

# Agilent 1260 Infinity 分析型超临界流体色谱系统的色谱柱和流动相选择策略

## 应用简报

药物开发

### 作者

Martin Vollmer, Herbert Godel,  
Udo Huber  
安捷伦科技公司  
德国瓦尔德布隆



### 摘要

固定相和流动相筛选是分析型超临界流体色谱 (SFC) 方法开发的一个重要方面。本文将介绍使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统色谱柱筛选套件自动筛选色谱柱和改性剂。通过筛选六种固定相和两种改性剂来确定最佳组合。对于所选的样品，使用 Agilent ZORBAX Rx-SIL 色谱柱并以甲醇作为改性剂得到了最佳的分析结果，所有化合物均实现基线分离。



Agilent Technologies

## 前言

超临界流体色谱 (SFC) 是用于手性化合物分离的理想分析技术，在非手性分析物方面，尤其是在药物发现和开发领域，也日益受到关注。由于有机溶剂成本的提高和最小有毒废物排放量的环保意识的增强，SFC 也被考虑作为正相或反相色谱的绿色替代技术，用于小到中等分子量分子的分析。此外，SFC 是一种与 HPLC 互补的分离技术，可用于对复杂样品和杂质进行高通量和高分离度的分析。SFC 的典型分析时间和色谱柱再平衡时间通常只是标准 HPLC 的三分之一到五分之一。由于目前手性或非手性 SFC 的应用尚未设有标准相，故通常采用在实际的分离之前测试四到六种固定相的柱筛选策略，这有助于确定最佳的分离条件。相比反相色谱，SFC 可以在更宽的范围进行更为出色的选择性微调。

可通过下列参数轻松对 SFC 的选择性进行改变、优化和开发以满足分析需求：

- 固定相
- 改性剂类型
- 改性剂浓度
- 柱温

本文展示了一种快速、简便的自动化方法，利用 Agilent 1260 Infinity SFC 系统有序地确定最适合用于非手性化合物组成的混合物进行等度分离的固定相和流动相。本系统配备了 SFC 色谱柱筛选套件，可进行有序的色谱柱筛选。利用该套件中的 8 位/9 通阀可在两个柱温箱内安装多达 6 根色谱柱（最大色谱柱长度为 250 mm）。此外，使用内置于 SFC 二元泵的溶剂选择升级组件或外部溶剂选择阀，能够进行流动相之间的自动切换。

## 实验部分

### 仪器

使用 Agilent 1260 Infinity 分析型 SFC 系统 (G4309A)，其包括：

- Agilent 1260 Infinity 标准型脱气机
- Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵
- Agilent 1260 Infinity SFC 标准自动进样器
- 带有高压 SFC 流通池的 Agilent 1260 Infinity VL 型二极管阵列检测器
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- SFC Fusion A5 模块

此外，还使用安捷伦 SFC 色谱柱筛选套件 (G4307A)，其中包括：

- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C) 的阀驱动
- 8 位/9 通阀头
- 歧管和所需的毛细管

可选

- 置于 Agilent 1260 Infinity SFC 二元泵的溶剂选择升级组件或 Agilent 1260 Infinity 12 位/13 通溶剂选择阀

### 色谱柱

使用安捷伦和其他供应商的下列色谱柱进行色谱柱筛选 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)：

- 色谱柱 1 Agilent ZORBAX Rx-SIL
- 色谱柱 2 Agilent ZORBAX CN
- 色谱柱 3 吡啶柱
- 色谱柱 4 氰基柱
- 色谱柱 5 二醇柱
- 色谱柱 6 硅胶柱

### 化学品

以甲醇为溶剂制备浓度约为 500 μg/mL 的咖啡因 (Caf)、可可碱 (Thb) 茶碱 (Thp) 和尿嘧啶 (Ura) 溶液。

## 结果和讨论

### 色谱柱筛选策略

使用固定的初始色谱条件、改性剂浓度和色谱柱温度进行色谱柱筛选。使用等度洗脱法设置了由甲醇和异丙醇筛选固定相的顺序。具体方法见表 1。

以异丙醇和甲醇作为共溶剂的色谱柱筛选结果见图 1 和图 2。

使用 20% 的异丙醇作为流动相中的改性剂并且对任何一种固定相均采用等度模式，结果发现测试混标不能实现基线分离。

参数	条件
色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)	色谱柱 1 Agilent ZORBAX Rx-SIL 色谱柱 2 Agilent ZORBAX CN 色谱柱 3 吡啶柱 色谱柱 4 氰基柱 色谱柱 5 二醇柱 色谱柱 6 硅胶柱
超临界流体	CO <sub>2</sub> (饮料级)
改性剂	20% 甲醇或异丙醇
分离模式	等度
出口压力	130 bar
流速	3.0 mL/min
色谱柱进样口温度	40 °C
色谱柱出口温度	37.5 °C
进样体积	5 μL
检测器	254/BW nm, 参比波长 WL/BW nm

表 1  
色谱柱筛选条件

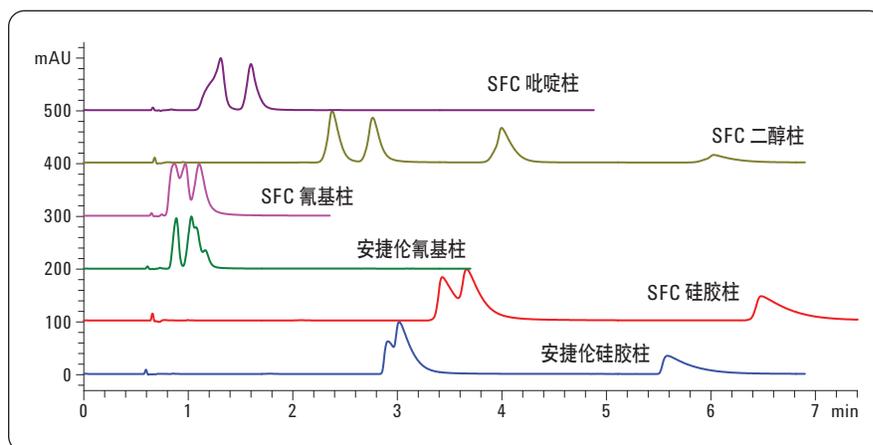


图 1  
使用异丙醇作为改性剂的色谱柱筛选结果

相反，在相似的分离条件下，使用甲醇替代异丙醇将使所有固定相的分离效果获得显著改善。不过，只有在 Agilent ZORBAX Rx-SIL 固定相上才能使所有四种分析物实现基线分离（图 2）。所有组分在 3 分钟内便实现基线分离。结果列于表 2 中。

为了进一步优化，例如提高分离度或峰容量，下一步是测试不同的改性剂浓度或筛选不同的色谱柱温度。

## 结论

本文展示了作为 Agilent Infinity 1260 分析型 SFC 系统典型方法开发流程的一部分的色谱柱和改性剂筛选。系统配置了 SFC 色谱柱筛选套件后，能更灵活、更高效地为分析型 SFC 和制备型 SFC 方法开发自动选择最适合的固定相。筛选实验、色谱柱老化、色谱柱冲洗和平衡方法可轻松整合到 ChemStation 序列中，实现无人值守的自动化工作流程。本研究使用的 SFC 系统展现出高度的稳定性且无需任何人工干预，是一种极具吸引力的，与 HPLC 正交的替代分离方法。

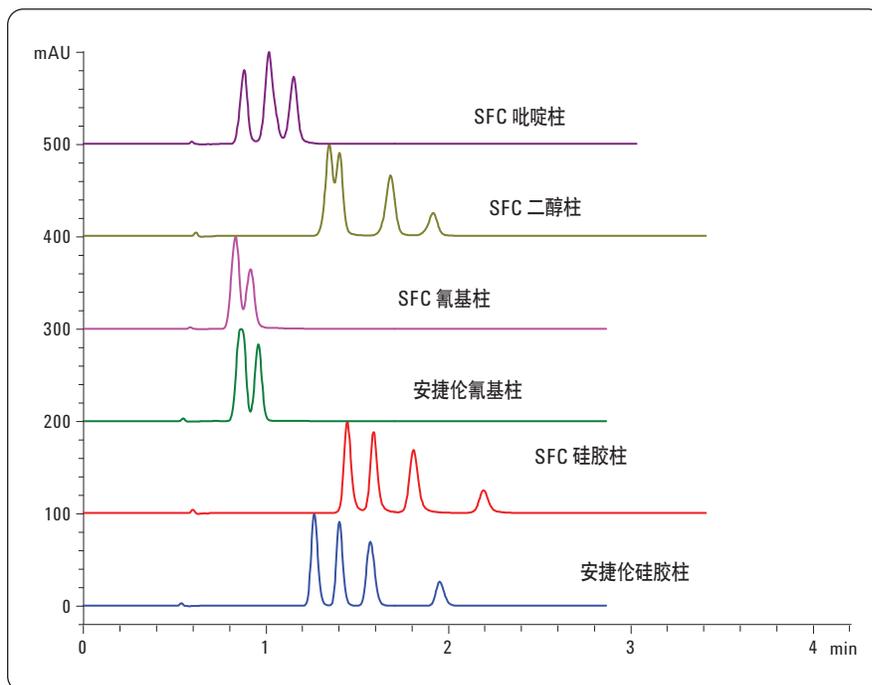


图 2  
使用甲醇作为改性剂的色谱柱筛选实验结果

化合物	保留时间 (min)	5 $\sigma$ 峰宽 (min)	分离度
咖啡因	1.26	0.04	N/A
可可碱	1.4	0.04	2.1
茶碱	1.57	0.05	2.3
尼古丁	1.95	0.05	4.5

表 2  
安捷伦硅胶柱分析结果汇总

[www.agilent.com/chem/1200sfc](http://www.agilent.com/chem/1200sfc)

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011  
2011 年 7 月 12 日出版  
出版号 5990-7147CHCN