

重叠进样和峰纯度检测功能在旋光异构化合物分离中的应用

SFC-022

摘要： 本文利用 Nexera UC Prep 超临界流体色谱系统完成对旋光异构化合物的分离制备，并介绍了重叠进样功能和峰纯度检测功能在制备过程中的应用。实际案例分析比对，使用重叠进样方式相较传统分离制备效率提升 1.9 倍，但相同制备量下时间内的溶剂消耗降低了 46%，可显著提升工作效率。对重叠进样的结果查看，9 次重叠进样过程中，各主要色谱峰对应的峰面积的 RSD 在 2% 以内，保留时间差 RSD 在 0.5% 以内，各峰峰宽和分离度变化在 5% 以内，体现出良好的系统稳定性。

关键词： Nexera UC Prep 重叠进样 超临界流体色谱

旋光异构化合物由于不同构型可能具有不同的生理学特性，在医药生产过程中，对于旋光异构化合物的分析，变得越来越重要，SFC 由于其特有的类似正相色谱的属性，以及手性色谱柱填料的快速发展，越来越多的替代现有的正相色谱法进行分离。制备型 SFC 在分析型基础上进行规模放大，相比传统制备液相色谱，制备 SFC 最终在 CO₂ 释放后，样品溶解在有机相中，有利于后期的样品的浓缩干燥，可极大提高处理效率。

超临界流体色谱(Supercritical Fluid Chromatography,

SFC) 是一种新型的色谱分离技术，流动相以超临界 CO₂ 为主要流动相，具有气体和液体的共同属性，包括分离效率高、分析速度快，压力低等特点，在药物分析、中药天然产物提取分析、食品检测等领域具有非常广阔的应用前景。

本文利用 Nexera UC Prep 超临界流体色谱制备系统，完成旋光异构化合物制备的过程，并着重对其重叠进样、纯度检测等功能进行介绍，对重叠进样的结果进行了多维度评价，验证其结果的稳定性及高效率。

■ 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® IH/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，25% 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：1000 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 拆分条件的放大

超临界流体色谱方法优化中，改性剂、色谱柱、背压、温度等因素都会影响色谱分离。其中色谱柱填料和改性剂影响较大，为获得合适的色谱分离条件，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。本文基于前期的使用 Method Scouting 分析型 SFC 手性色谱柱类型和改性剂比例的优化结果，进行制备 SFC 的放大分析，其中色谱柱选用 CHIRALPAK IB，25% 甲醇作为改性剂进行最终分离，制备色谱图如下图 2 所示。

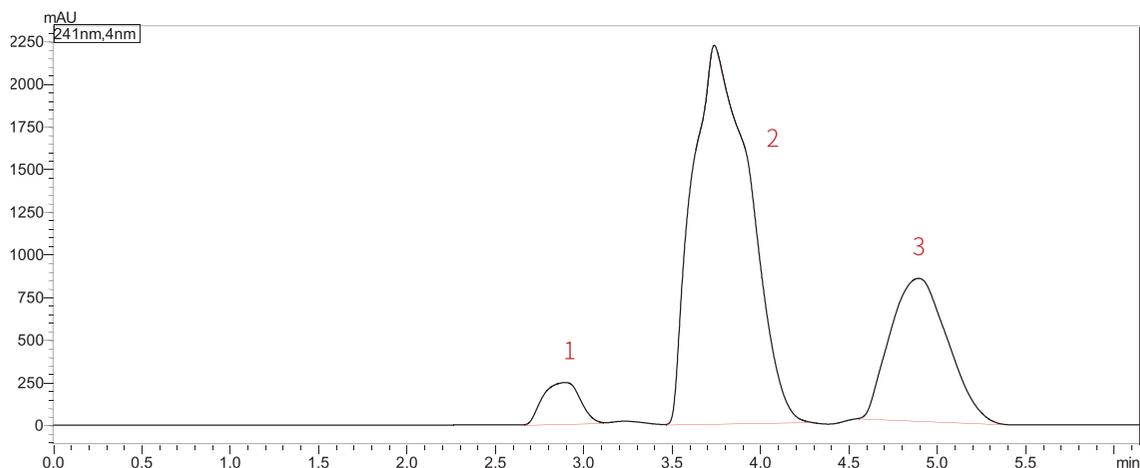


图 2 合成化合物 SFC 分析色谱图显示具有明显 3 个旋光异构体色谱峰

2.2 自动创建制备参数

LabSolutions 软件自带的基于色谱图自动创建制备参数如下图，第一步选中所需要收集的色谱峰；第二步点击应用，自动生成收集参数；第三步应用模拟收集的色谱峰情况，具体如图 3 所示。

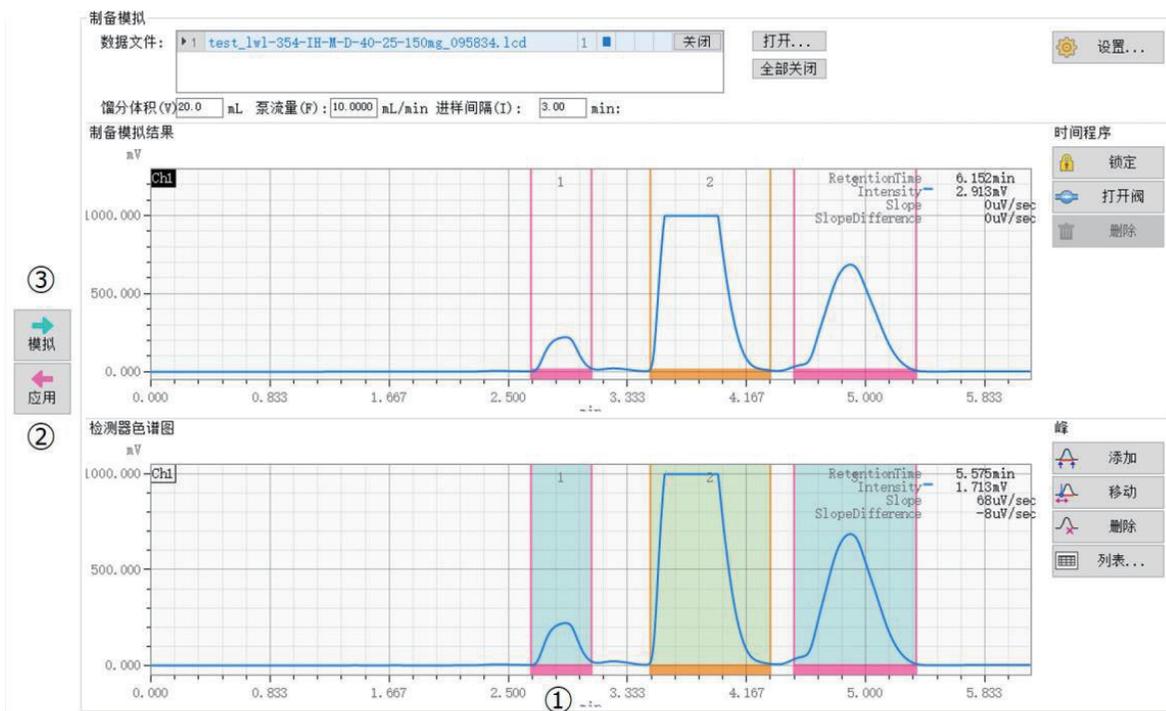


图 3 LabSolutions 制备收集参数自动创建流程

2.3 色谱峰制备收集和峰纯度检测

根据2.1结果提示, 单次进样 1000 μL , 在 6 min 内实现目标物的分离。峰 1、峰 2 与峰 3 色谱峰之间分离度良好, 分别进行收集。

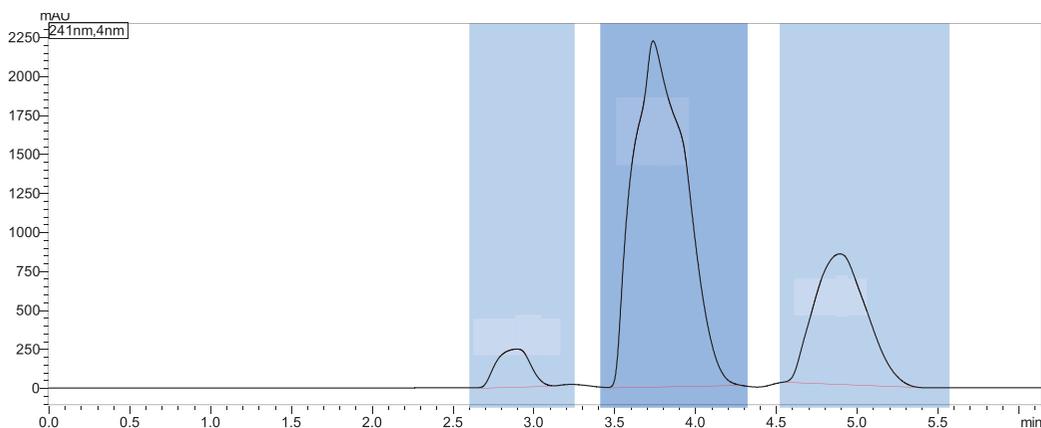


图 4 旋光异构体化合物拆分制备条件探索

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 1#、2# 和 3# 三色谱峰进行峰纯度测试, 未检测到未分离杂质。

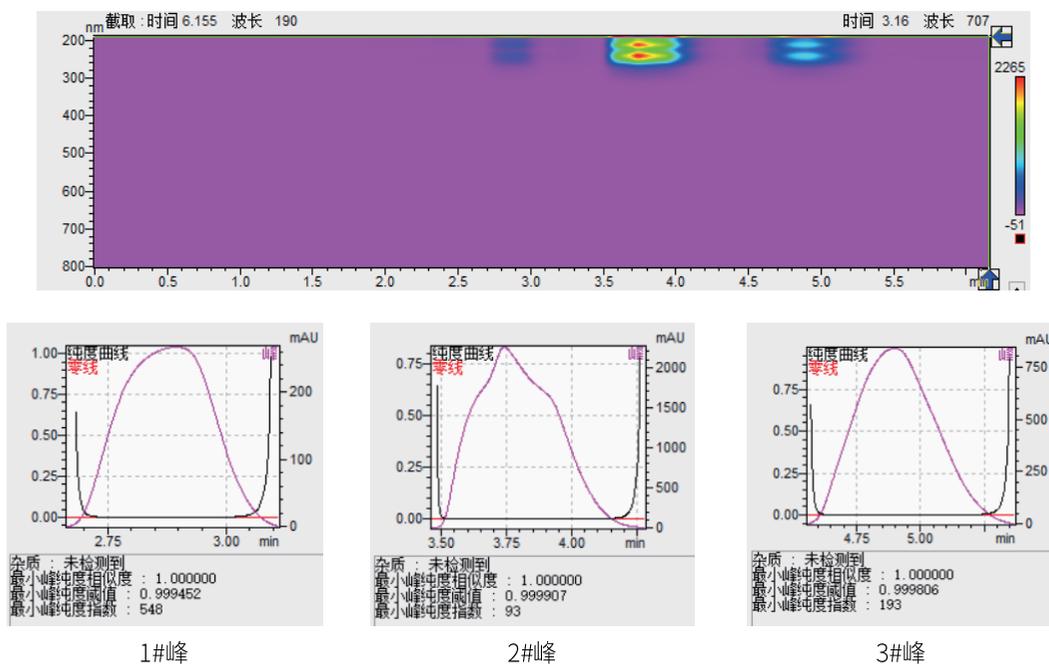


图 5 色谱峰等高线视图及 1# 和 3# 色谱峰纯度测试

2.4 重叠进样及结果评价

Labsolutions 工作站可通过简单设置, 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 9 次, 耗时 34 min, 而传统批处理连续进样方式在相同进样次数需要超过 63 min。

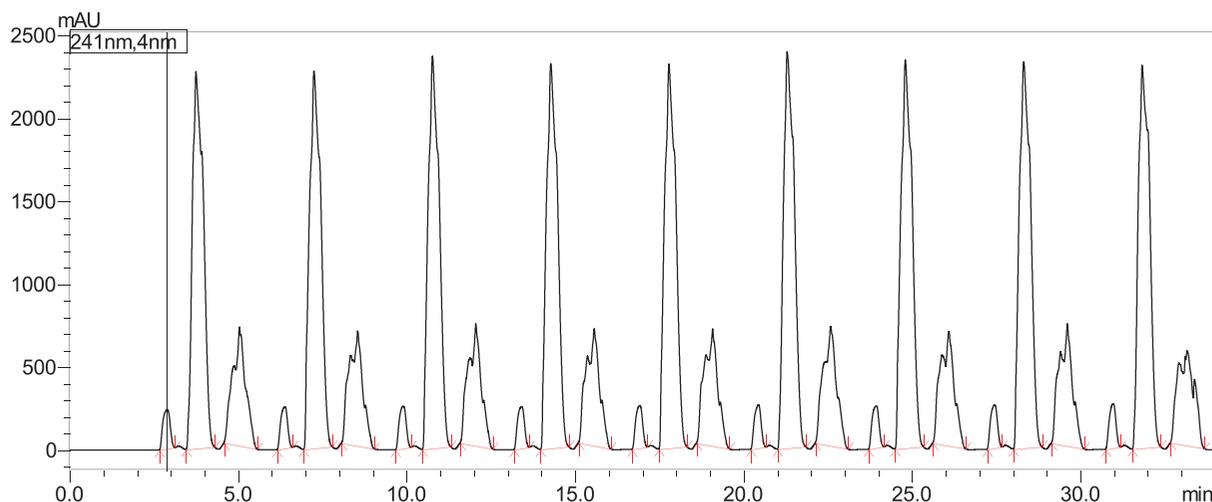


图6 重叠进样9针的色谱图

通过对重叠进样结果进行分析,对比每次分离中1#、2#和3#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9次重叠进样分离过程中,色谱峰面积及峰宽(5%峰高)保持良好的重复性,相对标准偏差在1.4%-1.6%及0.7%~2.2%之间,各峰对应保留时间差在0.2~0.5%之间,分离度(USP)变化控制在5%以内体现该系统在此样品的分离整个过程中稳定性良好。

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#	3.5097	0.3	3627794	1.4	0.381	1.1	2.4	4.9
2#	3.5103	0.2	53436392	1.6	0.666	0.7	1.8	1.9
3#	3.5153	0.5	19424127	1.4	0.853	2.2	1.9	4.7

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

2.5 工作效率提升

本实验使用了重叠进样方式,同传统单次进样方式相比,可实现色谱系统最大化的无间断连续工作,极大提升了色谱柱分离效率、检测器工作效率。下面以本实验为例,通过重叠进样的方式,将本需要63分钟的常规9针进样时间,缩短到34分钟,时间减少46%,同时溶剂消耗和能量消耗均降低46%,单位时间的样品制备量较常规单针进样方式提升了1.9倍,极大提高了制备分析的效率。

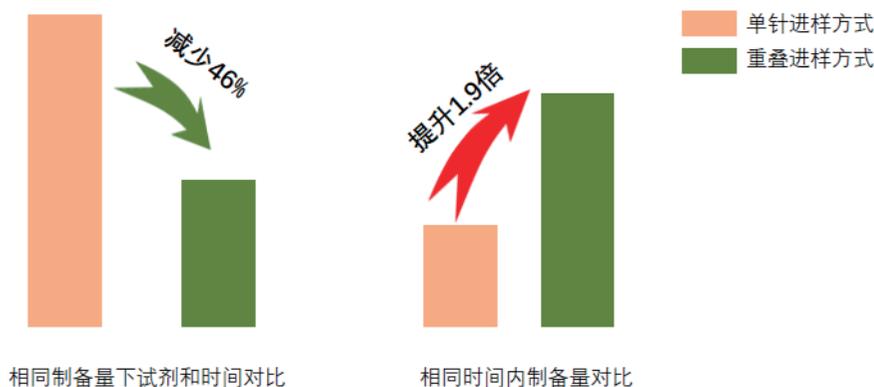


图7 单针进样方式和重叠进样方式效率比较

■ 结论

本实验采用超临界流体色谱制备系统，采用超临界 CO₂ 为流动相，利于其高扩散性，低粘度，压力释放后快速分离收集等优势，结合手性填料色谱柱对于旋光异构化合物完成色谱拆分，高效率收集；同时使用软件中的重叠进样功能，可极大降低试剂和时间消耗，提高色谱系统的工作效率。PDA 软件中的纯度分析功能，可很好的进行制备分离效能的检验，判断有无杂质干扰物质进入收集馏分，提高收集的准确性。

岛津应用云

