

超临界流体色谱法高效优化合成肽分离条件

01-00805-cn

Yusuke Masuda

特点描述

- ◆ 超临界流体色谱法 (SFC) 可应用于亲水性肽类分析。
- ◆ LabSolutions MD 可提供利用 SFC 优化分离条件的高效工作流程。
- ◆ 流动相混合功能可实现流动相的自动制备, 有助于提高效率和重现性。

■ 引言

超临界流体色谱法 (SFC) 采用扩散系数大、黏度低的超临界二氧化碳作为流动相, 相比高效液相色谱法 (HPLC) 具有分析时间更短的优势, 且在分离结构相似物质方面表现更优。SFC 最初开发用于手性化合物的分析, 但近年来其应用已扩展至非手性化合物的分离与分析。基于二氧化碳的疏水性, SFC 在疏水性化合物的分离分析中表现出色, 而通过在流动相中添加甲醇等高级性有机溶剂 (改性剂), SFC 也可用于亲水性化合物的分析。

肽类作为一种典型亲水性化合物, 通常采用反相 HPLC 进行分析, 但亦可使用 SFC 技术; 由于 SFC 的保留行为与 LC 存在差异, 有望实现 LC 无法达成的理想分离效果。

本文采用超临界流体色谱仪 Nexera UC 和分析方法开发支持软件 LabSolutions MD, 以标准肽混合物作为模拟样品, 展示了“筛选”与“优化”阶段的自动化工作流程。

■ 如何选择 SFC 色谱柱

色谱柱筛选对于优化分离条件至关重要, 因为相同的固定相在 SFC 和 HPLC 中往往表现出不同的保留行为, 且难以根据现有 HPLC 数据推测 SFC 保留特性。

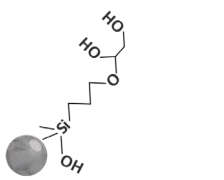

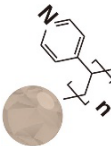
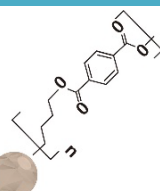
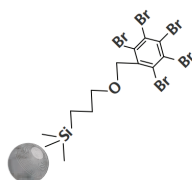
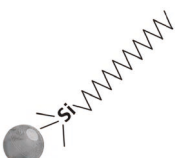
因此, 采用不同类型的固定相可有效改变分离选择性。“六柱套装”是一组具有不同分离选择性的 SFC 色谱柱 (Shim-pack™ UC 系列), 是优化分离条件第一步的最佳选择。色谱柱类型及特性如表 1 所示。

■ 色谱柱筛选

在筛选阶段, 色谱柱与改性剂 (包括酸性或碱性添加剂) 的最佳组合可能对保留行为和分离效果产生显著影响。本文中, 在色谱柱筛选阶段选定合适的分离柱后, 采用包含酸碱添加剂的改性剂筛选确定了色谱柱与改性剂的最佳组合方案。

在色谱柱筛选中, 采用具有不同保留选择性的“六柱套装” (表 1) 以及适合亲水性化合物分析的高级性有机溶剂甲醇作为改性剂进行分析。分析条件如表 2 所示。

表1 六柱套装的内容与特性

	Shim-pack UC-Diol II	Shim-pack UC-Sil II	Shim-pack UC-PolyVP
化学			
特性	<ul style="list-style-type: none"> • 正相分离 • 抑制非特异性相互作用 	<ul style="list-style-type: none"> • 对碱性化合物具有优异的保留能力, 并能识别空间结构 	<ul style="list-style-type: none"> • 流动相中无需添加酸性或碱性添加剂即可获得良好峰形
	Shim-pack UC-PolyBT	Shim-pack UC-PBr	Shim-pack UC-ODS
化学			
特性	<ul style="list-style-type: none"> • 得益于π-π相互作用, 对芳香族化合物具有优异的识别能力 	<ul style="list-style-type: none"> • 改善C18色谱柱中短保留化合物的分离效果 	<ul style="list-style-type: none"> • 反相分离 • 疏水保留

LabSolutions MD 能够根据多种条件自动生成分析批，正确整合色谱柱和改性剂等参数。此外，改性剂（图 1 中的（1））和色谱柱（图 1 中的（2））可通过流路切换阀实现自动切换。另外，改性剂的组成可通过流动相混合功能自动制备。

在分析批创建中，若预先设定了混合比例，只需选择改性剂即可自动制备含有选定改性剂成分的流动相。这能有效预防制备错误，同时大幅减少人工制备工作量。

Nexera UC 支持多达七种不同的改性剂，并可通过流动相混合功能实现其自动混合。同时可自动切换多达十二根色谱柱进行连续分析，为各种情况下的分析条件全面筛选提供支持。



图1 分析批创建界面

表2 色谱柱筛选条件

系统	: Nexera UC
色谱柱 1	: Shim-pack UC-SIL II ^{*1}
色谱柱 2	: Shim-pack UC-Diol II ^{*2}
色谱柱 3	: Shim-pack UC-PolyVP ^{*3}
色谱柱 4	: Shim-pack UC-PolyBT ^{*4}
色谱柱 5	: Shim-pack UC-PBr ^{*5}
色谱柱 6	: Shim-pack UC-ODS ^{*6}
(所有色谱柱规格均为 250 mm × 4.6 mm 内径, 5 μm)	
流动相 A	: scCO ₂
流动相 B	: 甲醇
流速	: 2.5 mL/min
时间程序	: B 相浓度 5% (0 min) → 75% (8-10 min) → 5% (10-12 min)
柱温	: 25 °C
BPR 压力	: 10 MPa
柱温	: 50 °C
进样量	: 2 μL (所有化合物浓度均为 1000 mg/L)
化合物	: (A) 洛匹那韦, (B) 利托那韦, (C) 血管紧张素 I, (D) 血管紧张素 II, (E) 胰岛素, (F) 达托霉素, (G) 棘白菌素 B0
样品溶剂	: 二甲基亚砜 (DMSO)
检测	: 220 nm (SPD-M40, 高压流通池)

*1 P/N: 227-32607-02, *2 P/N: 227-32606-02
 *3 P/N: 227-32509-12, *4 P/N: 227-32503-12
 *5 P/N: 227-32602-02, *6 P/N: 227-32608-05

■ 从筛选结果中快速搜索最佳条件

六根色谱柱的筛选结果如图 2 所示。由于筛选过程会生成与尝试条件数量相同的色谱图，因此必须评估哪些条件能实现目标分离，这既需要深厚的色谱学知识，也需要投入大量人力。LabSolutions MD 可通过以下公式 1 对各条件下的分离效果进行定量评估与排序，使任何人都能快速、轻松地搜索最佳条件，而无需依赖 HPLC 专家的直觉和经验。

$$(\text{评估值}) = P \times (Rs_1 + Rs_2 + \dots + Rs_P - 1) \quad (\text{公式 1})$$

评估值计算公式为：检测峰数 (P) 与分离度总和 (Rs) 的乘积。图 3 展示了从流动相和色谱柱筛选中获得的评估值按降序排列的结果。还可根据最小分离度、检测峰数等参数对色谱柱进行排序。

如红色框所示，使用 Shim-pack UC-PolyVP 色谱柱时获得了最佳评估值。然而，检测峰数 (6) 少于样品中的化合物数量 (7)，且部分检测峰未呈现理想的峰形。因此，我们在改性剂中添加酸或碱来改善分离效果和峰形。采用甲醇与六种添加剂 ((1) 0.1% 甲酸、(2) 20 mmol/L 甲酸铵、(3) 0.1% 乙酸、(4) 20 mmol/L 乙酸铵、(5) 0.1% 三氟乙酸及 (6) 20 mmol/L 三氟乙酸铵) 作为流动相改性剂进行了补充筛选分析。

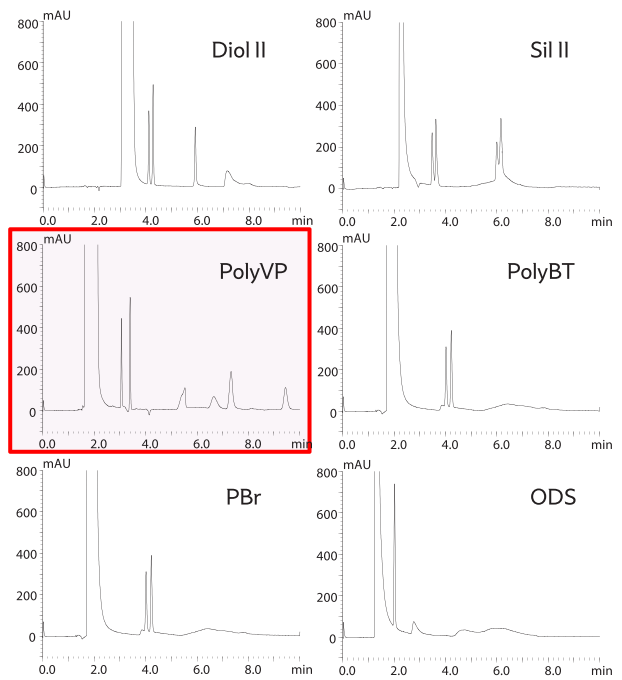


图2 色谱柱筛选获得的色谱图

色谱柱名称	响应值			
	最小分离度	峰数	分离峰数	评估值
PolyVP	2.02	6	6	120.778
Sil II	1.416	5	3	62.147
Diol II	0.835	4	0	28.97
PBr	1.647	3	2	19.942
PolyBT	2.194	2	2	4.388
ODS	0	1	0	0

图3 各条件的排序

■ 采用酸性和碱性添加剂的补充筛选分析结果

采用含有六种不同添加剂 (1) 0.1% 甲酸、(2) 20 mmol/L 甲酸铵、(3) 0.1% 乙酸、(4) 20 mmol/L 乙酸铵、(5) 0.1% 三氟乙酸、(6) 20 mmol/L 三氟乙酸铵盐) 的改性剂进行的补充筛选分析显示, 与未添加酸碱添加剂的情况相比, 分离效果或峰形均未改善 (图 4)。

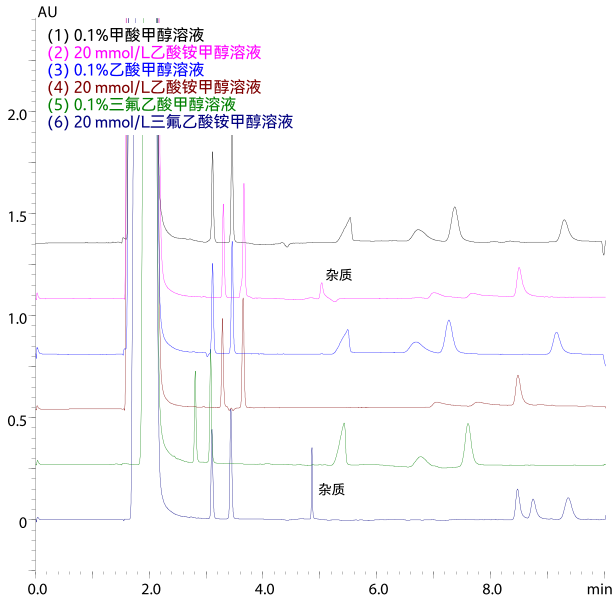


图4 通过添加剂补充筛选获得的色谱图

■ 向改性剂中添加水的影响

在亲水性化合物的 SFC 分析中, 除酸碱添加剂外, 有时还会加入水作为改性剂, 而改性剂中水含量的微小差异可能显著影响分离效果和峰形。由于 SFC 的流动相主要组分二氧化碳与水不混溶, 因此不能直接用水作为改性剂。然而, 可以将其微量添加至与水混溶的有机溶剂改性剂中。

我们确认了添加水是否能改善以下两种改性剂的分离效果和峰形。其中一种是“0.1% 乙酸甲醇溶液”, 该溶液在使用 LabSolutions MD 进行酸碱添加剂补充筛选分析的运行后数据分析中获得了最高评分。另一种是“0.1% TFA 甲醇溶液”, 该溶液在反相 HPLC 肽类分析中通常表现出良好的分离度和峰形。在 SFC 分析中, 与 HPLC 分析类似, 柱温会影响分离效果和峰形, 因此也对柱温箱温度进行了评估。

在优化阶段, 通过分别改变 0.1% 乙酸甲醇溶液与 0.1% 三氟乙酸甲醇溶液中水的添加比例 (0%、1%、2%、3%、4% 和 5%, 共 6 个水平) 以及柱温箱温度 (25°C、45°C 和 65°C, 共 3 个水平) 进行分析。

图 5 至图 8 展示了在柱温箱温度为 25°C 时, 通过改变加水比例获得的色谱图。研究发现, 无论采用 0.1% 乙酸甲醇溶液还是 0.1% 三氟乙酸甲醇溶液作为改性剂, 血管紧张素 I 和血管紧张素 II 的分离度均随添加水量的增加而提高。

由于 Nexera UC 可通过流动相混合功能自动制备流动相, 因此即使在加水比例微小差异会影响分离的条件下, 也能实现出色的分析重复性。

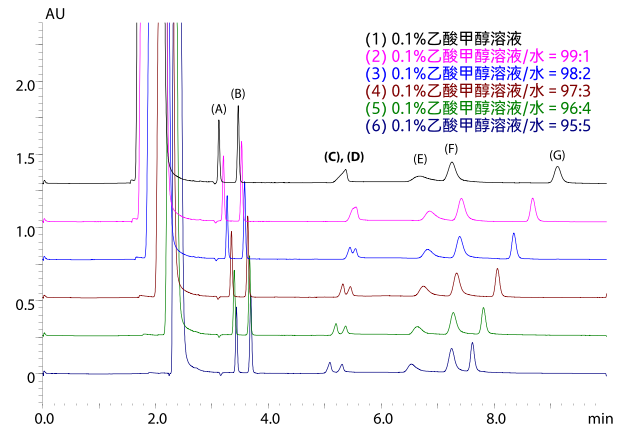


图5 不同加水比例下获得的色谱图 改性剂: 0.1%乙酸甲醇溶液

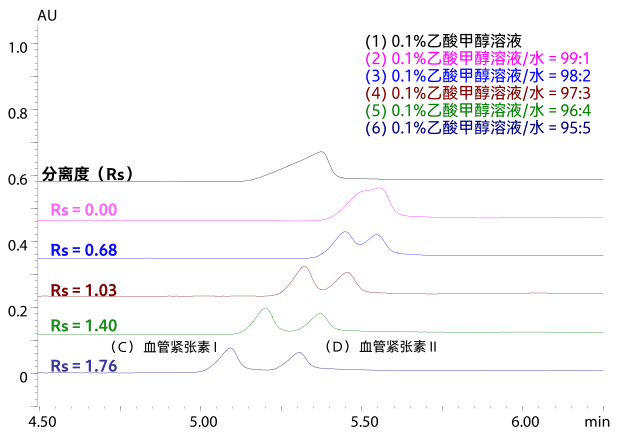


图6 图5的放大色谱图, 重点展示 (C) 血管紧张素I和 (D) 血管紧张素II的分离情况及对应分离度

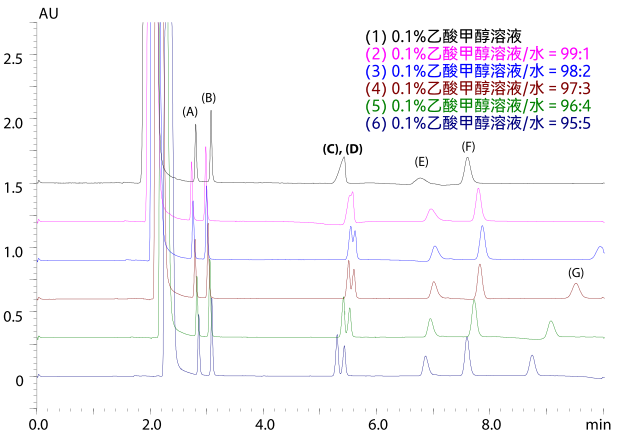


图7 不同加水比例下获得的色谱图 改性剂: 0.1%三氟乙酸甲醇溶液

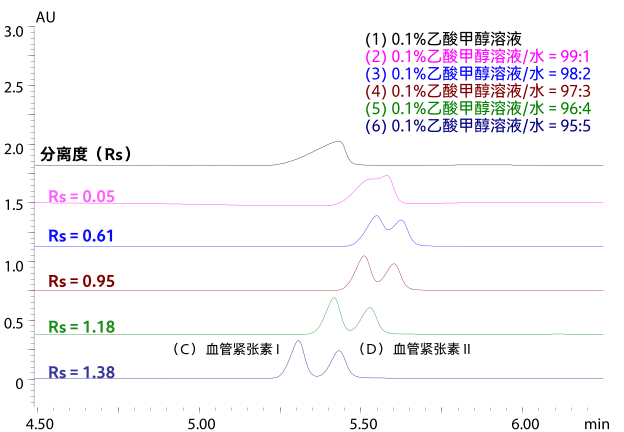


图8 图7的放大色谱图, 重点展示 (C) 血管紧张素I和 (D) 血管紧张素II的分离情况及对应分离度

■ 通过设计空间对分离度和峰形进行目视评估

LabSolutions MD 可将分析参数变化对分离效果的影响可显示为设计空间。图 9 展示了以 0.1% 乙酸甲醇溶液作为改性剂时，血管紧张素 I 与血管紧张素 II 分离度的设计空间，其中纵轴代表水与改性剂的比例，横轴代表柱温箱温度。设计空间图显示，改性剂中水的添加比例越高、柱温箱温度越高，分离效果越好。

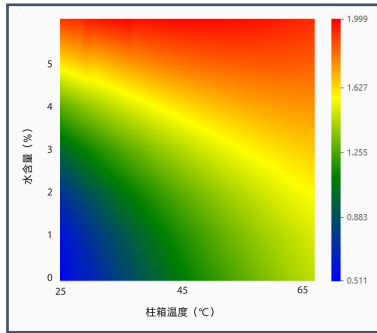


图9 (C) 血管紧张素I和 (D) 血管紧张素II的分离度设计空间

叠加多个设计空间还能高效搜索满足多重标准的最佳条件。例如，为寻找目标峰峰形良好且分离度高的条件，将最小分离度定义为 1.2 或更高，各峰 10% 高度处的允许拖尾因子区间为 0.8 至 1.8，通过叠加设计空间搜索符合这些标准的区域（图 10）。图中彩色区域无法同时满足两项标准，其余区域（绿色斜线阴影部分）为符合标准的区域。

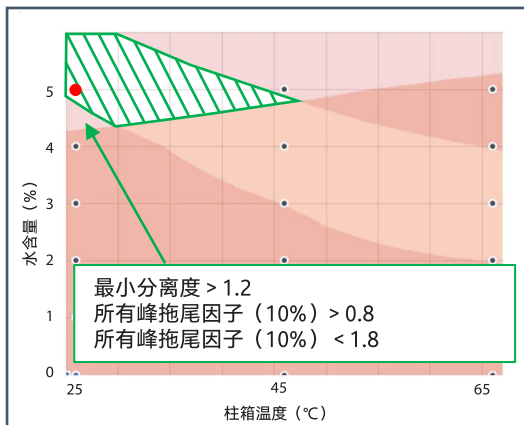
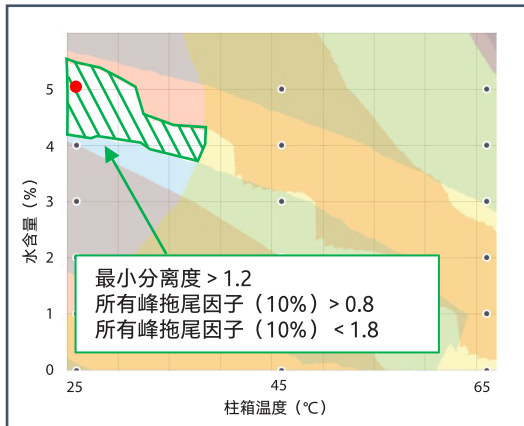


图10 使用叠加设计空间搜索优化条件 (1)
上：0.1%乙酸甲醇溶液 下：0.1%三氟乙酸甲醇溶液

当加水比例为 5%、柱温箱温度为 25 °C 时（图 10 中红色圆圈所示），使用 0.1% 乙酸甲醇溶液和 0.1% TFA 甲醇溶液作为改性剂均获得了最佳结果。

此外，使用叠加设计空间图 11 搜索符合以下标准的区域。

- 最小分离度为 1.2 或更高。
- 各峰 10% 高度处允许的拖尾因子区间为 0.8 至 1.2（比先前搜索更为严格）。

当使用 0.1% 乙酸甲醇溶液时，没有区域符合标准。另一方面，当使用 0.1% TFA 甲醇溶液时，加水比例为 5%、柱温箱温度为 25 °C（图 11 中红色圆圈所示）的条件同时满足两项标准，可获得更佳的峰形。在这些最佳条件下获得的色谱图如图 12 所示。

如图所示，LabSolutions MD 通过叠加设计空间，可轻松地搜索满足多个峰所需标准的条件。

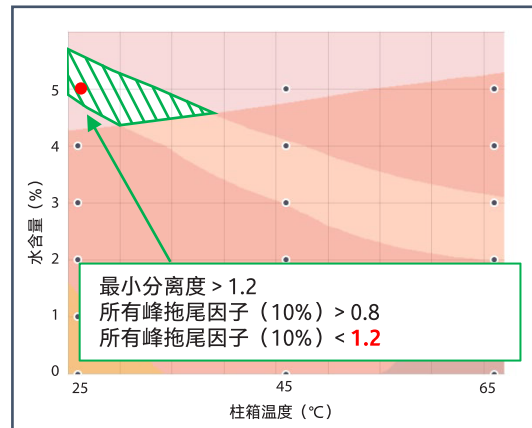
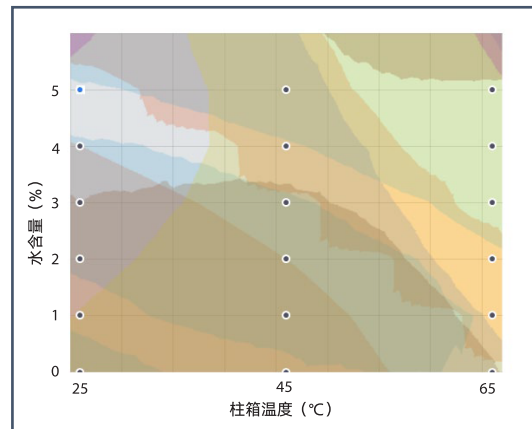


图11 使用叠加设计空间搜索优化条件 (2)
上：0.1%乙酸甲醇溶液 下：0.1%三氟乙酸甲醇溶液

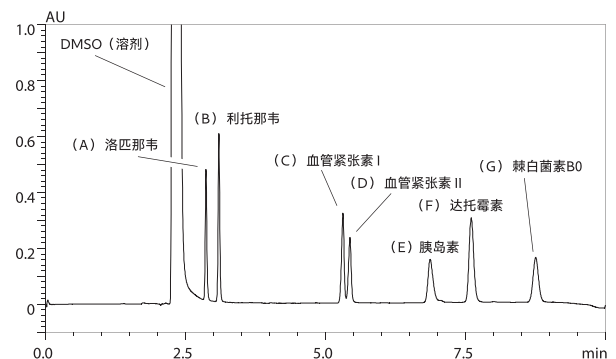


图12 采用0.1% TFA甲醇溶液的优化色谱图
加水比例：5% 柱温箱温度：25 °C

■ 结论

通过合理选择色谱柱、改性剂和添加剂，超临界流体色谱（SFC）可应用于肽类等亲水性化合物的分析。在肽类混合物分析中，向改性剂中添加水可显著改善分离效果与峰形。另一方面，由于需要创建大量分析批并进行海量运行后数据处理，寻找最佳分离条件，涉及对色谱柱、改性剂和添加剂的综合分析，这一过程极为耗时。由于 LabSolutions MD 支持自动创建分析批和流动相制备，并且在分析方面，能够对色谱分离效果进行排序，并利用设计空间高效搜索最佳条件，这简化了 SFC 方法开发的工作流程。

岛津应用云



LabSolutions、Nexera 和 Shim-pack 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2025 年 2 月

> 请填写调查问卷

相关产品 某些产品可能更新为更新的型号。



> Nexera UC

超临界流体萃取/超临界流体...



> 方法开发系统

梯度条件自动优化与...

相关解决方案

> 制药与生物制药

> 价格咨询

> 产品咨询

> 技术服务/支持咨询

> 其他咨询