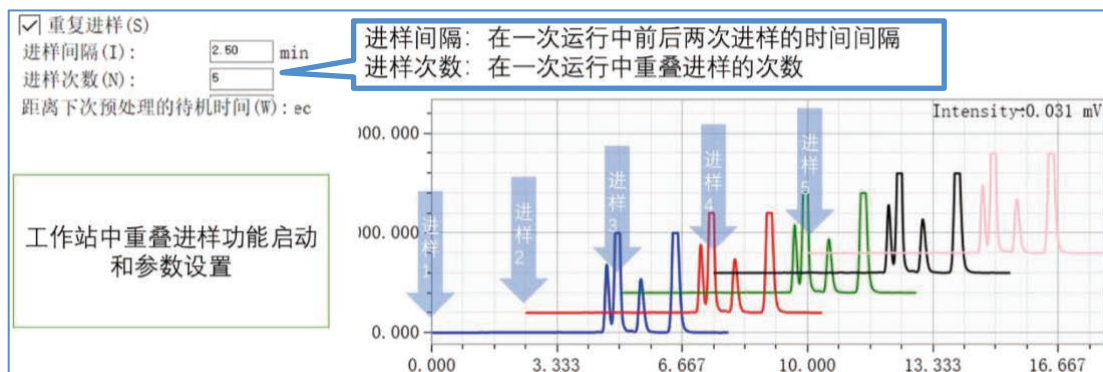


图 5 在 LabSolutions 中开启重叠进样模式并进行收集条件模拟

通过如图 5 软件界面设置相关参数后，UC Prep 实现重叠进样方式。针对该样品有效连续进样 11 次，耗时 40 min，而传统批处理连续进样方式在相同时间内尚不能完成进样 5 次。

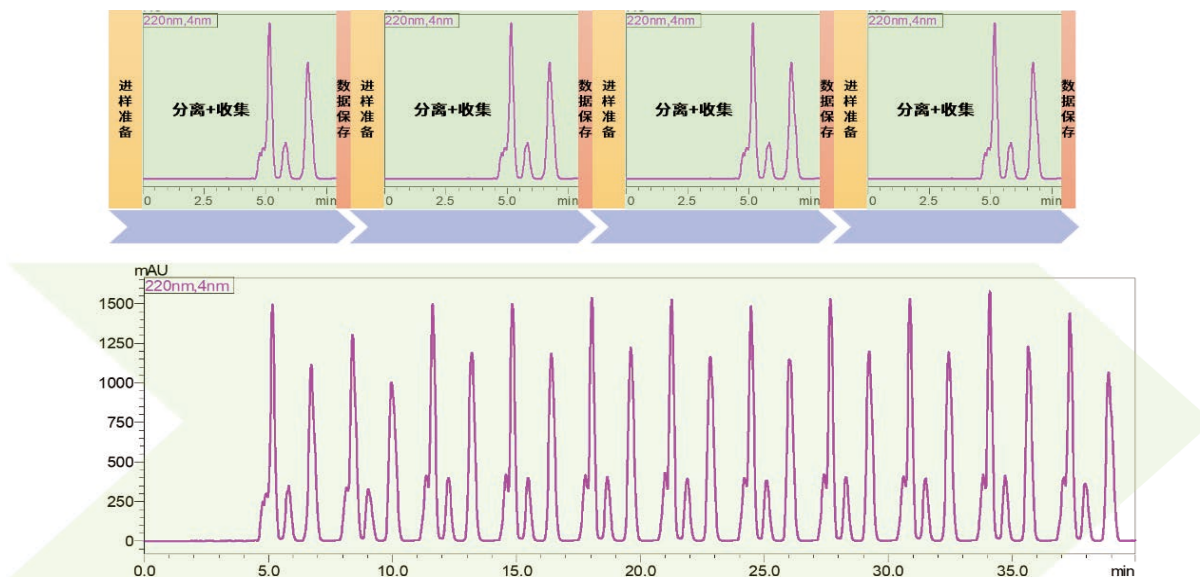


图 6 相同时间内常规进样方式和重叠进样方式下工作效率比较

通过对重叠进样结果进行分析，对比每次分离中 1#2#、3# 和 4# 色谱峰的峰面积 (A) 及面积 - 峰高比 (A/H)，结果显示连续 11 次重叠进样分离过程中，色谱峰面积 (A) 及面积 - 峰高比 (A/H) 保持良好的重复性，相对标准偏差在 2.2%-2.4% 及 4.7%~5.5% 之间，各峰对应保留时间差在 0.4~0.6% 之间，各峰峰宽 (5% 峰高) 变化不超过 5%，分离度 (USP) 变化控制在 7% 以内，体现该系统在此样品的分离整个过程中具有较强稳定性。

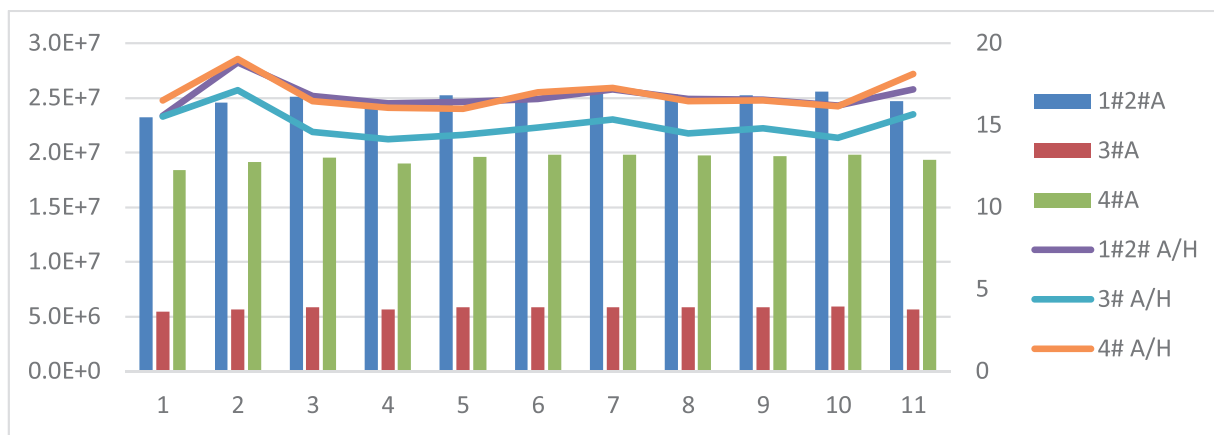


图 7 收集馏分峰面积和面积 / 峰高重复性结果

表 1 异构体拆分重叠进样 11 次的色谱行为

色谱峰	保留时间差 *		峰宽 (5% 峰高)		分离度 (USP)	
	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%
1#2#	3.2165	0.4	0.7	3.2	4.1	5.6
3#	3.2115	0.5	0.5	4.7	1.7	6.8
4#	3.2157	0.6	0.5	4.9	2.3	6.5

保留时间差 *：重叠进样分离过程中，同一化合物在相邻两次分离产生的色谱峰保留时间差

3.3 拆分结果确认

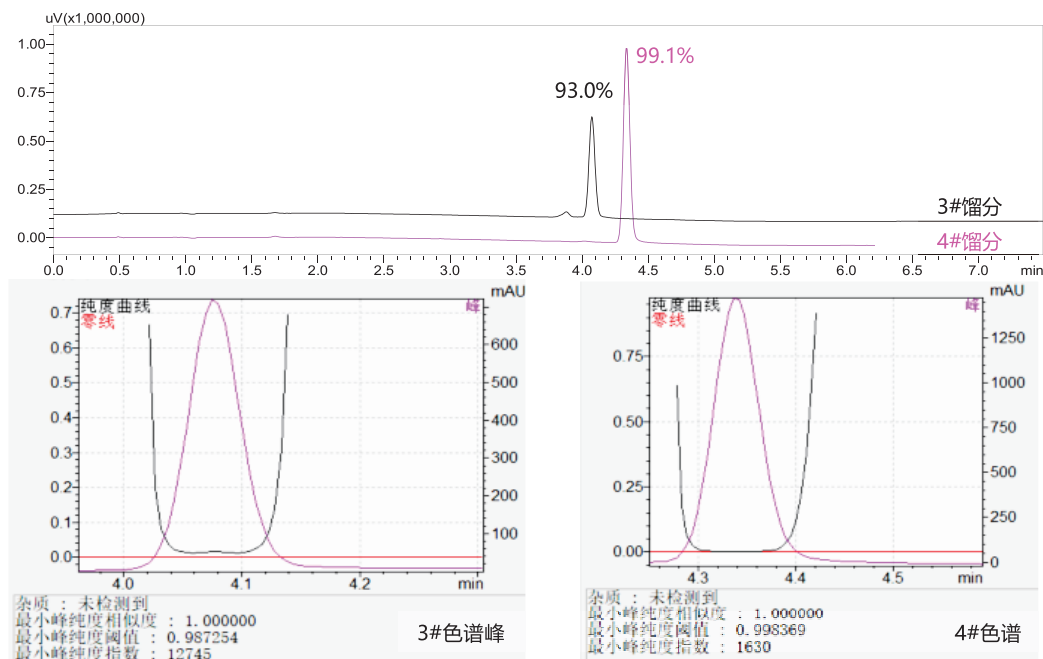


图8 3#和4#色谱峰馏分纯度测试及色谱峰纯度测试

对收集到的主要馏分进行 SFC 分析测试，3# 和 4# 馏分纯度分别为 93.0% 和 99.1%；同时对两色谱峰进行峰纯度测试，未检测到未分离杂质。

3.4 工作效率提升

同传统单次进样方式相比，采用重叠进样方式，最大程度实现了色谱系统连续不间断工作的效率。以本实验为例，计算单针处理和重叠进样方式处理结果，后者在单位时间内样品制备能力较前者提升 2.3 倍，完成相同样品制备量时，总耗时和试剂（包括 CO₂ 和有机溶剂）后者均减少 134%，同时整体上进一步降低系统使用日常费用。



图9 单针进样方式和重叠进样方式的费效比

■ 结论

超临界流体色谱由于其分离柱效高、分离速度快的特点，结合手性填料色谱柱对于手性化合物的拆分有高分离度和高选择性的优势；同时采用 CO₂ 作为主要流动相成分的超临界流体色谱，在制备后馏分溶剂回收和处理方面较反相或正相色谱具有便捷高效的特点。在制备 SFC 使用中，重叠进样模式的使用提升分离效率，降低日常溶剂使用费用，是手性化合物拆分纯化的理想手段。

岛津应用云

