



在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统上进行手性多色谱柱方法开发

应用简报

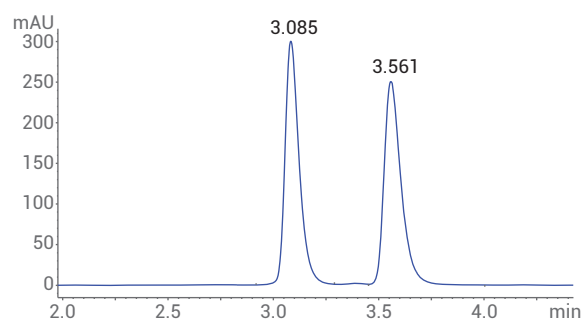
小分子药物

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了 Agilent ChemStation 方法筛选向导在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统上开发手性分离方法方面的应用。该 SFC 系统配备四色谱柱选择阀和四根不同的手性柱，用于不同等度分离条件下的筛选运行。



Agilent Technologies

前言

现代化 SFC 仪器的主要应用领域之一是分离对映异构体。在 SFC 仪器上，手性分离通常比正相 HPLC 上的经典分离过程快 10–20 倍。此外，用于 SFC 分离的溶剂危害较小，并且废液处理的成本低于正相溶剂。

本应用简报介绍了用于手性药物化合物对映异构体分离的软件辅助的方法开发。为此，使用四根手性柱，并在不同的等度溶剂组成条件下进行筛选。利用 Agilent ChemStation 方法筛选向导自动创建必要的方法以及所有冲洗和平衡步骤。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

此外，运行 SFC 系统进行自动化方法开发需要使用以下部件：

- Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀（部件号 5067-4287）

- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀 (G4235A)
- 利用四色谱柱选择阀进行方法开发的毛细管工具包（部件号 5067-6596）

仪器设置

Agilent SFC 二元泵配有 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通阀，支持在 Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版软件的“仪器配置”对话框中选择最多 12 种不同的溶剂。这些溶剂在“泵设置”对话框中进行定义。对于“结果与讨论”部分所述的实验，仅使用其中一种溶剂。

Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀，并且色谱柱在 OpenLAB CDS ChemStation 版软件的“仪器配置”对话框中进行设置。借助方法开发毛细管工具包，可使用最多四根色谱柱。在“色谱柱表”中输入色谱柱，并在 MCT 对话框中进行分配。所有色谱柱

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇 + 0.1% 二乙胺
SFC 流速	2.0 mL/min
等度洗脱	15%、20%、25% 和 30% 改性剂
停止时间	12 分钟
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	140 bar
柱温	30 °C
进样量	5 µL
注入溶剂	甲醇；注入速度 400 µL/min；灌注体积 4 µL
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
二极管阵列检测器	230 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm；数据采集速率 10 Hz

均可与 ID 标签（部件号 5067-5917）配套使用，以便在 ChemStation 中自动识别并在 MCT 对话框中进行分配。

使用方法筛选向导创建色谱柱和梯度筛选以及仪器冲洗和色谱柱平衡所需的所有方法（图 1）。

色谱柱

- Chiral Technologies, Chiralpak IA, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IB, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak IC, 4.6 × 250 mm, 5 µm
- Chiral Technologies, Chiralpak ID, 4.6 × 250 mm, 5 µm

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，版本 C.01.07 SR3，包括 LC 和 CE 驱动程序 A.02.16 以及 Agilent ChemStation 方法筛选向导 A.02.07 版。

样品

心得安，1 mg/mL 的甲醇溶液。

方法筛选向导设置

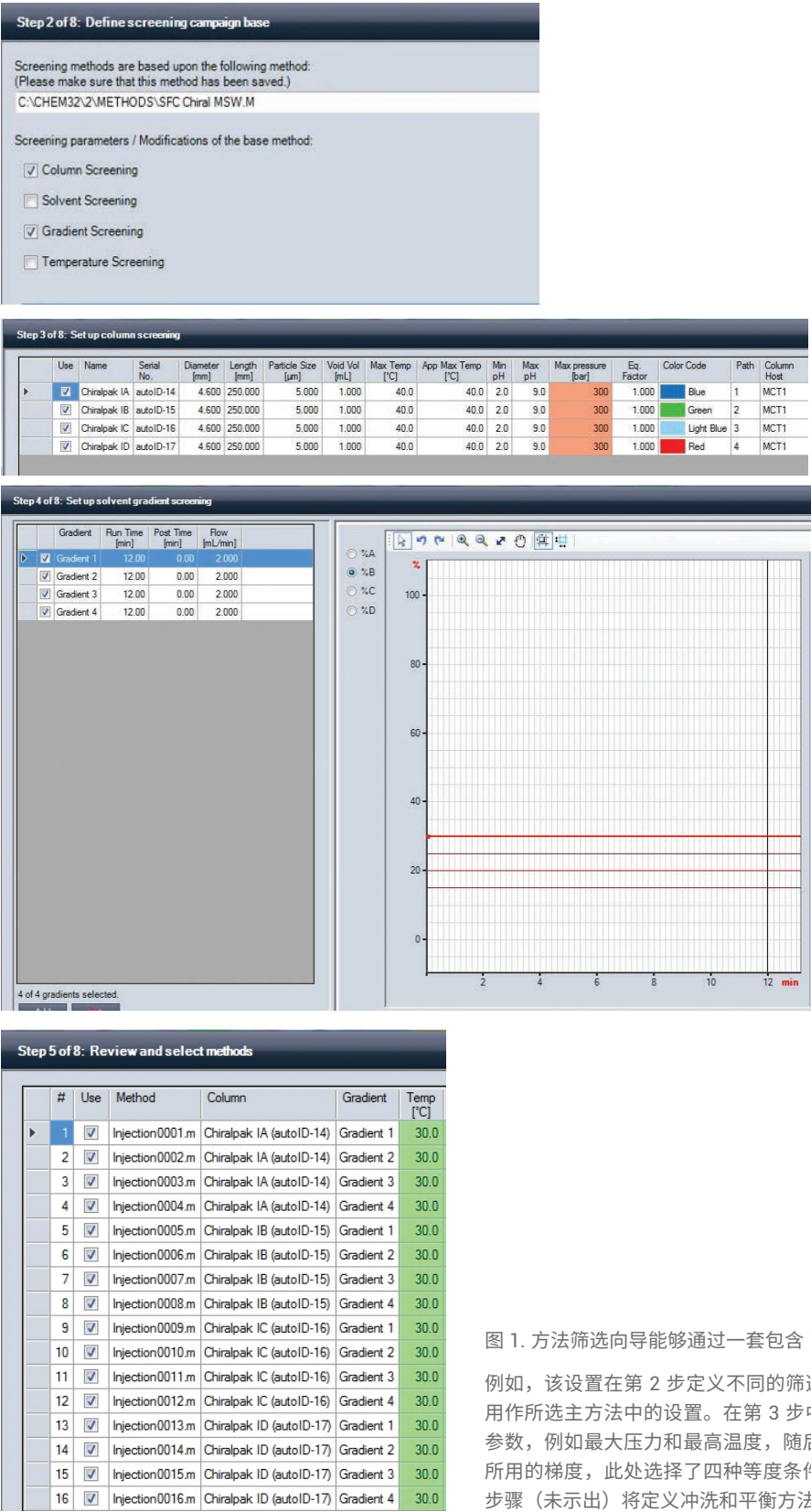


图 1. 方法筛选向导能够通过一套包含 10 步的程序设置所述的手性筛选方案

例如，该设置在第 2 步定义不同的筛选选项，此处为色谱柱和梯度筛选。所有其他参数将用作所选主方法中的设置。在第 3 步中，将选择色谱柱进行色谱柱筛选。此处将定义一些参数，例如最大压力和最高温度，随后与最终方法进行比较以消除不兼容性。第 4 步定义所用的梯度，此处选择了四种等度条件。第 5 步中能够对将要创建的方法进行审查。其他步骤（未示出）将定义冲洗和平衡方法以及样品位置

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。化学品均购自德国 Sigma-Aldrich 公司。

结果与讨论

在本文所述的手性筛选方案中,利用四根不同的手性柱,并以强洗脱溶剂甲醇作为改性剂。该方案的目标是鉴别出一种快速分析方法,能够在最长 6 分钟的分析时间内使心得安对映异构体获得良好的基线分离。因此,使用包含 15%、20%、25% 和 30% 甲醇的等度溶剂组成。在手性柱 IA 上,可以看出采用 30% 甲醇时,两种对映异构体就已经开始分离,其保留时间分别为 3.25 分钟和 3.41 分钟。然而,直至甲醇含量降至 15% 时才接近基线分离,两者的保留时间分别为 7.68 分钟和 8.36 分钟。遗憾的是,所得到的峰形不佳,峰高降低,且绝对分析时间相对较长(图 2)。

筛选结果表明,采用手性柱 IB 实现了良好的分离(图 3)。在甲醇含量为 30% 时,对映异构体得到良好的基线分离,其保留时间分别为 4.49 分钟和 5.44 分钟。随着甲醇改性剂含量降低,两个峰的保留时间和距离增加,但是峰形仍然比较理想。

采用手性柱 IC 并以甲醇作为改性剂时,无法分离心得安对映异构体(图 4)。

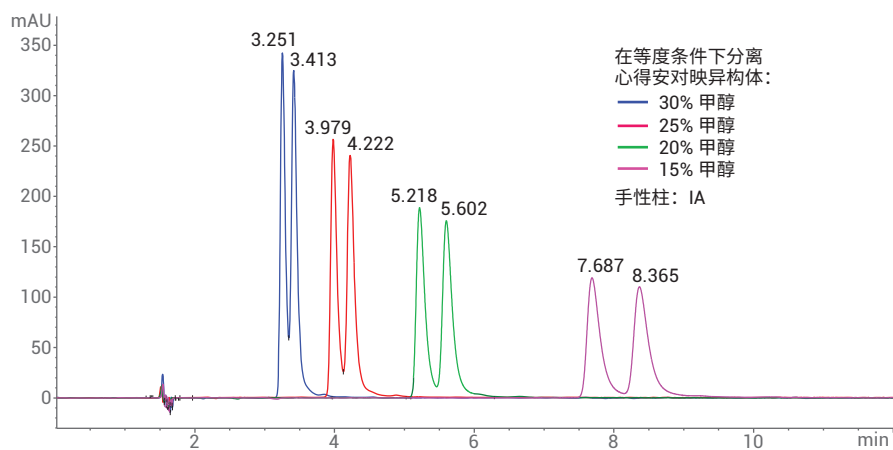


图 2. 采用甲醇作为改性剂时,心得安对映异构体在手性柱 IA 上的分离

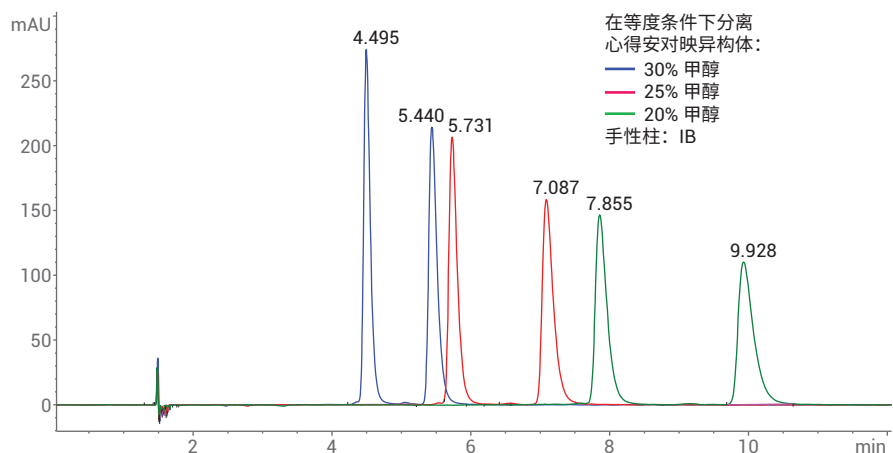


图 3. 采用甲醇作为改性剂时,心得安对映异构体在手性柱 IB 上的分离

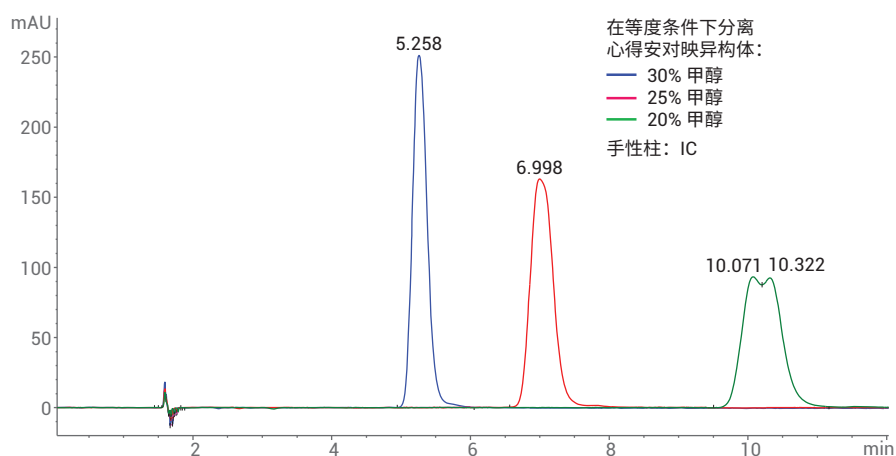


图 4. 采用甲醇作为改性剂时,心得安对映异构体在手性柱 IC 上的分离

在手性柱 ID 上, 当甲醇含量为 30% 时, 心得安对映异构体在 3.0 分钟时开始分离, 并且在甲醇含量为 25% 时在半峰高处存在一个峰谷 (图 5)。在此色谱柱上无法实现真正的基线分离。

为进行进一步优化, 选用手性柱 IB, 因为即使在高甲醇含量下, 该色谱柱所得到的色谱峰之间也有较大的间距, 便于加快分离速度。当流速从 2.0 mL/min 提高至 2.5 mL/min 并且柱温从 30 °C 升至 40 °C 时, 保留时间的范围从 4.0–6.0 分钟漂移至 3.0–3.7 分钟 (图 6)。这使得最终分析时间缩短至 4 分钟, 并且计算得出的保留时间 RSD 值分别为 0.11% 和 0.13%。

获得了良好分离的对映异构体还便于在分析型系统上轻松将其纯化, 并将光学纯形式的对映异构体收集到单个烧瓶中。为优化分离过程以获得最高产率, 使用高浓度溶液或大体积进样。在本例中, 使用 SFC Multisampler 能够实现 80 μ L 的大体积进样¹。本实验的目的是找出一种能够以高浓度使色谱柱过载, 但是仍然能够实现充分分离以收集馏分的方法 (图 7)。所鉴别出的方法使用等度溶剂组成并以 25% 甲醇作为改性剂, 在严重过载的色谱柱上使对映异构体在 5.9 分钟和 6.8 分钟处发生基线分离, 从而实现最佳的馏分收集。

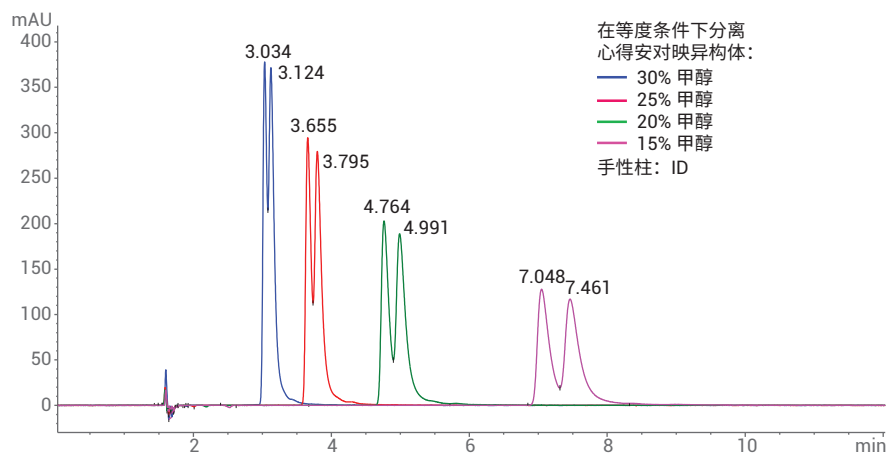


图 5. 采用甲醇作为改性剂时, 心得安对映异构体在手性柱 ID 上的分离

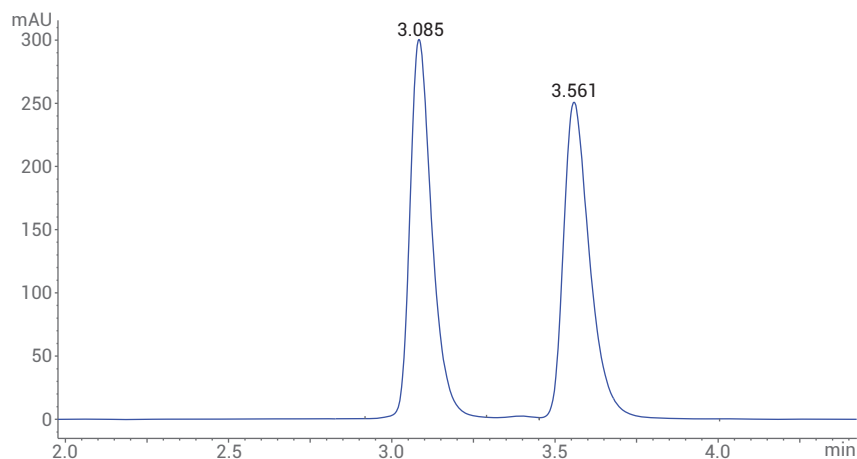


图 6. 最终速度经优化的心得安对映异构体分析分离方法 (流速: 2.5 mL/min, 温度: 40 °C, 有机溶剂: 30% 甲醇)

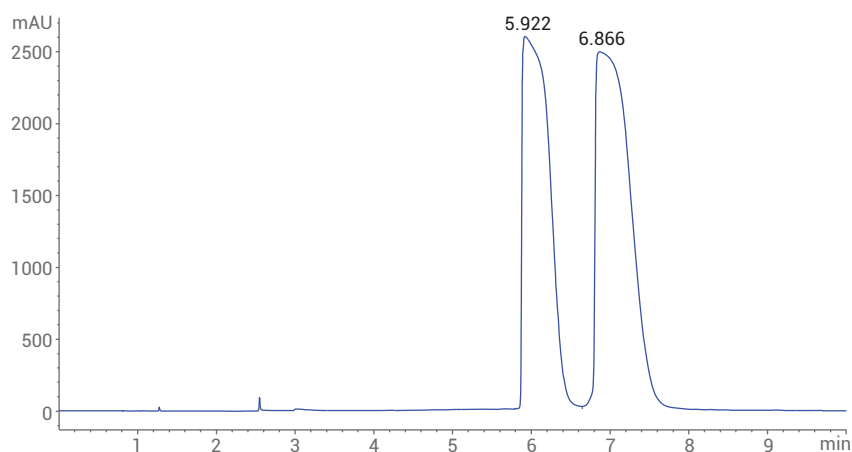


图 7. 用于心得安对映异构体的分析型制备分离的色谱柱过载实验。进样量为 80 μ L, 并且在采用 25% 甲醇时在等度条件下实现了基线分离 (注入速度: 100 μ L/min, 梯度: 0 分钟时 5% B, 1.0 分钟时 5% B, 1.1 分钟时 25% B, 停止时间: 10 分钟)

结论

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统与安捷伦方法筛选向导进行软件辅助的方法开发。在不同等度条件下对四根手性柱进行了自动筛选，快速鉴别出了最佳分离条件。对鉴别出的条件进行快速优化后，能够在 4 分钟内实现两种对映异构体的分离。这一分离速度通常比利用正相色谱分离对映异构体的经典方法快 10 倍。最后，结果表明所鉴别出的方法还可用于对映异构体的分析型制备分离。

参考文献

1. Naegele, E. 在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱，*安捷伦科技公司技术概述*，出版号 5991-7623ZHCN，2017

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 10 月 15 日，中国出版
5991-7624ZHCN



Agilent Technologies