

制备 SFC 重叠进样下色谱峰重复性评价

SFC-021

摘要： 本文利用 Nexera UC Prep 超临界流体色谱系统完成对手性化合物快速制备，经重叠进样方式，实现相较传统分离制备效率提升 1.8 倍，但相同制备量下时间内的溶剂消耗降低了 46%。同时对重叠进样的色谱峰进行稳定性评价，在 20 次重叠进样过程中，各主要色谱峰对应的峰面积的 RSD 在 5% 以内，保留时间差 RSD 在 0.4% 以内，各峰峰宽和分离度变化在 2% 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

制备效率的提升离不开色谱技术的发展，超临界流体色谱 (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) 技术是以超临界 CO₂ 作为新型的分离技术，具有分离效率高，分析速度快，样品制备后干燥粉末化处理便捷等优势，目前在食品、化工、医药等领域中都有使用。

重叠进样功能是 Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统高效率制备的特点，通过上一针进样过程中，完成下一针的进样工作，达到自动进样器、色谱柱、检测器高效率工作，同时能确保重叠进样色谱峰的稳定性和重现性，实现稳定可靠的高效率制备。

■ 仪器与配置

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

Nexera UC Prep 色谱条件：

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

流动相：A 相 -scCO₂ B 相 -0.1% 二乙胺甲醇

BPR 压力：10 MPa

柱温：40°C

洗脱程序：等度洗脱，35% B 相

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

流速：40 mL/min

BPR 温度：50°C

进样量：450 μL

补偿流速：2 mL/min

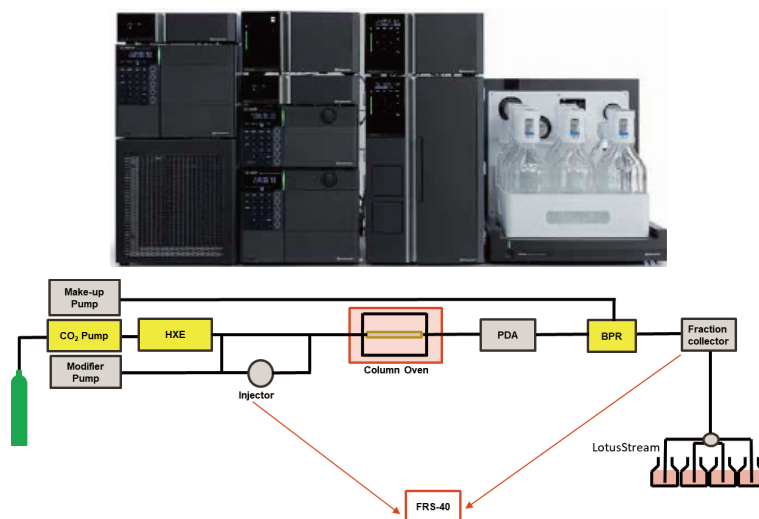


图 1 Nexera UC Prep 超临界流体制备色谱系统

■ 结果与讨论

2.1 Prep Solution 便捷便捷参数设置

Prep Solution 为 SFC Prep 专用的制备软件，可快速设置如进样，收集参数的设置，其中收集参数的设置更为便捷，其中 peak integration mode 可根据色谱峰的出峰进行起点终点的选择，一键生成收集参数，其中对于拖尾峰和其他不对称峰，可同样进行设置。模拟窗口可反馈参数设置的效果。



图 2 Prep Solution 软件制备参数设置界面

2.2 拆分条件的放大

超临界流体色谱进行方法开发过程中，同传统的制备液相方法优化差异较大，其中改性剂、色谱柱、背压、温度等因素都会影响色谱分离。影响较为显著的是色谱柱填料和改性剂比例，为获得合适的手性色谱分离条件，常需对色谱分离中的色谱柱和改性剂比例进行优化，筛选合适的色谱条件。

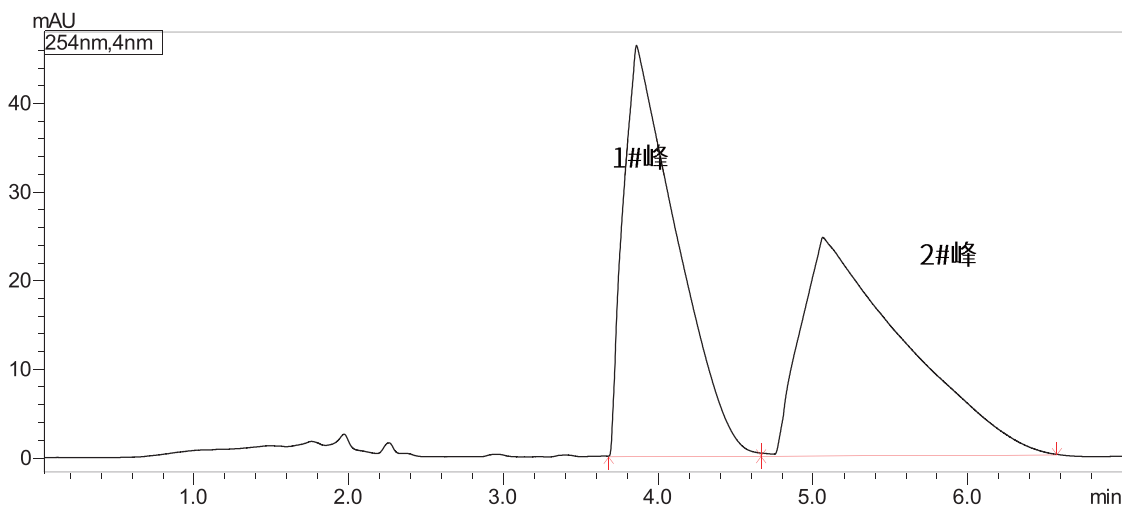


图 3 合成化合物 SFC 分析色谱图显示具有明显 2 个异构体色谱峰

岛津的 Method Scouting 软件可应用于分析方法中手性色谱柱在线切换筛选和改性剂比例的优化，可大大提升优化的效率。本例在分析优化基础上进行制备 SFC 的放大分析，其中色谱柱选用 CHIRALPAK IG, 35% 甲醇作为改性剂进行最终分离，制备色谱图如下图 3 所示。

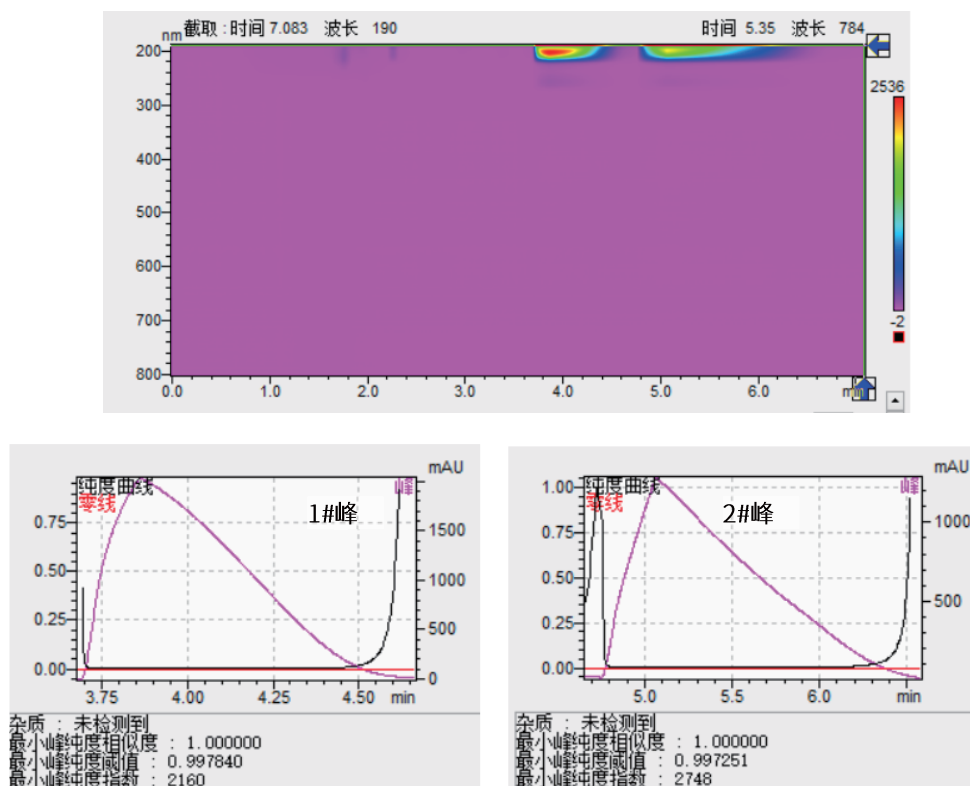


图4 色谱峰等高线视图及1#和2#色谱峰纯度测试

对收集到的主要馏分进行使用 PDA 检测器的峰纯度检测功能，对两色谱峰进行峰纯度测试，未检测到未分离杂质。

2.3 重叠进样功能

重叠进样又称重复进样功能，是利用自动进样器的间隔一定时间连续进样，实现多次重叠注入样品，色谱柱进行连续分析，减少常规进样时时间等待，柱后平衡等时间消耗，达到减少分析时间，降低溶剂消耗，单位时间提高制备量的作用。该设置方便简单，如下图所示，在 Prep Solution 工作站中“Method Editor”界面的 - “Injection/collection” 页面下，可以通过简单设置“进样间隔”和“进样次数”参数即可完成重叠进样功能的开启。

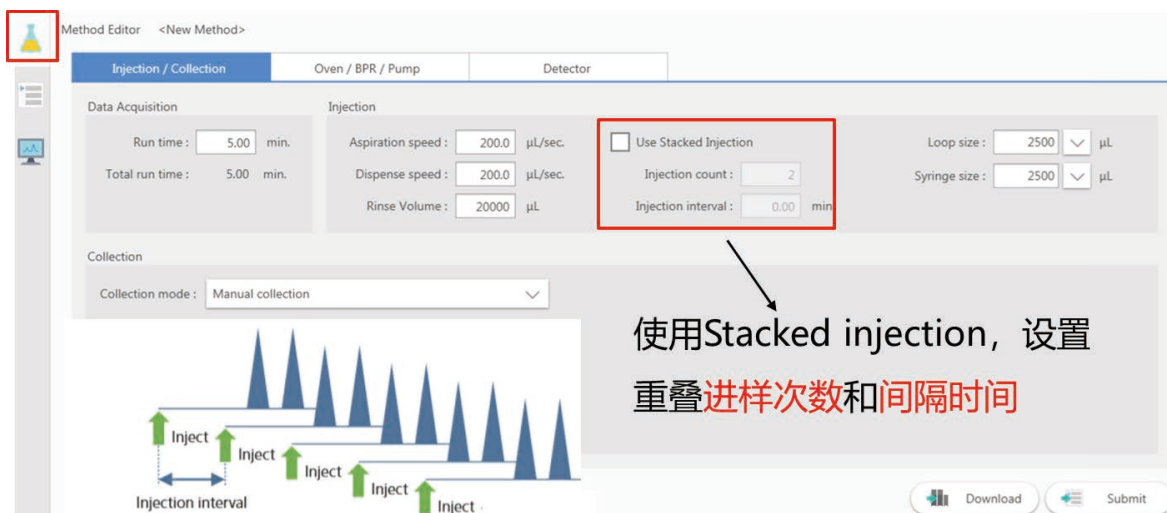


图5 Prep Solution 软件重叠进样模式图

2.4 重叠进样及稳定性评价

为了实现快速高效率的制备，使用重叠进样功能，通过 Prep Solution 工作站简单设置，完成重叠进样的功能。本例中，UC Prep 实现重叠进样方式。针对该样品有效连续进样 20 次，耗时 86 min，而传统批处理连续进样方式在相同进样次数需要超过 160 min，时间节约了 46%，相同时间制备量提升了 1.8 倍。

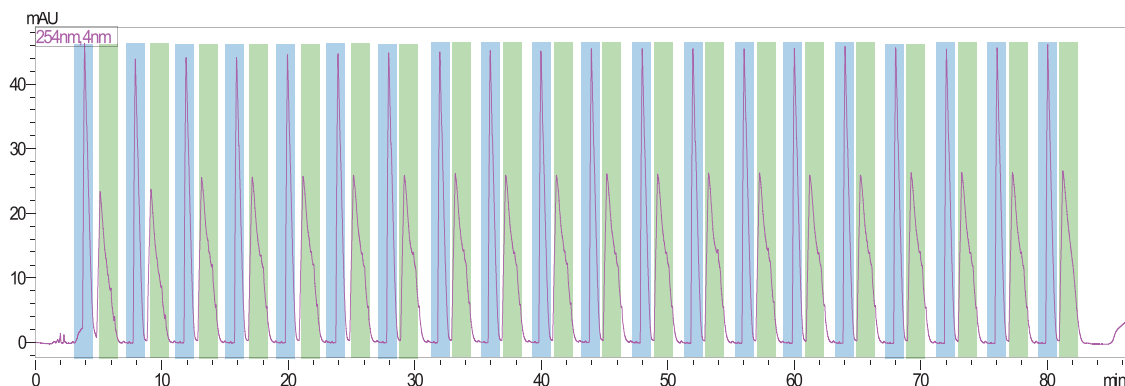


图 6 重叠进样 20 针的色谱图

通过对重叠进样结果进行分析，对比每次分离中 1#、2# 色谱峰的峰面积、保留时间差、各峰峰宽 (5% 峰高)、分离度等评价指标。结果显示连续 20 次重叠进样分离过程中，色谱峰面积及面积 / 峰高比值稳定性良好，如下图所示。

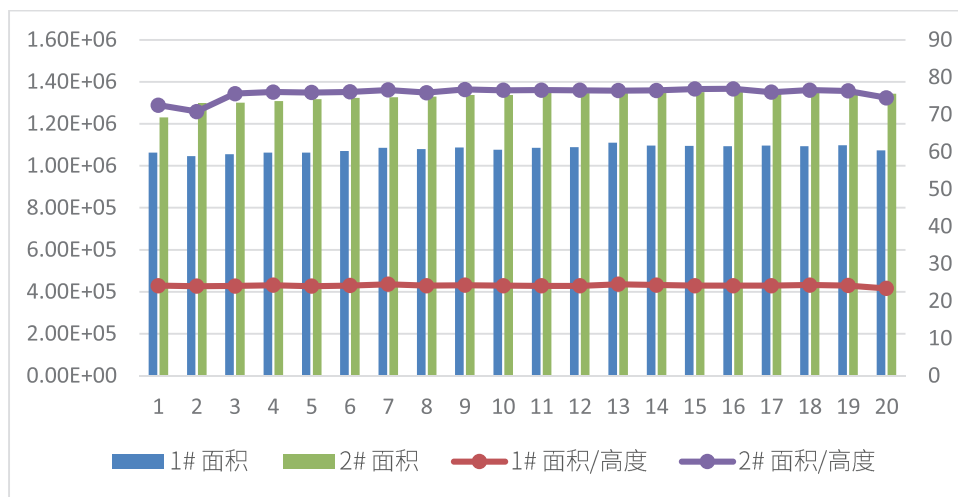


图 7 重叠进样 20 针的峰面积和峰面积 / 峰高的比值

20 针数据的峰宽 (5% 峰高) 保持良好的重复性，相对标准偏差在 1.6%~4.5% 及 0.8%~1.6% 之间，各峰对应保留时间差在 0.4%，分离度 (USP) 变化在 6.3% 以内，体现该系统在重叠进样过程中，重复性稳定性良好。

表 1 收集馏分色谱评价结果

色谱峰	保留时间差 *		峰面积		峰宽 (5% 峰高)		分离度 (USP)	
	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%	均值	RSD%
1#	4.008	0.4	1081112	1.6	0.779	0.8	2.2	5.2
2#	4.007	0.4	1309115	4.5	1.647	1.6	0.9	6.3

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

■ 结论

本实验采用超临界流体色谱制备系统结合软件自带的重叠进样功能，可高效率完成大量样品制备，降低溶剂消耗，减少分析时间，提高色谱系统各单元的使用效率，降低分析成本。同时重叠进样的稳定性经评估后，峰面积、高度、峰宽等参数均稳定可靠，可应用于生产中的高效大量样品制备。

岛津应用云

