

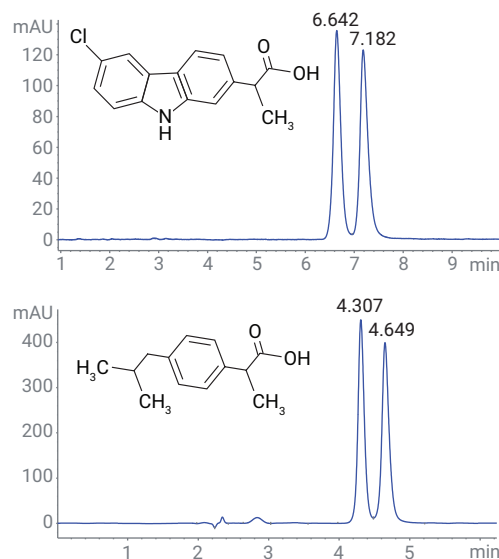
采用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统进行 SFC 和 UHPLC 手性筛选

作者

Edgar Naegele
安捷伦科技公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报展示了使用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统借助安捷伦方法筛选向导软件在 SFC 和 UHPLC 模式下实现快速方法开发。作为示例，在 SFC 和 UHPLC 模式下使用具有相同手性固定相的色谱柱筛选了一系列外消旋药物混合物，并对分离结果进行了比较。



前言

先进的 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统能够在 SFC 或 UHPLC 模式下稳定可靠地运行，且具有与独立 SFC 和 UHPLC 系统相同的性能水平。这使得分析人员能够在一个样品序列内，在 SFC 和 UHPLC 模式之间进行切换¹。通常，在分析分离方法的开发过程中，使用独立的 SFC 和 UHPLC 仪器进行软件辅助方法筛选²。先进的 SFC/UHPLC 混合型系统兼容这两种模式，可以出色完成这一任务。这为分析方法开发过程中采集初始筛选数据提供了一种经济的方法。

本应用简报展示了使用 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在 SFC 和 UHPLC 模式下借助软件辅助方法筛选进行的分析方法开发。作为示例，介绍了使用手性色谱柱和溶剂的若干组合对不同手性化合物的快速筛选（图 1），并讨论了随后的方法优化。

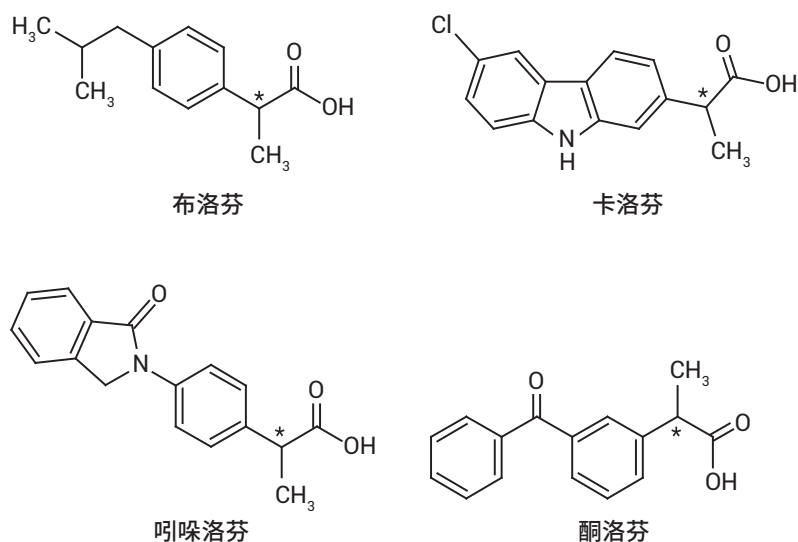


图 1. 本研究中使用的手性化合物（星号表示手性中心）

实验部分

仪器

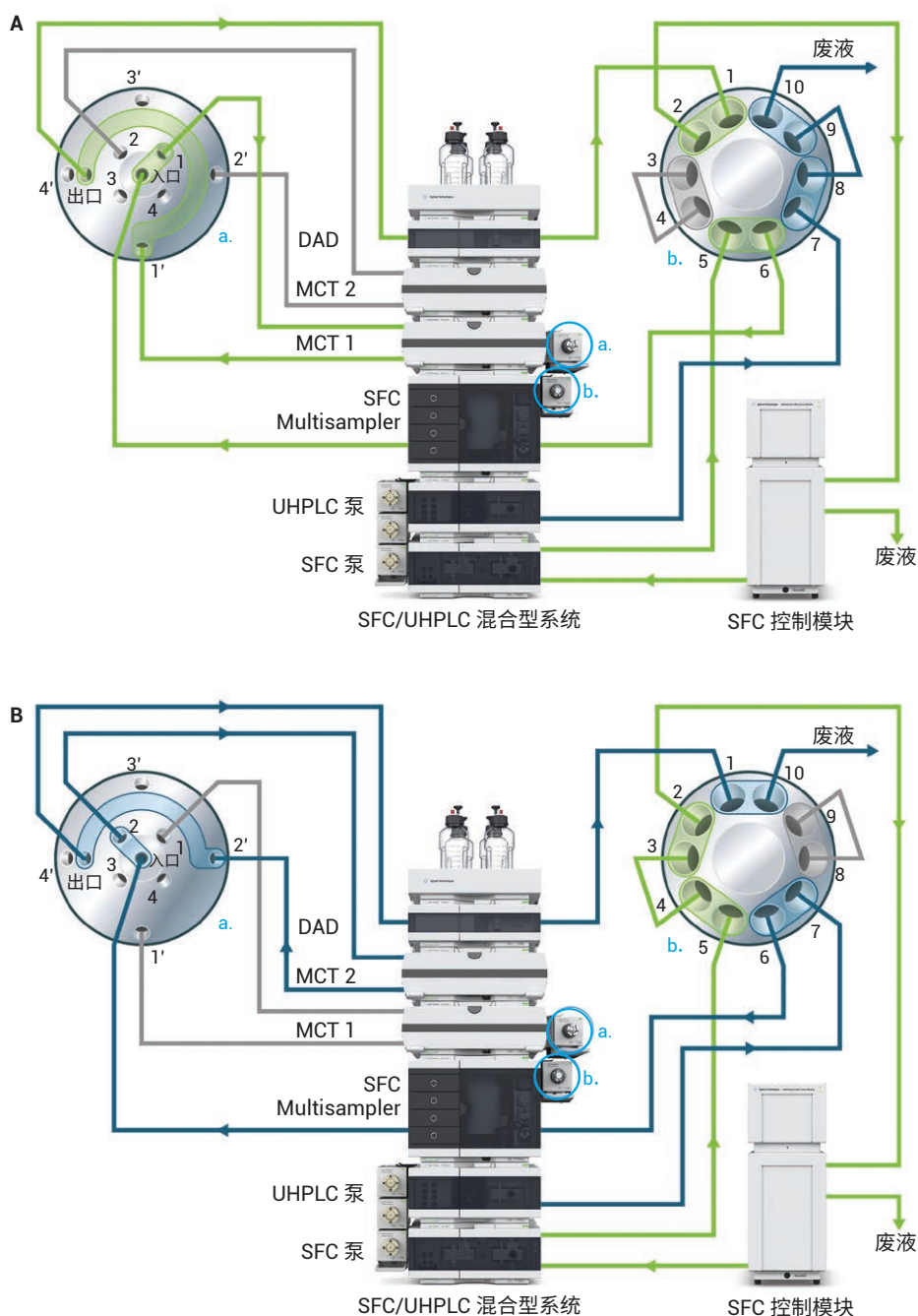
Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统包括：

- 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 (G4301-60100)
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (MCT) (G7116B)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 8 位/18 通阀 (G4239C)
- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B) 或 Agilent 1260 Infinity II 二元泵 (G7112B；下文将其称作“UHPLC 泵”)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 2 位/10 通阀 (G4232C)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通 4 色谱柱选择阀阀头 (G4237A)
- 三个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀阀头 (G4235A)

为了将 1260 Infinity II SFC 系统转化为 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统，增加了四元或二元 UHPLC 泵。该泵通过 InfinityLab Quick Change 快速更换 2 位/10 通阀连接，支持在 SFC 和 UHPLC 模式之间直接切换（图 2）。另外，所述系统配备两个 MCT。它们通过 InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通 4 色谱柱选择阀连接至系统，以便在两个 MCT 之间进行切换（其中一个位置用于旁路连接）。一个 MCT 用于 SFC 色谱柱，另一个用于 UHPLC 色谱柱。每个 MCT 包含一个 InfinityLab Quick Change 快速更换 8 位/18 通 8 色谱柱选择阀阀头（在图 2 中未示出）。

为选择溶剂，SFC 泵在通道 B 中配有 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀。UHPLC 泵也在通道 A 和 B 中与两个 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀阀头连接。

图 2 所概述的中心特征是 InfinityLab Quick Change 快速更换 2 位/10 通阀处的管路和 InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通阀处的管路。图 2A 所示的阀位置将 SFC 二元泵和 SFC 控制模块连接到仪器的共享模块。InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通阀的位置连接至 MCT 1，其中容纳 SFC 色谱柱。在流过自动进样器、容纳 SFC 色谱柱的 MCT 以及检测器后，CO₂ 流重新连接至用于反压调节的 SFC 控制模块。在该位置处，UHPLC 泵连接至废液。



3

将 InfinityLab Quick Change 快速更换 2 位/10 通阀切换至 UHPLC 位置并将 InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通阀切换至容纳 UHPLC 色谱柱的 MCT 2 后，UHPLC 泵连接至共享模块 (图 2B)。为维持反压，SFC 二元泵直接连接至 SFC 控制模块。

为选择溶剂，SFC 二元泵在通道 B 中配有 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀。UHPLC 泵也在通道 A 和 B 中与两个 InfinityLab Quick Change 快速更换 12 位/13 通溶剂选择阀连接。

所述 SFC/UHPLC 混合型系统最多可配置包含 32 根色谱柱的四个 MCT。当然，这无法容纳在一个液相色谱堆栈中。在这种情况下，需要两个堆栈。此类系统将需要使用 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 6 位/14 通阀来选择 MCT (图 3)。

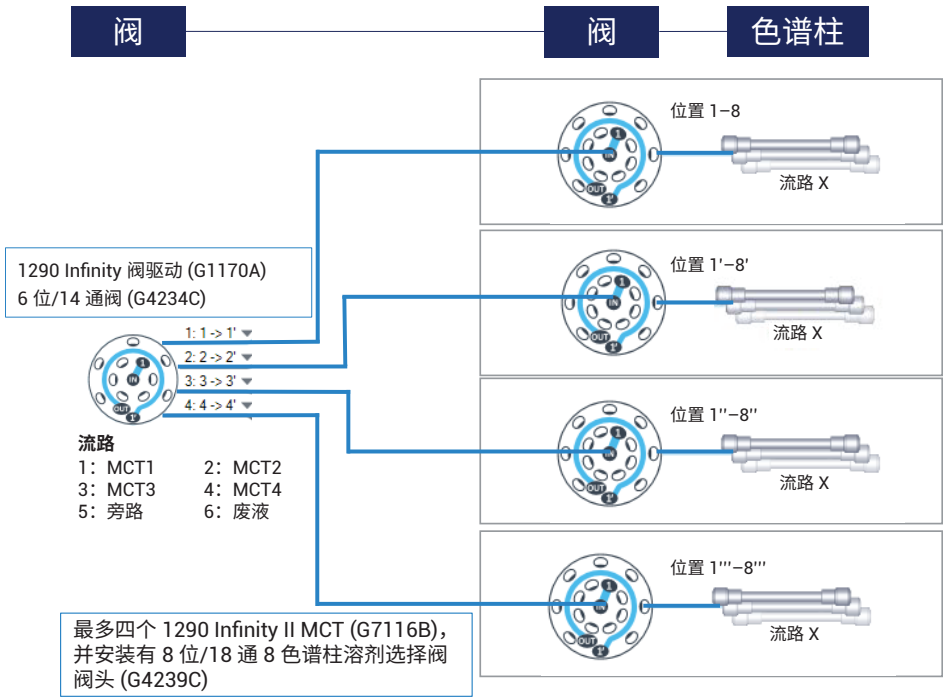


图 3. MCT 组合的常规设置：最多四个 MCT，可容纳 32 根色谱柱。MCT 通过 InfinityLab Quick Change 快速更换 6 位/14 通阀进行操作，并且每个 MCT 内部具有用于最终色谱柱选择的 InfinityLab Quick Change 快速更换 8 位/18 通 8 色谱柱选择阀。通过在分析方法中选择所需的色谱柱，所有阀即可自动切换至正确的位置。

色谱柱（一组容纳于 MCT 1 中，用于 SFC 模式；另一组容纳于 MCT 2 中，用于 UHPLC 模式）

- InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CF, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-609)
- InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CD, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-607)
- InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-604)
- InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-603)

软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.08
- 方法筛选向导，修订版 A02.08.011

软件设置

使用方法筛选向导在 SFC 和 UHPLC 模式下生成不同的分离筛选方法。在方法筛选向导的首页，根据筛选所用的模式选择泵。然后设置溶剂、色谱柱和梯度分离条件。最后，方法筛选向导自动生成并执行所有必需的分离方法以及冲洗和平衡方法。为评估数据，利用 ChemStation 智能报告中集成的方法筛选报告，按照分离度筛选成功的分离。

样品

卡洛芬、酮洛芬、布洛芬和吲哚洛芬的甲醇溶液，浓度分别为 1 mg/mL。

化学品

所有溶剂均购自德国 Merck 公司。新制超纯水产自配置 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。化学品购自德国 SigmaAldrich 公司。

SFC 初始条件

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇 + 0.1% TEA/0.1% TFA 乙醇 + 0.1% TEA/0.1% TFA 异丙醇 + 0.1% TEA/0.1% TFA
SFC 流速	2 mL/min
梯度	0 min 时，10% B；10 min 时增加至 50% B
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	140 bar
柱温	30 °C
进样量	2.0 μL
进样溶剂	甲醇
过量进样体积	4 μL
进样速度	400 μL/min
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s

UHPLC 初始条件

参数	值
溶剂 A	水 + 15 mmol/L 甲酸铵，pH 4.0
溶剂 B	乙腈
流速	0.5 mL/min
等度	30% B, 40% B, 50% B 停止时间：10 min
柱温	30 °C
进样量	1.0 μL
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s

结果与讨论

SFC 模式下的方法筛选和方法优化

在初始筛选运行中，在 SFC 模式和柱温 30 °C 的条件下，采用 10 分钟的短梯度运行，其中改性剂浓度从 10% 增加至 50%。在三种溶剂（甲醇、乙醇和异丙醇，各含 0.1% TEA/TFA）中，对四种不同的手性柱进行筛选。使用不同的手性柱时，仅以甲醇作为改性剂能够分离手性测试混标中的对映异构体。作为简要概览，利用方法筛选报告在气泡图中显示所获得的分离度（图 4）。气泡图报告表明，所有化合物在初始筛选条件下在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱上开始分离（更多详细信息概述于表 1 中）。

表 1. 利用 SFC 在四种不同的手性柱上以甲醇 (0.1% TEA/TFA) 作为改性剂获得的初始手性筛选分离的结果

峰	RT	分离度	对称性	色谱柱
卡洛芬				
2	3.867 4.033	2.10	0.86 0.69	Poroshell 120 Chiral-CD
1	2.490		0.80	Poroshell 120 Chiral-CF
1	4.840		0.64	Poroshell 120 Chiral-V
2	3.585 3.731	1.63	0.92 0.80	Poroshell 120 Chiral-T
酮洛芬				
1	1.489		0.68	Poroshell 120 Chiral-CD
1	1.225		0.87	Poroshell 120 Chiral-CF
1	1.800		0.91	Poroshell 120 Chiral-V
2	1.797 1.855	0.65	1.08 0.79	Poroshell 120 Chiral-T
布洛芬				
1	1.170		0.63	Poroshell 120 Chiral-CD
1	0.870		1.18	Poroshell 120 Chiral-CF
1	1.080		1.25	Poroshell 120 Chiral-V
2	1.067 1.107	0.52	1.82 0.67	Poroshell 120 Chiral-T
吲哚洛芬				
2	3.467 3.535	0.66	0.94 0.64	Poroshell 120 Chiral-CD
1	2.149		0.95	Poroshell 120 Chiral-CF
2	3.929 4.075	1.23	0.81 0.65	Poroshell 120 Chiral-V
2	3.827 4.028	1.90	0.71 0.63	Poroshell 120 Chiral-T

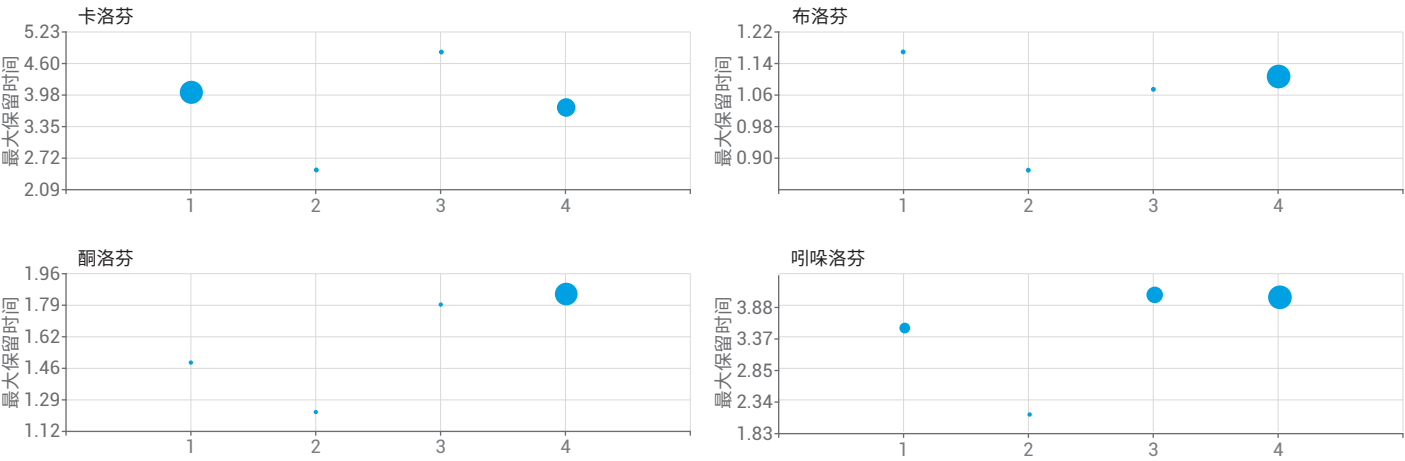


图 4. 在 SFC 筛选运行中获得的分离度简要概述。气泡大小显示各种化合物和色谱柱组合所获得的最大分离度之和。Y 轴表示化合物的保留时间。色谱柱：1) InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CD；2) InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CF；3) InfinityLab Poroshell 120 Chiral-V；4) InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T

卡洛芬和吲哚洛芬的对映异构体在其他固定相上也得到分离。具体而言，卡洛芬对映异构体在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CD 色谱柱上获得了良好的分离 (图 5A)。图 5B 显示了吲哚洛芬对映异构体在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱上获得的分离结果。

对于所有化合物和色谱柱与一种溶剂的组合，初始筛选需要大约三个半小时。

为进一步优化分离，利用 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱对等度分离条件进行测试。图 6A 和图 6B 分别显示

了卡洛芬和吲哚洛芬对映异构体在该色谱柱上的分离结果。在测试条件下，酮洛芬外消旋混合物只能以较低的分度得到分离。

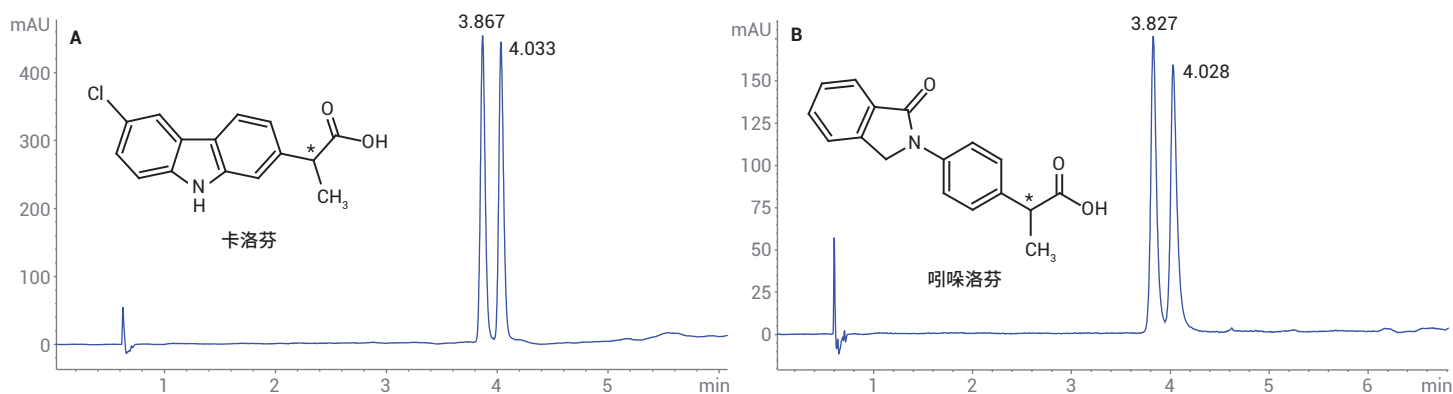


图 5. 在初始 SFC 手性筛选条件下获得的 A) 卡洛芬 (InfinityLab Poroshell 120 Chiral-CD) 和 B) 吲哚洛芬 (InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T) 对映异构体的分离结果

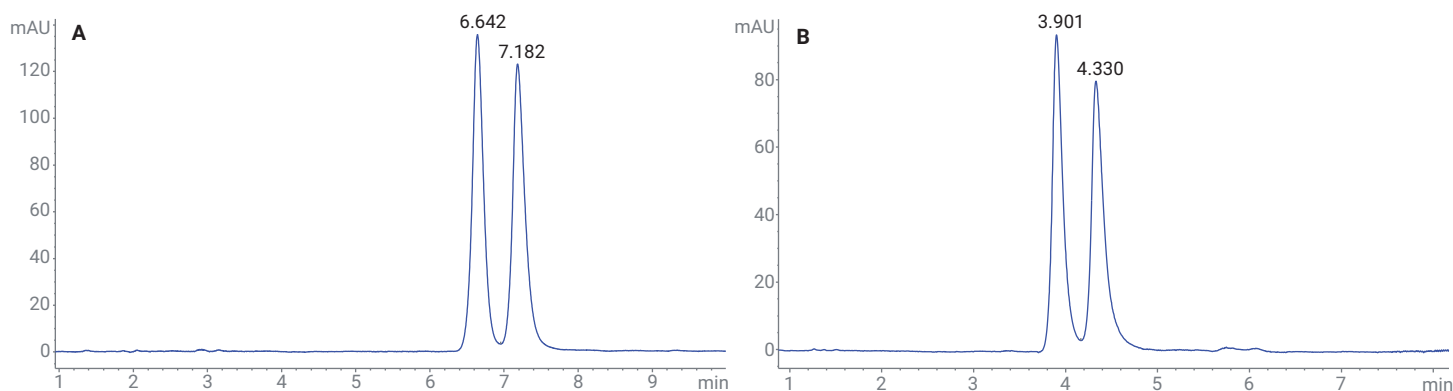


图 6. A) 卡洛芬 (InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T, 等度, 10% B) 和 B) 吲哚洛芬 (InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T, 等度, 15% B) 对映异构体的分离结果

UHPLC 模式下的方法筛选和方法优化

在 UHPLC 条件下，利用四种外消旋测试混标和 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱对三种不同的流动相（30%、40%、50% 甲醇，其中含 15 mmol/L 甲酸铵，pH 为 4.0）进行筛选。由结果创建的气

泡图报告显示了最大分离度之和，并鉴定出在给定色谱柱上分离各种化合物的最佳溶剂以及最大保留时间（图 7）。表 2 汇总了详细结果。为优化分离效果，使用 40% 甲醇作为流动相，并将温度从 30 °C 降至 20 °C（表 3）。

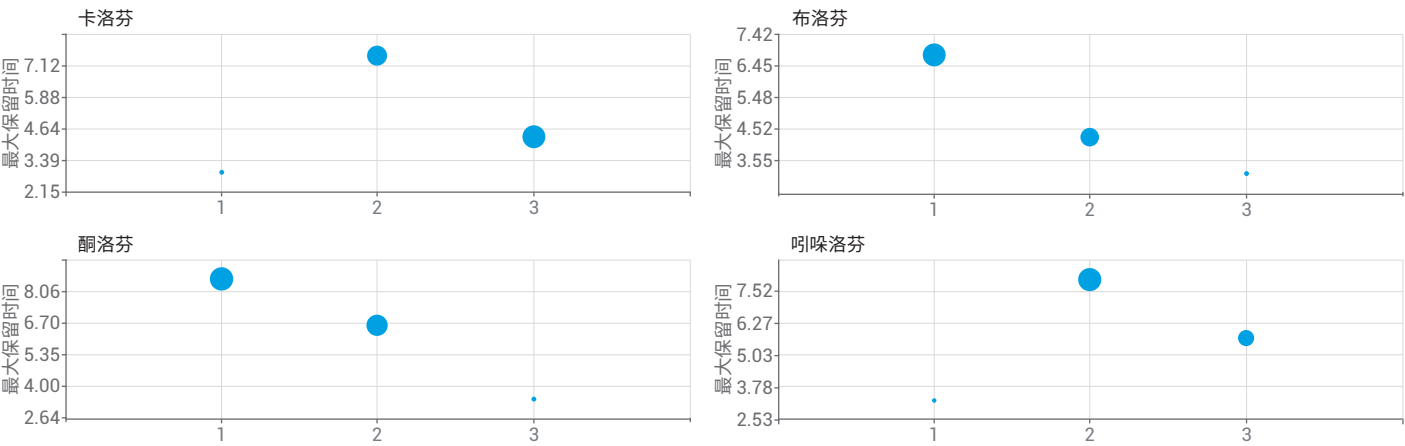


图 7. 在 UHPLC 筛选运行中获得的分离度简要概述。气泡大小显示各种化合物和溶剂在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱上获得的最大分离度之和。溶剂：1) 30% 甲醇；2) 40% 甲醇；和 3) 50% 甲醇，各自含 15 mmol/L 甲酸铵，pH 为 4.0

表 2. 利用 UHPLC 模式得到的四种外消旋混合物的初始手性筛选分离结果，在一根色谱柱上使用三种溶剂，柱温为 30 °C

	30% 甲醇			40% 甲醇			50% 甲醇		
	RT	分离度	对称性	RT	分离度	对称性	RT	分离度	对称性
卡洛芬				7.184 7.606	1.37	0.60 0.53	4.149 4.318	1.06	0.85 0.71
布洛芬	6.303 6.811	1.83	0.49 0.44	3.823 4.057	1.65	0.84 0.78	3.067 3.187	1.06	0.95 0.91
酮洛芬	8.227 8.566	0.99	0.72 0.56	5.851 5.989	0.64	1.03 0.66	3.465		
吲哚洛芬				7.358 7.920	1.71	0.57 0.49	5.584 5.850	1.49	0.79 0.70

表 3. 在 InfinityLab Poroshell 120 Chiral-T 色谱柱上使用 40% 甲醇获得的分离的温度优化

	RT	分离度	对称性
卡洛芬	8.228 8.857	1.48	0.56 0.51
布洛芬	4.307 4.649	2.03	0.83 0.72
酮洛芬	6.379 6.566	0.72	0.91 0.66
吲哚洛芬	8.783 9.645	1.98	0.63 0.64

例如，图 8 表明布洛芬对映异构体最终得到分离。在测试条件下，酮洛芬外消旋混合物只能以不太理想的分离度得到分离。

结论

本应用简报展示了在手性筛选中使用增强型 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在 SFC 和 UHPLC 模式下进行组合式方法开发。该系统可容纳最多 16 根色谱柱，支持采用最多 12 种溶剂进行 SFC 分离，并支持采用最多 24 种溶剂进行 UHPLC 分离。借助四个 MCT，可使用最多 32 根色谱柱。需要借助方法筛选向导软件创建筛选方法。结果表明，在 SFC 模式以及 UHPLC 模式下，利用相同的 InfinityLab Poroshell 120 手性柱能够将一组外消旋混合物分离成各个对映异构体组分。对筛选结果进行简单优化后，可获得一种在等度条件下分离对映异构体的良好方法。本研究所应用的手性筛选概念最近通过制药环境下运行的高通量无人值守系统得以实现³。

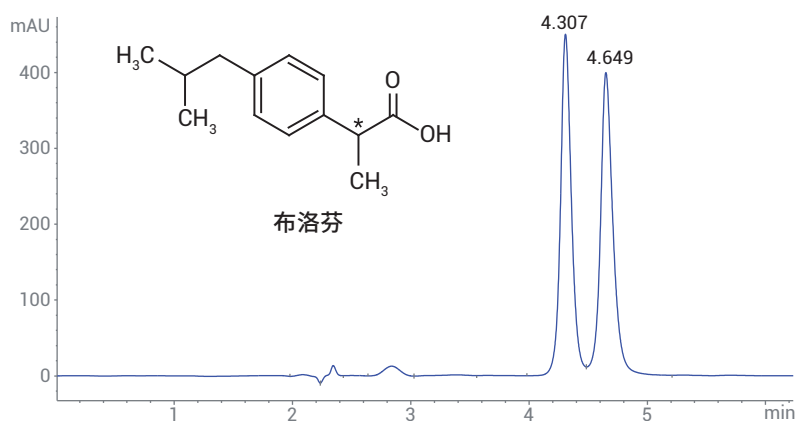


图 8. 布洛芬对映异构体在 UHPLC 条件下的分离

参考文献

1. Orthogonal Separations Using the Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC Hybrid System (使用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统进行正交分离), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-8276EN
2. Chiral Multicolumn Method Development on the Agilent 1260 Infinity II Analytical SFC System (在 Agilent 1260 Infinity II 分析型 SFC 系统上进行手动多色谱柱方法开发), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-7624EN
3. Easy Access to Rapid Chiral SFC Method Development for NonChromatographers (非色谱工作者轻松完成快速手性 SFC 方法开发), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0011EN

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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, 2018
2018 年 12 月 1 日, 中国出版
5994-0171ZHCN