



超临界流体色谱

基础导论



Agilent Technologies

超临界流体色谱

基础导论

Terry A. Berger



Agilent Technologies

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2015

2015 年 7 月 1 日，中国印刷

5991-5509CHCN

目录

目录	III
前言	VI
作者简介	XI
引言	XIII
符号	XIV
缩写	XIV
1 超临界流体色谱简介	1
1.1 什么是 SFC	1
1.2 为什么采用 SFC	2
1.3 SFC 能够分离哪些化合物	12
1.4 这一名称的含义	16
2 流动相	19
2.1 为什么使用 CO ₂ ?	19
2.2 使用 100% CO ₂	21
2.3 改性剂或共溶剂	23
2.4 添加剂	31
2.5 添加水以扩展溶质极性	34
3 固定相	35
3.1 材料	35
3.2 非手性键合相	35
3.3 固定相比较	40
3.4 填料粒径与色谱柱尺寸之间的关系	41
3.5 推荐的色谱柱尺寸	45
3.6 用于手性分离的色谱柱	48

4 流动相变量对保留值和选择性的影响	49
4.1 改性剂浓度.....	49
4.2 温度.....	50
4.3 压力.....	53
4.4 流速.....	55
4.5 可控变量对保留时间和选择性的影响概述.....	57
5 方法开发	58
5.1 溶质与固定相极性的匹配.....	58
5.2 极性窗口.....	60
5.3 入门指南.....	60
5.4 极性溶质.....	61
5.5 低极性溶质.....	64
5.6 多变量方法.....	65
6 非手性分离	66
6.1 案例研究 1 — 典型的低极性样品.....	66
6.2 案例研究 2 — 中等极性样品.....	71
6.3 案例研究 3 — 磺胺类药物.....	83
6.4 其他结果.....	89
7 手性分离	90
7.1 背景.....	90
7.2 对映体过量率测定.....	91
7.3 用于手性分离的正相技术.....	91
7.4 可控变量对手性分离的影响.....	93
7.5 开发手性方法.....	98

8 SFC 定量分析	103
8.1 验证阶段.....	103
8.2 开发方法用于定量分析饮料和食品中的山梨酸盐、 苯甲酸盐和咖啡因.....	105
8.3 校正.....	108
8.4 苯甲酸盐、山梨酸盐和咖啡因的定量分析结果总结.....	116
8.5 手性分离.....	116
9 仪器注意事项	121
9.1 泵.....	121
9.2 UV 检测器优化.....	124
9.3 双梯度.....	137
9.4 自动进样器注意事项.....	138
9.5 其他.....	146
9.6 SFC 的超高性能.....	148
9.7 在 SFC 与 HPLC 之间切换的混合型系统.....	150
9.8 质谱接口.....	154
9.9 其他检测器.....	156
参考文献.....	159

前言

作者 Terry Berger 在我们如今称之为超临界流体色谱 (SFC) 的领域中拥有独特的丰富经历，是撰写本基础导论的不二人选。他早期与 SFC 的接触多属偶然，并未特别关注，但后来逐渐开始了深入了解。他与 SFC 相关从业人员保持有近 40 年的联系，并拥有 35 年以上的直接经验。近 60 年前（1958 年），Jim Lovelock 率先提出 SFC，他在 20 世纪 80 年代和 90 年代与作者就 SFC 进行了大量讨论，成为作者的私人朋友。

Ernst Klesper 于 1962 年通过实验展示了 SFC，采用高密度氯氟烃作为流动相对金属卟啉进行分离。作者后来与 Klesper 教授在很多场合有过交流（从 20 世纪 70 年代后期到 80 年代中期在美国和德国），并就 SFC 进行过大量讨论。

在 20 世纪 60 年代和 70 年代，该技术停滞不前，全球每年最多只有十几个研究组做出零星的科学贡献。应用领域倾向于将气相色谱 (GC) 扩展至分子量更大、沸点更高、相对非极性的溶质。

20 世纪 70 年代早期，作者在印第安纳州普渡大学攻读研究生，当时隔壁实验室是颇受尊敬的色谱专家 L.B. “Buck” Rodgers 的实验室。自参加过 1971 年的一次科学研讨会之后，他再次决心探索这一全新的色谱形式。流动相的压力控制是主要的可控变量，压力从低到高的程序是那个时期的常用操作。那个时期的所有设备都是自制的，仪器控制性较差，人们对流动相的理化特性最多也只是取得初步了解。Rodgers 利用仓库中的超高压加氢泵，并使用 2 英寸厚的家用泡沫绝缘材料制造了一个看起来像小棺材的约 4 英尺长的柱温箱。色谱柱为 30 英寸长或更长，并填充以具有宽粒径分布的不规则颗粒。作者看着这些开发进展，回想当时曾经怀疑这一奇特的色谱形式是否有用。Rodgers 的结果表明沿着色谱柱柱长的密度梯度是个严重的问题。这一结果及随后 Milos Novotney 的研究似乎表明该技术不可能得到与当前高效液相色谱 (HPLC) 相媲美的结果。这一看法在一定程度上阻碍了填充柱 SFC 的后续研究。

作者曾于 20 世纪 70 年代早期在伦敦帝国学院接受过有关 HPLC 的培训，那时他开发出了用于 HPLC 的安培电化学检测器。在巴西教学一年后，他在俄亥俄州克里夫兰参与了大量有关航天仪器的开发项目。

然后，作者于 1979 年开始供职于惠普公司，并加入 Avondale 部门的研究小组。惠普实验室或 Avondale 部门的所有科学家或工程师 Dennis Gere、Henk Lauer、Doug McManigill 和 Harry Weaver 在当年的匹兹堡会议上就高密度气相色谱做了一系列报告（作者正是在此次会议上获得聘任）。这些报告中的某些成果随后发表于诸如 *Analytical Chemistry* 和 *Science* 等期刊以及相关的应用简报中。这些工作引导了一项客户需求，促使了商品化套装的开发，从而使 Hewlett-Packard HP 1084 型 HPLC 仪器转化为 SFC 系统。因此，商品化 SFC 就此诞生。

这一版本的 SFC 使用机械反压调节器、二元泵和组分程序，非常类似于 HPLC。流速、组分、柱温和色谱柱出口压力均独立控制。与先前的自制仪器不同，该系统不存在压力程序。随着粒径仅为 3 μm 的球形硅胶颗粒相关大量研究工作的进展，色谱柱更加现代化。作者所在的研究组承担了该装备的设计工作。

几乎在使用纯 CO_2 压力程序的毛细管型 SFC 问世的同时，惠普公司推出不兼容 SFC 的 HP 1090 HPLC 仪器，取代了过时的 HP 1084 仪器。Milos Novotny 和 Milton Lee 是毛细管 SFC 发展的背后推手。本书作者所在的惠普公司研究小组那时刚刚开发出熔融石英毛细管色谱柱，该型色谱柱能够耐受毛细管 SFC 所必需的高压（400 至 600bar）条件。Milton Lee 是将固定相键合到毛细管色谱柱这一新领域的学术带头人。

由于缺少市售仪器，填充柱 SFC 几乎销声匿迹，而毛细管 SFC 则被视作未来的发展趋势。当时，人们对流体的理化性质及其与固定相的相互作用还知之甚少。仅剩的少数填充柱用户与毛细管柱支持者之间展开了许多争论。作者于 1985 年开始作为高级研究科学家在惠普公司从事 SFC 研发工作，被委任解决这些争议问题。在该过程中，他访问了每位欧洲用户（大约 16 位），就争议问题和发展潜力进行了广泛的讨论。

当时，人们普遍认为密度是主要的可控变量，并且改变流动相密度对保留性能的影响最大。很遗憾的是，由于 Giddings 的误解，人们认为高密度 CO_2 的极性类似于异丙醇¹。如果确实如此，添加醇类改性剂将明显改变流动相的密度，但对溶剂强度的影响则微乎其微。这一误解数十年来都未受到质疑。当时，缺乏直接的密度测量手段对 SFC 中所用的甲醇/ CO_2 （或任何其他）混合物的密度进行测量。二元混合物的状态方程并不准确。作者随后从特拉华大学借来了比重计，对甲醇/ CO_2 的密度进行了一些首次测量，发表在文献中。然后他测量了密度不变的情况下甲醇浓度对保留值的影响，结果表明改性剂确实能够显著提高流动相的洗脱强度。

不久之后，溶剂化变色染料被证明是一种可在 HPLC 中测量染料分子周围溶剂化微球强度和极性的简单方法²。然后，作者将相同的原理应用于 SFC⁴⁵。结果表明二元流体的溶剂强度呈现出高度非线性，最初少量的添加剂即可产生过度的影响。 CO_2 的极性和溶剂强度被证明类似于戊烷。

在密度和溶剂化变色染料测量中，Giddings 的洗脱系列公式¹最终获得了修正（尽管仍有许多追随者）。结果证明，至少对于改性的流体而言，改变改性剂浓度对保留值的影响远大于压力、温度和密度的影响。

20 世纪 80 年代后期，经广泛证实，使用 CO_2 和醇类改性剂（甲醇或乙醇）组成二元流路时，许多极性溶质（例如有机酸和碱）洗脱得到的峰形很差或根本无法洗脱出来。一般认为这一现象表明固定相活性过高或包含与这些极性溶质相互作用过强的活性位点。当时提议的解决方案是

使用低极性的固定相以及进一步的脱活处理，但是该方法根本无效，极性分子通常不发生保留并且严重拖尾。作者提出使用极性添加剂（例如，强酸和/或碱）与有机改性剂的混合液，同时使用极性更强的色谱柱，此方法被证明能够显著改善峰形。此类添加剂的使用开启了现代 SFC 的潜能，目前此技术已经能够洗脱和分离包含高达 40 聚体肽在内的极性溶质。

我们可以至少追溯到“Buck”Rodgers 的论文³，他们存在这样一种看法：色谱柱的压降将导致密度梯度的产生，造成严重的柱效损失。这一观点在 20 世纪 70 年代中期得到 Novotny 的支持⁴。到 20 世纪 80 年代中期，出现了多种竞争理论，其中至少一种理论⁵认为填充柱 SFC 无法生成超过大约 20000 的塔板数，因为伴随色谱柱压降将产生密度梯度。作者将 11 根柱长为 20 cm 且填充以 5 μm 填料的色谱柱串联，在高达 250bar 压降的条件下获得了 220000 的塔板数，有力地反驳了大多数争论。密度梯度的影响仍然是人们感兴趣的一个领域，大量最新的出版物均以此为主题。

作者说服密西西比大学的 Jon Parcher 采用示踪物脉冲 MS 实验测量流动相组分在固定相上的吸附情况。结果表明大量的吸附涂层对固定相的性质具有显著影响，从而会影响到色谱性能。

澄清了大多数的误解后，作者说服惠普公司管理层投资开发新一代的 SFC。开发出的产品于 1992 年问世，此产品兼具毛细管柱和填充柱性能。该仪器 (HP G1205A) 能够同时、独立地控制流速、组成、压力和温度，它还能够使用内部状态方程执行密度程序。

自 20 世纪 90 年代早期至中期以来，随着对流动相特性的了解日益深入，人们普遍认为毛细管 SFC 被过分吹嘘，尤其针对极性溶质。这一认知很大部分来源于对 Giddings 洗脱系列公式的修订。令人痛心的是，这种情况导致了毛细管 SFC 的消亡，即使该技术经证实与其他技术相比，对极性较低的溶质具有众多优势。

1995 年，作者得到从惠普公司购买 SFC 业务的机会，并与另外一位前雇员和外部投资者一起创建了 Berger Instruments (BI)。BI 再次投入设计工作中，主要针对填充柱 SFC 以及降低成本。BI 推出了首款手性方法开发系统、首款成功用于克级（主要为手性）和高通量库纯化的半制备型仪器、首款市售 SFC-MS 系统、首款成功的气体输送系统以及大量其他的次要产品。公司于 2000 年底被出售给 Mettler Toledo，作者从此担任首席技术官直至 2003 年。

2008 年，作者创立了 Aurora SFC Systems，该公司能够生产一种将近似标准 HPLC 仪器转换为最先进的 SFC 系统的模块。Aurora 于 2012 年出售给安捷伦科技公司，其升级模块如今已成为安捷伦分析型 SFC 系统的核心。作者的研发小组获得了两项不同的 R&D100 奖，一项是在 BI，另一项在 Aurora（这两个奖项分别用于表彰 2004 年和 2008 年的 100 项顶尖发明）。

作者目前拥有一个最先进的 SFC 实验室，开展 SFC 咨询业务 (SFC Solutions, Inc.)。从必须的业务经营中解脱出来后，他积极开展研究并发表了有关仪器装置、色谱柱和应用（包括本基础导论）的原创性研究成果。

作者对流体理化性质、SFC 应用和仪器装置方面长期、深入的见解在行业内独树一帜。他见识过许多应用潮流的来去，看着许多否定理论逐渐消失。他对 SFC 的未来非常乐观，希望他的深入见解能够传递给本基础导论的读者，帮助读者在实验室中成功实施 SFC。

作者简介



Terry A. Berger

博士，DIC

总裁，SFC Solutions, Inc.

Terry A. Berger 从佛罗里达、威斯康辛和普渡大学研究生毕业后，于 1976 年获得英国伦敦大学帝国理工学院的分析化学博士学位。Berger 博士被许多人视作现代超临界流体色谱 (SFC) 之父。2004 年，Berger 博士荣获英国色谱学会授予的 Martin 金质奖章（色谱领域最重要的奖项之一）。

自 1985 年起，他在惠普公司（如今的安捷伦科技公司）花费十几年时间系统地破除了当时流行的许多有关填充柱 SFC 的误解。在这个过程中，他搞清楚了密度和溶剂强度效应（已成为主要焦点）。他证明（与许多已有理论相反），高压降不会导致柱效产生严重损失（仍备受关注的的问题）。他提出使用添加剂并系统研究了各种添加剂对峰形和保留值的影响，首次展示了对各种化合物的分离，（与常见认识相反）证明填充柱 SFC 广泛适用于比以前预想更多的极性溶质。示例包括似药物类小分子，例如伯胺。

1995 年，Royal Society of Chemistry 出版了 Berger 博士的专著《填充柱 SFC》(*Packed Column SFC*)，该著作从根本上改变了分离科学中对 SFC 的看法，使现代 SFC 更类似于 HPLC 而非 GC。此书一直是了解该技术基本原理的主要来源，本基础导论的出版旨在取代这本专著。在本基础导论之前出版的其他 SFC 相关著作基本都是许多作者就特定主题的论文汇编。

Berger 博士还出版了大约 75 篇同行评审科学论文、7 篇专著章节、13 项百科全书和参考工作条目以及几十篇应用简报。他还将讲授过 20 多次有关 SFC 的短期课程，提供了数百次口头报告和海报，并获得或申请了大约 25 项有关 GC、SFC 和 HPLC 的专利。

1995 年，他创立了 Berger Instruments 公司，推出了首款 SFC 手性方法系统、首款成功用于库纯化和克级分离的半制备型 SFC 系统、首款市售 SFC-MS 以及首款气体输送系统。后来，他创立了 Aurora SFC，该公司制造一种将分析级 HPLC 仪器转换为 SFC 系统的模块。此模块已成为安捷伦分析型 SFC 系统和安捷伦分析型 SFC/UHPLC 混合型系统的基础。

他的技术团队在过去 12 年已经两次荣获 R&D 100 奖项，还获得过能源部颁发的 NICE III 环境奖。Berger 博士依然是许多色谱出版物和学会的编辑和评审员。

引言

本基础导论旨在取代作者在 1995 年首次由 Royal Society of Chemistry 出版的著作《填充柱 SFC》(*Packed Column SFC*)。这本原著从根本上改变了分离科学中对 SFC 的看法，使现代 SFC 更类似于 HPLC 而非 GC。这一观念将在本基础导论中得到延续和扩展。

第一章介绍了 SFC 的一些基本原理，同时还讨论了在现代分析实验室采用该技术的理论依据、动机和优势。后续章节将更详细地回顾流动相和固定相及其对重要色谱特性（保留值和选择性）的影响。

一本关于分离科学的基础导论离开对目标技术实施（包括应用领域）的深入讨论肯定是不全面的，这些内容将包含在有关方法开发、非手性和手性分离以及定量分析的章节中。

最后，本书还将讨论仪器注意事项，包括对流动相输送、进样和检测各方面关键信息的详细解释。

符号

A	van Deemter 方程中涡流扩散的影响
B	van Deemter 方程中纵向扩散的影响
C	van Deemter 方程中径向扩散的影响
D	流动相中的溶质二元扩散系数
d_p	粒径
H	塔板高度
k	分配比
μ	流动相的线速度
P	分配系数
P'	洗脱强度 (根据 Snyder)
ΔP	分离柱的压降

缩写词

ACN	乙腈
BPR	反压调节器
CZE	毛细管区带电泳
EtOH	乙醇
FID	火焰离子化检测器
GC	气相色谱
HPLC	高效液相色谱
id	内径
IPA	异丙醇
IPAm	异丙胺
MeOH	甲醇
MS	质谱仪
RI	折射率
RSD	相对标准偏差
SFC	超临界流体色谱
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
UHPLC	超高效液相色谱
UV	紫外

1.1 什么是 SFC

超临界流体色谱 (SFC) 是一种分离技术，其使用的仪器装置与高效液相色谱 (HPLC) 几乎完全相同。此技术可分离复杂的混合物，并可测定混合物中各个组分的含量，有时还可以鉴定组分。样品溶液注入高压液流之后，液流会将样品带入填充有细颗粒的管或色谱柱中。样品中的各个组分会与颗粒表面发生不同的相互作用，当其穿过色谱柱时即可在时间和空间上实现分离。组分将以不同的时间从色谱柱中流出，得到高斯或伪高斯峰，然后流过检测器。

此技术与 HPLC 的最显著差异在于用高密度压缩气体替代了大多数液体流动相，该高密度压缩气体几乎都采用二氧化碳 (CO₂)。在高压条件（例如高于 80 bar）下，CO₂ 充当溶剂。由于它是一种压缩气体，因此系统出口需要配备反压调节器以确保整个色谱仪中的流动相保持单一的密度。于是，这就要求一些检测器，如紫外 (UV) 检测器，能够在高压下运行。

CO₂ 是一种高度非极性溶剂，类似于烃类，但属于不同的溶剂系列。因此，对于极性较强的溶质，需要向流动相中加入有机改性剂（有时称作共溶剂），主要为醇类。洗脱时通常采用由低到高的改性剂浓度进行梯度洗脱，色谱峰则按极性由低到高的顺序洗脱出来。

对于许多强极性溶质，它们与固定相的相互作用过强，通常无法洗脱出来或洗脱得到的峰形很差。此问题通常通过向流动相添加强极性添加剂（例如，将强酸或碱溶解于改性剂中）得到解决。

SFC 通常是一种正相色谱技术，因为组分按极性由低到高的程序运行。然而，SFC 与正相 HPLC 相比具有显著的优势，其平衡速度极快，重现性非常出色，甚至可以进行水性样品分析。

对于极性溶质，需使用极性固定相。经典的极性固定相包括裸硅胶、氰基、二醇和氨基固定相。过去几年中，研究人员专门针对 SFC 开发出了大量新型固定相。这些固定相包括多种乙基吡啶固定相和许多专利固定相。对于极性较低的溶质，有时会使用反相柱，如 C18、C8、C4 和甲基柱。

最近几年，亚 2 μm 颗粒的使用变得相当普遍。然而，过去几十年中，SFC 的主要应用领域为手性分离^{6,7}。SFC 使用的色谱柱与 HPLC 相同。虽然最高效的老式手性色谱柱为涂覆且未经键合的色谱柱，但新型键合固定相尚未取代涂覆色谱柱，因为涂覆色谱柱具有卓越的选择性且比较容易优化。

SFC 还可用于分离极性很低的化合物，例如许多天然产物，包括脂溶性维生素、类胡萝卜素和脂质。对于此类样品，常以 C18 作为固定相。

1.2 为什么采用 SFC

1.2.1 分析速度更快

van Deemter (Knox) 方程描述了色谱柱的动力学性能。在其最简单的形式中，该方程由三项组成，每项描述了不同形式的扩散，参见公式 1.1。

$$H = A^{0.33} + \frac{B D_{1,2}}{\mu} + \frac{C d_p^2 \mu}{D_{1,2}}$$

公式 1.1 van Deemter (Knox) 方程。

B 项和 *C* 项分别表示纵向扩散和径向扩散的影响，并且方程中包含流动相中溶质二元扩散系数 $D_{1,2}$ 与流动相线速度 μ 之比。*B* 项说明扩散系数越高将导致最佳线速度越高。在 *C* 项中，较高的扩散系数将使较高流速下的柱效损失较小。

纯 CO₂ 中的扩散系数比水或水性混合物中的扩散系数大约快 10 至 15 倍。例如，苯甲酸在水中的扩散系数为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (在 20 °C 下)⁸。在 100% CO₂ 中，苯甲酸的扩散系数为 $16 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (在 100 bar 和 40 °C 下)，300 bar 时下降至大约 $9.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ ⁹。类似地，一些稍大的二甲基苯胺类化合物在 150 和 350 bar 之间 (40 至 60 °C 条件下) 的扩散系数介于 7 至 $12.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ 之间¹⁰。

CO₂ 分子的分子间相互作用很弱。因此，它在室温和大气压下为气体。当这些分子被迫接近 (压缩) 时，所得到的高密度流体可充当溶剂。然而，即使在较高的密度下，其分子间力仍然较弱。因此，溶解在 CO₂ 中的其他化合物可以迅速扩散。

近年来，SFC 已经很少使用纯 CO₂ 进行操作。添加极性改性剂 (例如，甲醇、乙醇或异丙醇等醇类) 能够显著减小扩散系数。仅添加 5.5% 甲醇即可使扩散系数减小近一半¹¹，浓度更高，此效应将更显著。例如，锦葵色素-3,5-二葡萄糖苷¹² 的分子量为 670，与许多药物类小分子相比是一个相当大的分子且具有许多极性官能团。采用含 20% 甲醇的 CO₂ 并在 200 bar 条件下操作时，其扩散系数仍然比在大气压 (40 至 60 °C) 条件下纯甲醇中的扩散系数高出 4.7 至 5.1 倍，如图 1.1 所示。经证实，极性溶质被极性改性剂团簇包围，并且由于团簇的横截面积增大，导致这一较大的溶剂化体扩散速度减慢^{11,13}。

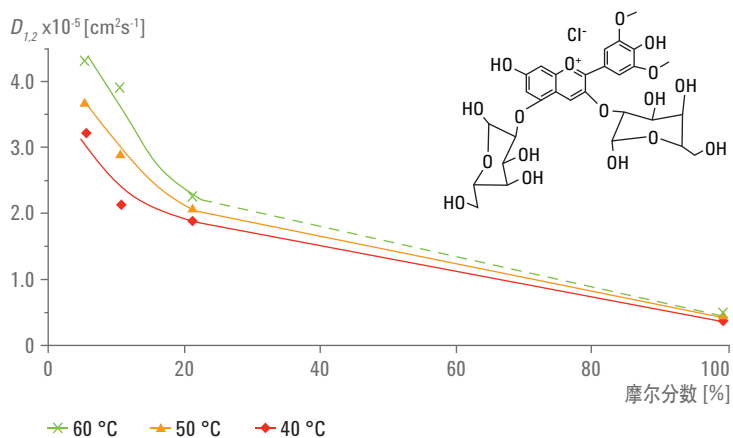


图 1.1 分子量为 670 的锦葵色素-3,5-二葡萄糖苷在 $CO_2/MeOH$ 混合物中的扩散系数。在 200 bar 下采集得到 $CO_2/MeOH$ 数据。在大气压下采集得到纯 MeOH 数据。在相同温度下, 采用 20% 改性剂时得到的扩散系数比纯 MeOH 中的扩散系数高出 5.08、4.50 和 4.70 倍

由于 SFC 通常采用 5 至 50% 的改性剂, 通常认为 SFC 采用改性的流动相时在相同的色谱效率和相同粒径的填料下, 分析速度比 HPLC 高出 3 至 5 倍。这一结果在使用以亚 $2 \mu m$ 颗粒填充的色谱柱时仍然成立。这意味着使用相同粒径的色谱柱时, SFC 的运行时间只有 HPLC (或 UHPLC) 的 $1/3$ 至 $1/5$, 而通量则高出 3 到 5 倍。平衡速度很快, 使得梯度分析的循环时间缩短。

分子越小, 扩散系数越高。遗憾的是, 文献中有关小分子在改性 CO_2 中的扩散系数数据非常少。文献中的大多数扩散系数值如表 1.1 所列。

溶质	温度	压力	$D_{1,2}$ [cm^2s^{-1}]		
			5% MeOH	5.5% MeOH	10% MeOH
2-硝基苯甲醚	40 °C	200 bar	7.8×10^{-5}		7.22×10^{-5}
		300 bar	6.85×10^{-5}		6.25×10^{-5}
	50 °C	200 bar	8.36×10^{-5}		7.56×10^{-5}
		300 bar	7.52×10^{-5}		6.76×10^{-5}
二氯苯	40 °C	200 bar	9.36×10^{-5}		8.47×10^{-5}
		300 bar	7.98×10^{-5}		7.6×10^{-5}
叔丁基苯	50 °C	200 bar	8.33×10^{-5}		7.57×10^{-5}
吡啶	55 °C	173 bar		7.78×10^{-5}	
苯甲酸	55 °C	173 bar		6.69×10^{-5}	
菲	55 °C	173 bar		10.0×10^{-5}	

表 1.1 几种小分子在添加有低浓度甲醇的 CO_2 中的扩散系数^{10,11}

1.2.2 压降较低

较弱的分子间相互作用在导致扩散系数升高的同时，还将使纯 CO_2 及改性 CO_2 的粘度降低。如果我们暂时忽略 100% CO_2 并将重点集中在改性 CO_2 上，图 1.2 展示了文献¹⁴ 报道的水/甲醇混合物在 40 和 60 °C 下的粘度值以及水/乙腈在 60 °C 下的粘度值。将这些 HPLC 类似条件与 CO_2 /甲醇混合物的值（根据测得的 SFC 色谱柱在 50 °C 下的压降 (ΔP) 估算所得）进行比较，外推获得 100% 甲醇（虚线）的相应值。水基测量结果在恒定压力下获得， CO_2 /甲醇的测量结果在压力 200-400 bar，恒定流速条件下获得。

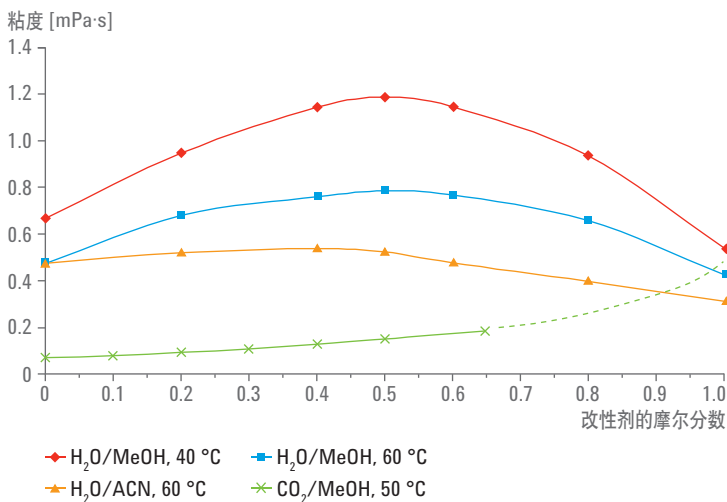


图 1.2 H₂O/MeOH、H₂O/ACN 和 CO₂/MeOH 混合物的粘度作为改性剂摩尔分数的函数，色谱柱的压降与粘度直接相关

20 世纪 90 年代后期，重新流行使用亚 2 μm 颗粒，但这些填料大多为薄壳型且通常填充于毛细管中，随后出现了小粒径的表面多孔颗粒。2003 年，安捷伦推出了首款全多孔亚 2 μm 颗粒。根据 van Deemter 方程，此类颗粒与 5 μm 颗粒相比，在柱效相同的情况下，能够使分析速度提高九倍或十倍。

这些较小的颗粒产生的压降 (ΔP) 远大于老式较大的颗粒，因为 ΔP 与 d_p^2 成正比（在柱效相同的情况下）。在 HPLC 中使用亚 2 μm 颗粒有时需要泵能够耐受 1000 bar 以上的压力。在 SFC 中，CO₂/改性剂混合物的粘度明显低于水性流体，如图 1.2 底部曲线所示。那么，即使在更高的流速下， ΔP 值也远低于 HPLC。在 SFC 中，即使在柱长 100 mm 的色谱柱中使用 1.8 μm 颗粒，压降超过 400 bar 的情况实际上也是不常见的。实验在出口压力恒定但流速不同的条件下，绘制了几根 3.5 和 1.8 μm 颗粒填充色谱柱的 ΔP 与改性剂百分比的关系图。结果分别如图 1.3 和图 1.4 所示。

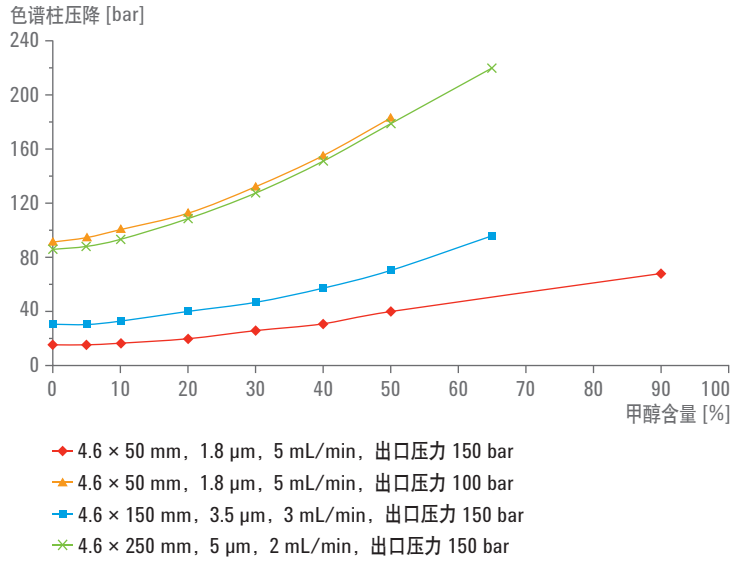


图 1.3 当 CO₂ 中包含不同浓度的甲醇时, 几根 ZORBAX RX-Sil 色谱柱在 50 °C 下的压降 (扣除了管路造成的 ΔP)

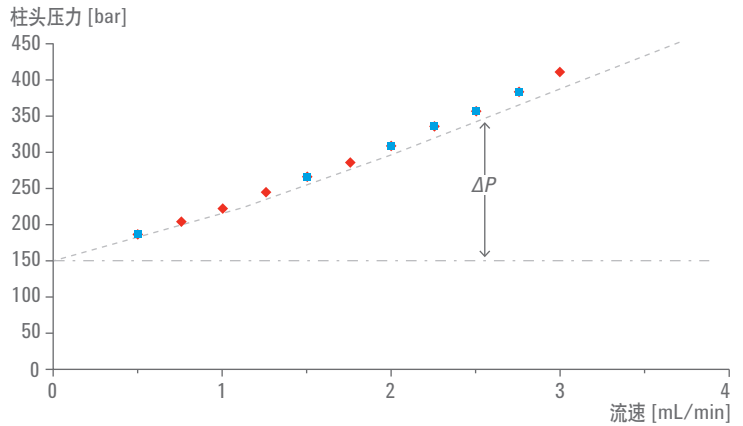


图 1.4 使用 3 × 100 mm × 1.8 μm ZORBAX RX-Sil 色谱柱在含有 22.5% 甲醇的 CO₂、150 bar 出口压力和 50 °C 条件下得到的柱头压力, 最佳流速大约为 1.8 mL/min

简而言之，采用亚 2 μm 颗粒的现代 HPLC 通常在 40 至最高 70 $^{\circ}\text{C}$ 的高温下操作，以便降低粘度和压降。SFC 通常在 40 至 60 $^{\circ}\text{C}$ 之间操作，但原因则截然不同。根据经验，在流速高出 3 至 - 5 倍的情况下，SFC 中的 ΔP 仅为 HPLC 中 ΔP 的 1/3 到 1/5。在 SFC 中实际上不需要使用超高压泵，除非使用以亚 2 μm 颗粒填充的长色谱柱或在极高的流速下操作。

1.2.3 与反相 HPLC 相正交

次要组分通常与主要组分具有化学相似性，使用任何一种技术时，次要组分均在主要组分附近甚至紧靠着主要组分洗脱出来。对于个别样品，也许需要使用不同选择性的多种方法。然而，人们通常使用两种不同的反相方法，均采用 C18 固定相以分离此类共洗脱物。如同正相 HPLC 或 SFC 那样的正交技术提供了一种出色的替代选择，能够显著降低丢失此类共洗脱化合物的风险。SFC 应该是优选的技术，因为它更快速、更少使用有害改性剂，而且产生的有毒废液也少得多。

SFC 中任何一组色谱峰的保留顺序都与反相 HPLC 中的保留顺序大致相反，图 1.5 所示是一个典型的示例¹⁵。其中各溶质代表了多种官能团，包括磺胺类、皮质类固醇和氧杂蒽。这种选择性上的重大变化非常有用，具有不同化学相互作用的两种分离机制有很好的效果。在信号未能及时返回基线时，主要组分通常会出现拖尾峰。如果次要组分共洗脱或在主要组分的尾部洗脱出来，就很难（或不可能）对次要组分进行任何精度的定量分析。但是，如果次要组分在主要组分之前（基线平坦处）洗脱出来，则可能更容易地获得具有更高精密度和准确度的定量分析结果。

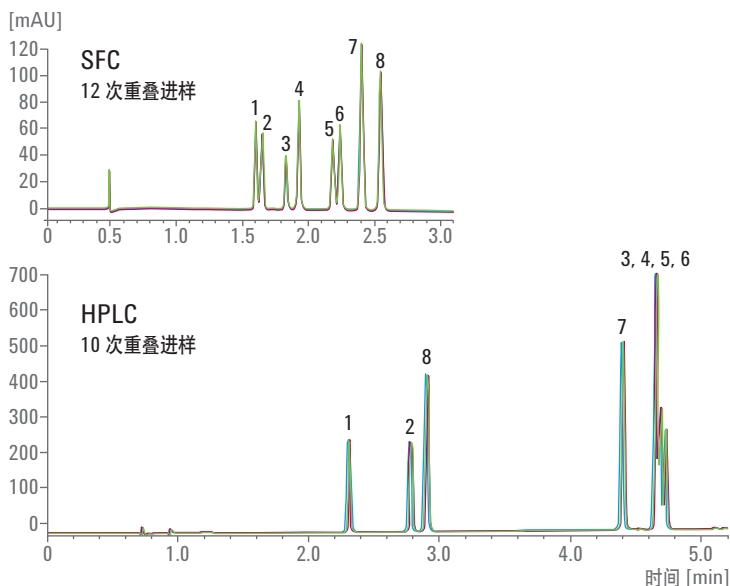


图 1.5 SFC 与反相 HPLC 互为正交。比较下列混合物的 SFC 和 HPLC 色谱图：1. 咖啡因，2. 茶碱，3. 可的松，4. 强的松，5. 氢化可的松，6. 泼尼松龙，7. 磺胺甲基嘧啶，8. 磺胺噻恶琳。SFC 条件：4 mL/min，含 5% 至 25% 甲醇的 CO₂，3 min。出口压力 150 bar，采用 4.6 × 150 mm × 5 μm RX-SIL 色谱柱。HPLC 条件：1.5 mL/min，10% 至 90% 甲醇水溶液，4.5 min，40 °C，采用 4.6 × 150 mm × 2.7 μm Poroshell C18 色谱柱¹⁵。

安捷伦分析型 SFC/UHPLC 复合系统能够在几分钟内实现反相 HPLC 与 SFC 之间的快速来回切换。用户可以对操作序列进行编程，自动完成此类比较。这有利于对同一样品连续运行两种方法，使用截然不同的选择性（一种为反相，另一种为正相）并在很短的时间内完成。图 1.5 所示的色谱图仅作为示例。执行六次 SFC 分析，然后执行六次反相 HPLC 分析，再执行四次 SFC 分析和四次反相 HPLC 分析，最后执行两次 SFC 分析。然后将所有的 SFC 和反相 HPLC 分析结果叠加在一起。

1.2.4 分离手性及其他异构体

反相 HPLC 主要依靠疏水作用的差异来分离化合物。正相技术则主要依靠极性-极性相互作用，并可更好地区分形状的细微差异，尤其是极性官能团周围的分子形状。因此，正相 HPLC 的典型应用领域是异构体的分离，此类分离是基于分子形状的差异来实现。

大多数药物都具有手性，意味着它们具有成对的异构体，彼此互为镜像，称为对映异构体。包含相同浓度对映异构体混合物称为外消旋体，以前的合成方法几乎总是得到外消旋体。然而，各种对映异构体通常具有独特的生物活性。因此，美国食品药品监督管理局及许多其他监管机构要求全面测试每种纯对映异构体。纯对映异构体的药物还可能再次获得专利授权，因为纯对映异构体通常药效更快，且毒性低于以往的外消旋体。基于这些因素，人们对通过色谱分离对映异构体的需求日益增长。

过去 20 年来，已证实 SFC 在分离对映异构体及其他异构体方面优于正相 HPLC。事实上，许多大型制药公司均已关注 SFC 在这些应用中的潜力。例如，Craig White⁶（当时运营一家分析型和半制备型纯化服务实验室）在一年中分析了实验室收到的所有手性样品，共计数百个样品。在 96% 的分离中，均证实 SFC 在分析速度和分离度方面更加出色。事实上，SFC 随后被指定为分析型和半制备型手性分离的主要技术，而 HPLC 仅用于评估 SFC 的疑难样品。

类似的是，Mohammed Maftouh⁷ 对 500 种专利药物进行了评估，通过 SFC 仅用四种过去的（涂覆、未键合）手性固定相即可获得 95% 的分析成功率。采用同一系统对一组 98 种市售药物进行分析，获得了 98% 的成功率。自 2006 年以来，他们使用 SFC 作为初筛方法，采用毛细管区带电泳 (CZE) 作为备用方法。Pfizer 和 Merck 对于 SFC 在手性分离领域的价值也都发表了类似但稍欠明确的看法。

1.2.5 效率更高

在 SFC 中， ΔP 值较低，使其易于获得较高的柱效。色谱柱可以（并且通常）串联使用，通过这种方式，可将相同或不同的固定相结合起来。手性与非手性色谱柱均可联接。在最早的示例中¹⁵，将柱长均为 200 mm 的 11 根色谱柱联接起来得到长 2.2 m 的色谱柱（5 μm 颗粒），在 400 bar 的系统下能够获得 220000 以上的塔板数。在另一个示例中，将多达五根不同的手性柱联接后可得到伪通用固定相¹⁶。

或者，使用亚 2 μm 颗粒填充的长色谱柱可获得相当高的柱效，因为压降很低。安捷伦分析型 SFC 系统能够在 600 bar 条件下运行，它支持采用柱长大约为 0.5 m 的色谱柱，理论上能够获得高达 139000 的塔板数。

1.2.6 运行成本更低

SFC 中使用的 CO_2 大多数为食品或饮料级，由于可供人们食用，因此其纯度受到监管。碳酸饮料无所不在，其配送设施几乎遍布全球，且消费量巨大。因此， CO_2 比较廉价。在高压 (50 至 70 bar) 钢瓶中 (25 kg)，液态 CO_2 的价格仅为 1 美元/千克。SFC 中所用的典型流速为 1 至 3 mL/min，意味着一瓶气能够持续使用大约 200 小时。 CO_2 还提供杜瓦瓶和贮罐配置，两种形式均在 -30 至 -40 $^{\circ}\text{C}$ (20 至 30 bar) 条件下低温操作。杜瓦瓶一般可容纳大约 150 kg，但是不如钢瓶或贮罐方便。杜瓦瓶装 CO_2 的成本与钢瓶大致相同，但持续使用时间要长 6 倍。贮罐通常仅在机构致力于大规模使用 SFC 时才会安装。贮罐装 CO_2 的成本可下降一个数量级，达到 0.10 美元/升。其成本与庚烷相比更具优势，购买四瓶庚烷 (4 升/瓶) 的成本可超过 70 美元/升。

杜瓦瓶和贮罐都需要使用升压泵或气体输送系统将压力由大约 20 bar 升至 70 bar 以上，从而使往复泵能够泵送气体。采用贮罐时， CO_2 通常通过管路连接至机构内的多个位置。

在 SFC 中，很少使用昂贵且有毒的乙腈。代之以廉价的醇类。而且，典型操作由较低的 %B (如 5%) 开始，但很少超过 40%。因此，大多数流动相都是廉价的 CO_2 。

在色谱分析结束时，流动相会减压并出现两相形态，一相为气态，另一相为液态。气态 CO_2 会被排出，而液态改性剂将被收集到捕集阱中。由于大多数流动相都会蒸发，因此会大大减少废液的体积。产生的废液毒性也较小。

人工成本是色谱运行过程中最重要的一项费用。由于较高的扩散系数决定了在色谱柱尺寸相同的情况下 SFC 能够采用比 HPLC 更高的流速和更短的运行时间，一个操作者在同一时间段内能够完成三至五倍的更多工作量。

1.2.7

环境友好

尽管使用 CO₂ 作为主要流体，SFC 仍可视为一种环境友好或绿色技术，因为 CO₂ 能够从其他行业中回收利用。在 HPLC 中，流动相通常在使用后燃烧生成新的 CO₂。使用低浓度醇类代替乙腈能够降低毒性。由于 CO₂ 会在系统末尾处蒸发，因此大大减少了处置大量有毒废液的昂贵成本。

1.3

SFC 能够分离哪些化合物

根据经验，任何可溶于甲醇或低极性溶剂中的化合物均可通过 SFC 得到良好的分离¹⁷。相反，需要使用完全水性的缓冲溶液来溶解的化合物可能很难通过 SFC 进行分离。此现象不应理解为 SFC 无法兼容流动相中的水、水性样品或许多生物样品。关于以水作为 SFC 流动相的组成部分，可参阅相关综述¹⁸。

尽管认为 SFC 不适用于较大的生物分子（如蛋白质），但实验中已经洗脱出高达 40 聚体的肽¹⁹⁻²¹。而且，仅有一个氨基酸位置不同的肽异构体可在很短的时间内得到良好的分离^{22,23}。这是一个活跃的研究领域，如果肽能够被洗脱出来，那么相比于 HPLC 就有可能显著改善色谱分析速度。

在 SFC 的早期，大多数应用都涉及分离相对非极性的溶质，通常为同系物，例如硅油、表面活性剂、蜡质、脂类等分子量过高或热不稳定性过强而无法通过高温气相色谱 (GC) 进行分析的物质。大多数此类工作都使用纯 CO₂、压力程序和火焰离子化检测器 (FID)。这一状况在 20 世纪 80 年代后期慢慢改变，在首批手性 SFC 分离成果发表后，此改变尤为明显²⁴⁻²⁶。

过去 15 年来，SFC 已广泛应用于制药行业，用于快速洗脱似药物类小分子，尤其适用于手性分离。最近随着稳定性的改善，特别是随着 UV 灵敏度的提高，SFC 开始重新扩展至更广泛的应用领域。

SFC 的应用领域与各种形式液相色谱的应用领域对比如图 1.6 所示。由图中可以看出，采用各种流动相组合的 SFC 涵盖的应用范围几乎与各种形式的 HPLC 完全相同，唯一未能明显涵盖的领域是离子色谱。

SFC 相对于 HPLC 更适合哪些应用?

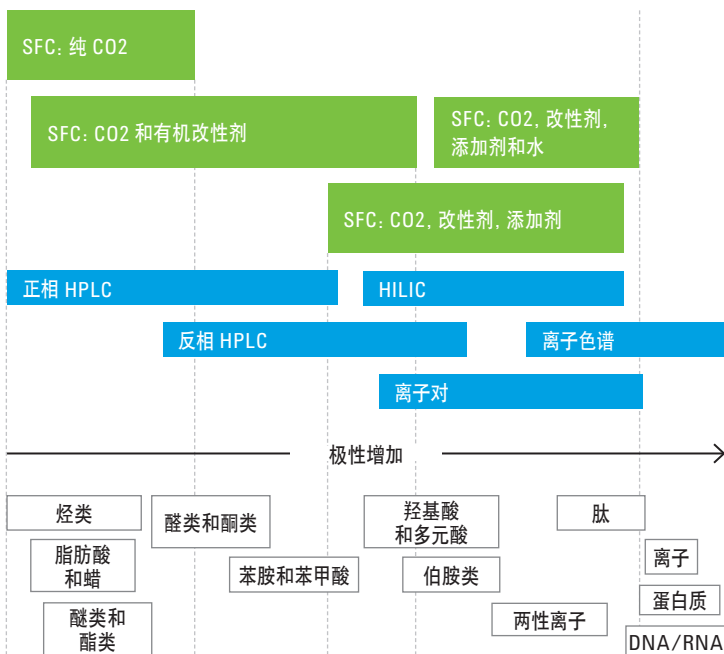


图 1.6 各种形式的 SFC 与 HPLC 子设备类的应用领域对比，表明 SFC 基本涵盖了与 HPLC 相同的应用范围

1.3.1

SFC 中保留值特性

正相 SFC 涉及溶质与极性固定相之间的极性-极性相互作用。空间位阻在 SFC 中非常重要。同一分子内大部分被非极性基团包围的极性官能团容易导致该分子在极性固定相上的保留值大大减小（相比未受阻的极性官能团的分子而言）。例如，在同系物苄胺、二苄胺和三苄胺中，碱性随氮原子取代程度的增加而增加²⁷。因此，三苄胺的碱性和极性均强于二苄胺，而二苄胺的碱性和极性则依次强于苄胺。在该同系物中，分子量也随着苯基取代数目的增加而增加。分子越大，则保留性趋于更强。如果极性和分子量为决定因素，则极性色谱柱上的洗脱顺序应当为苄胺、然后是二苄胺、最后三苄胺。然而，三苄胺几乎未得到保留，二苄胺的洗脱顺序排第二，而分子最小且碱性最弱的苄胺的保留性能最强。很明显，氮原子上增加的每个苯基取代基逐渐阻碍氮原子上的孤电子对，接近极性固定相并与其发生相互作用。由于类似的原因，环中的氮原子容易与极性固定相发生弱相互作用，几乎不需要添加剂来获得良好的峰形。

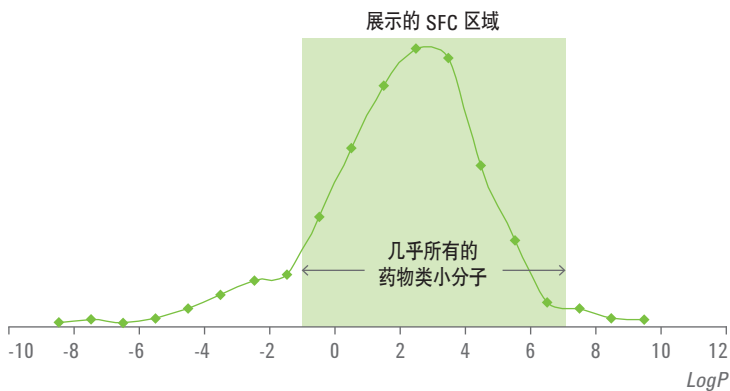
固定相的选择对分析速度具有重要影响，某些固定相的保留性能远强于另外一些。如果两种不同的固定相均可针对某一分析问题提供合理的解决方案，应优选采用较低浓度改性剂的解决方案，因为改性剂浓度越低，则粘度和色谱柱压降也会越低。

1.3.2 LogP

药物开发中广泛用于衡量亲脂性的指标是 $\log P$ ，它是化合物在辛醇与水之间分配系数 (P) 的对数值。辛醇是一种醇，其羟基头部具有中等极性，而 C8 骨架则是非极性的。辛醇与水不混溶，彼此接触时会形成两个不同的相态，目标化合物分子可**选择性**地分配于其中一个相态中。

$\log P$ 为正表示药物优先分配于辛醇中， $\log P$ 为负则表示其优先分配于水中。Lapinski 提出了一套有效的药物开发法则，称之为**五规则**²⁹。其中一条规则称，要作为有效的口服药物，化合物的 $\log P$ 应当介于 0 到 5 之间。当 $\log P$ 为 2.5 时，相对于分配至水中的各个分子而言，将有 300 多种分子分配至极性较低的辛醇中。

5000 种市售药物的实际 $\log P$ 值的分布如图 1.7 所示，其中表明绝大多数药物都介于 -1 到 6 之间，平均值大约为 3，与 Lipinski 的建议值一致。 $\log P$ 小于 -2 到大于 7 范围内的溶质均可使用基于 CO_2 的流动相进行洗脱和分离。因此，SFC 非常适用于洗脱和分离似药物类小分子。



◆ 注射剂、肽和蛋白质

图 1.7 5000 种市售药物在辛醇与水之间分配系数对数值 ($\log P$) 的曲线，图中表明绝大多数药物仅具有中等极性，非常适合采用 SFC 进行分析。

过去的经验提出 SFC 不适用于需要水性缓冲环境的化合物，这一经验被误解为 SFC 仅适用于非极性溶质，这是不正确的。许多有机物在水中的溶解性非常差 ($\log P$ 远大于 5)，这使得它们很难成为候选药物，因为它们会永久吸附到脂肪组织中而不会与相应的生物受体发生相互作用。药物开发中的一项重要工作是提高水溶性，从而降低化合物贮存在脂肪组织中的可能性。这点也可能被误解为建议似药物类分子必须极易溶于水（和生物体液）中。这种看法同样是不正确的。如果化合物水溶性过强，它们将很难作为候选药物，因为它们会快速地排出体外。提高水溶性通常意味着仅从不溶提高至微溶。此类化合物可能在细胞中存留较长的时间，与相应的受体发生相互作用。因此，此类化合物被视作具有中等嗜脂性或亲脂性。

五规则中的另外一条规则指出理想口服药物的分子量应当不大于 500^{28} 。图 1.7 展示了 $\log P$ 为 -2 甚至更低的几种药物。这些主要是蛋白质和大分子肽，它们因分子过大容易受到破坏而难以完整通过肠道，因此不适合口服，但是它们可进行注射。此类化合物基本上无法采用 SFC 进行分离。

1.4 这一名称的含义

“超临界”中的前缀——超字通常会令人产生很多联想，这似乎表明越界时将会发生什么特殊的现象。然而，超仅仅是指之上而已。类似地，临界也很骇人，通常会受到误解。临界点是指某个温度和压力点，超过该点后只会存在一种相态。超临界就是指超出临界点之上。

超临界不可视为一种独立的物质状态。物质状态仅包括气态、液态、固态和等离子体态。超临界区属于过渡区，在这个区域中通过改变温度和压力可使气态转化为液态（反之亦然），而不是相临界点。

选用超临界流体色谱这个名称是令人遗憾的，因为它并未涵盖所有感兴趣的流体特性。所用的条件通常是亚临界状态，通常意味着压力高于临界压力但温度却低于临界温度。通常很难进行区分。当流体的定义改变时，保留值、密度、效率或线速度并不会发生突变。

显然，作者并不愿使用一个技术上不妥的名称并错误地使用“超临界”一词。然而，强调流体并非处于超临界状态会暗示这两种条件存在着根本的差异，这也是不正确的。这一混淆导致了許多不同名称的诞生，不过它们在本质上是相同的。

在1957年一次气相色谱会议的公开讨论中，Jim Lovelock 提出使用压缩的无机气体（如 SO_2 ）作为流动相进行强极性物质色谱分离。他提出临界态色谱的名称，但并没有开展实验。他有一封至今尚存经过公证的1958年的信件，其中介绍了他的看法。

Ernst Klesper 率先投入高压和高于其临界温度的流体作为色谱流动相³⁰，他使用氟碳流动相通过填充柱对吡啶进行分离。在有史以来的第一篇SFC论文中，他将其描述为高于临界温度的高压气相色谱。大量论文中所用的温度均高于临界温度，尽管压力很高，却仍低于临界压力。按照定义，该条件下的流体属于气体，该技术可称作（高压）气相色谱。然而，这一名称没有表达出该技术的性质。流体在此技术中充当溶剂，而在通常理解的气相色谱中，流动相只是惰性载体（即，并非溶剂）。

1966 年, Giddings 发表了有关湍流气相色谱和超高压气相色谱的论文^{31,32}。在多年后的另一篇论文中, 他将名称改为高密度气相色谱以试图将该技术与常规 GC 区分开来, 因为此技术中的流动相充当溶剂并且溶剂强度与密度成正比³³。有趣的是, 后两篇论文均使用了高达 2000 个大气压的压力, 这一压力大大高于如今称为超高效液相色谱的技术中所用的压力。

1967 年, Sie 和 Rijnders³⁴ 率先将该技术称为超临界流体色谱³⁴。这一名称好过将“流体”称作“气体”, 但暗示流体需要始终处于超临界状态才可表现出目标特性, 这点是不正确的。

1985 年, Caude 似乎已经提出亚临界流体色谱的名称³⁵。按照定义, 在高于临界压力但低于临界温度的条件下操作时, “流体”从技术层面来说属于“液体”。然而, 他们正确地推断出将其称为液体也容易产生混淆, 因为该流体处于高度可压缩状态, 需要采用特殊硬件(如泵)及有效提升和控制出口压力的方法。虽然术语“亚临界”继续得到广泛采用, 但许多人似乎认为亚临界流体与超临界流体的特性之间确实存在显著差异。

Olesik 自 1991 年起提出增强流动性色谱的名称, 成为一个独特的叫法³⁶。她还将其称作具有增强流动性的高效液相色谱, 采用 CO₂ 作为流动相的重要组成部分, 但通常只占 10 至 25%, 在高压但低于临界温度的条件下操作。流体保留了 SFC 所固有的一些较高的扩散系数、低粘度等特性, 但也保留了更多水性流体所固有的极性。“增强流动性色谱”是其他人称为亚临界流体色谱的延续。两个研究组均认为, 按照定义, 如果流体并非处于超临界状态, 那么它必然为液体或处于亚临界状态。

如上文明确指出的, 这些技术名称随时间不断地变化, 其目的都在于试图阐明其中所涉及过程的本质。然而, 这些新名称在某种程度上人为制造了边界或障碍, 而这些边界或障碍并不具有实际的化学或色谱意义。将“流体”称作“液体”或“气体”并未完整把握到该技术的本质。称为“流体超临界”也不能很好地描述相关过程, 因为按照定义, 该流体有时具有与亚临界相同的性质。

所有这些名称试图描述的内容中有几个一致的方面。首先，采用流体作为溶剂，并且可通过改变组成和/或密度（温度和压力）调节溶剂强度。其次，流体处于高度可压缩状态，需要采用特殊的泵和维持较高出口压力的方法。无论流体在任何特定温度或压力下的定义如何，这两个方面都真正适用于所有感兴趣的流体。

我希望说明的是所有这些名称描述的是同样的技术，并使用同样的硬件。*可压缩溶剂色谱*这个名称可能更好些，但现在要改变已经太晚了。我们已经有了太多的名称，只要采用 *SFC* 描述所有这些技术就足够了。

2.1 为什么使用 CO₂ ?

如今，几乎所有 SFC 应用中都采用经有机溶剂（有时是强极性添加剂）改性的 CO₂。CO₂ 作为优选流体是因为它：

- 方便易得
- 廉价
- 易达到临界点
- 相对安全
- 因可回收利用而被视作绿色流体，并且
- 能够与各种强极性改性剂混溶

2.1.1 可用性

许多流体都曾用作 SFC 中的主要流体³⁷。这些流体包括一氧化二氮 (N₂O)、卤代烃、氨 (NH₃)、二氧化硫 (SO₂) 和超临界水。有些流体至今仍在使用。有些流体具有危险性（一氧化二氮、氨）。尽管有几种流体具有特殊的地位，但没有一种流体的总体性能接近 CO₂。

全球饮料行业中使用了极大量的 CO₂，相关配送设施完善，甚至覆盖到相对偏远的地区。原材料是许多其他行业的废弃物，这些因素相结合确保能够以极低的成本随时供应 CO₂。

2.1.2 成本

配备多台 SFC 仪器的机构或执行重要半制备型 SFC 分离的用户通常会安装贮罐。此类贮罐可容纳数吨 CO₂，通常由大型罐车进行补给。在该规模下，CO₂ 成本仅为大约 0.10 美元/升。杜瓦瓶和不锈钢瓶装的成本则大约为 1.00 美元/升。几乎所有增加的成本都源于额外的处理费用，但其成本仍然大大低于最常用的溶剂。

2.1.3 纯度

SFC 级 CO₂ 在 20 世纪 80 年代后期到 90 年代初期开发出来，为新兴的 SFC 业务提供了高纯度流动相。此产品的推出顺应了当时的需求，因为订购市售工业级 CO₂ 钢瓶气时，送到的气瓶中往往会填充有少量玉米油（作者的亲身经验！）。另外，饮料行业中所用的 CO₂ 不锈钢瓶有时会重新填充水或过期啤酒，导致不锈钢氧化生成胶态铁颗粒，这些胶态铁颗

粒对色谱性能具有不利影响且很难清除。当时一般采用汲取管从钢瓶底部吸取液态 CO₂ 以最大程度减少所需的冷却功率。这意味着溶解在 CO₂ 中的所有物质都将伤害到色谱仪。20 世纪 80 年代后期，这些负面的经验促使人们开发出 ASTM 认证的保证纯度的 SFC 级 CO₂。这些产品至今仍 在 售。它通常以 30 磅铝制气瓶的形式运输，成本为大约 20 美元/升，这也使 SFC 操作成本的优势失效。此产品与其他等级产品的主要差别在于，每批次均经过纯度测试并出具分析证书以表明其符合特定的标准。当前可能除超痕量工作以外，似乎没有必要再购买此等级的产品。

散装 CO₂ 通常具有高纯度。大多数污染发生在流体重新包装到较小容器的过程中。如今供应状况已得到大大改善，高纯度工业级产品通常即可满足要求。许多等级产品均为纯度高于 99.99% 的 CO₂，饮料或食品级产品为便捷、安全的选择。

应当指出，安捷伦分析型 SFC 系统配备有强大的冷却器，具有使气瓶中的蒸汽液化的独特功能。因此，不需要使用由阀门延伸到气瓶底部上方的排放管或汲取管。通过使用气相而非液相（流体会在使用前蒸馏），任何不挥发性污染物都会被留在气瓶中。

2.1.4 易达到临界点

纯 CO₂ 的临界点在 31 °C 和 70 bar 以上的条件下即可轻松达到。这就意味着 CO₂ 能够在相对较低的温度和压力下压缩成高密度流体。处于相对较低温度下的高密度溶剂不易破坏温度敏感的不稳定化合物。只需适中的压力即可轻松获得高密度溶剂，不会带来显著的技术障碍和能源损耗。

2.1.5 安全性

2.1.5.1 CO₂ 的毒性

CO₂ 是人类呼吸产物之一，正因如此，低浓度条件下没有毒性。然而，高浓度二氧化碳可致命。人们不需要对实验室中的 CO₂ 过度紧张。许多便利店、餐厅和咖啡馆都具有与其软饮机配套的高压 CO₂ 气瓶。许多灭火器中也包含高压 CO₂，并且广泛分布于工厂和办公楼中。SFC 实验室中的 CO₂ 浓度经过精心计算，远低于会议室或影剧院中的常见浓度。实验室中很少直接储存大量 CO₂，因此不大可能发生大规模泄漏。

CO₂ 的密度大于空气，在通风不良的空间内易于积聚在地板附近。传感器和警报器应安装于靠近腰部高度处。氧气传感器无法提供所需的信息，因为在任何潜在危险的情况下，即使 CO₂ 处于危险水平时，氧气含量也可能接近正常值。

2.1.5.2

火灾和爆炸危险

在正相 HPLC 中，流动相通常由庚烷与另一种有机改性剂（如异丙醇）混合而成。特别是，庚烷高度易燃且蒸气可具有爆炸性。在许多司法管辖区域中，实验室中该溶剂的量是受限的。在 SFC 中使用 CO₂ 作为流动相的主要组分，其几乎不可能使流动相发生燃烧。

2.2

使用 100% CO₂

纯 (100%) CO₂ 的溶剂强度是其密度的函数。大约 1984 年至 1995 年之间，许多 SFC 工作都采用毛细管柱、火焰离子化检测器 (FID)，使用 100% CO₂ 作为流动相的等度或压力或密度程序³⁸。人们也开发出了几种填充柱的应用方法³⁷。在这些应用中采用纯 (100%) CO₂ 的压力或密度梯度以及火焰离子化检测器，尤其适用于分离较低极性的同系物（如硅油和表面活性剂）。压力或密度程序在很大程度上已经销声匿迹。

CO₂ 密度在宽范围内随温度和压力的变化如图 2.1 所示。在 40 °C 下，大部分密度变化仅发生在大约 70 至 110 bar 之间很窄的压力范围内。在此区域操作意味着很小的压力变化将导致密度和保留值发生较大的变化。随着温度提高，曲线趋向于平坦，对于压力来说构成了小角度的密度梯度。大多数压力程序均在高温下完成，因为如图 2.1 所示，在较低的斜率下更容易小幅改变密度。

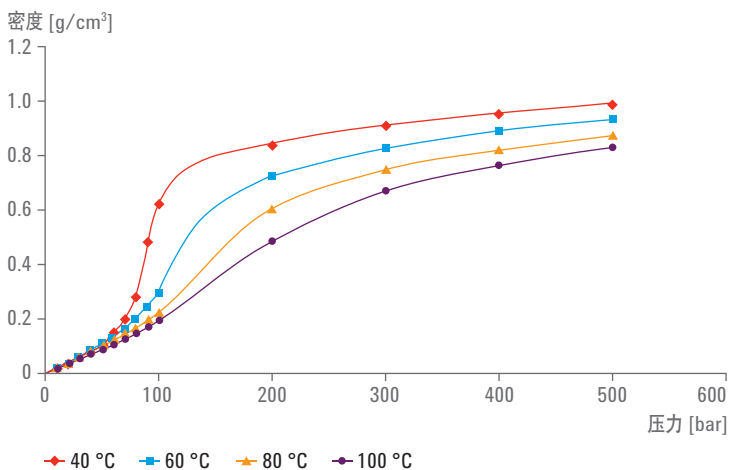


图 2.1 在四种温度下，纯 CO₂ 的密度是压力的函数。自上而下依次为：40、60、80 和 100 °C

在石油工业中，纯 CO₂ 仍然配合填充柱使用。出于环境考虑，人们在较低的温度下（如 28 至 40 °C），采用合适的硅胶柱对石油混合物进行分离以测定柴油燃料中的芳烃含量。该方法还可用于测定原油中的芳烃含量。在适当的条件下，所有脂肪族化合物都将以单个窄峰洗脱。烯烃也易于洗脱成单个峰，但经常在脂肪族化合物色谱图上形成拖尾。芳烃洗脱得到一系列色谱峰，各个色谱峰代表苯环数的增加。自 20 世纪 90 年代中期该应用已成为测定柴油燃料中芳烃的 ASTM 方法 (D5186)，是少数几种能够准确定量测定低含量芳烃的技术之一。

有一种相关的方法 (ASTM 7347)，使用配备阀切换的硅胶柱与银负载色谱柱能够更好地从脂肪族化合物中分离出烯烃。脂肪族化合物与烯烃在硅胶柱上得到部分分离，然后进入银色谱柱。脂肪族化合物将通过银色谱柱进入 FID。烯烃将发生高度保留，必须通过反吹从银色谱柱中除去。芳香族化合物不进入银色谱柱，而直接通过 FID 进行定量分析。这已经成为测定汽油中烯烃的重要方法。当前的大多数应用难以使用纯 CO₂ 作为流动相。

2.3 改性剂或共溶剂

如今，大多数 SFC 应用都采用极性相对较强的固定相以及经过有机溶剂（有时为其他强极性组分，如酸和碱）改性的 CO₂，这些用于改性的化合物称作*添加剂*。

2.3.1 甲醇

甲醇是到目前为止应用最广泛的改性剂，并且是与 CO₂ 完全混溶的改性剂中极性最强的改性剂之一。甲醇的优势包括：

- 易得
- 价格低廉
- 与 CO₂ 完全混溶
- UV 截止波长低（大约 205 nm）
- 毒性相对较低

2.3.1.1 甲醇/CO₂ 混合物的密度

过去，改变纯 CO₂ 的密度是改变弱极性溶质保留值的主要手段，因此改变混合物的密度应当也会对保留值具有相同的效果。几种甲醇 CO₂ 混合物的密度已经被测量出来^{39,40}。人们发现测得的密度随甲醇浓度的增加及压力的增加而提高，如图 2.2 所示。通过调节压力使密度保持不变，而在组成发生改变时，这些值可用于重叠方法分析密度和组成对保留值的影响。此类研究已表明密度的影响较小，但是一旦添加改性剂后，改性剂浓度对保留值的变化具有最重要的影响。然而，改性剂的极性越弱，则保留值受密度的影响程度越显著。

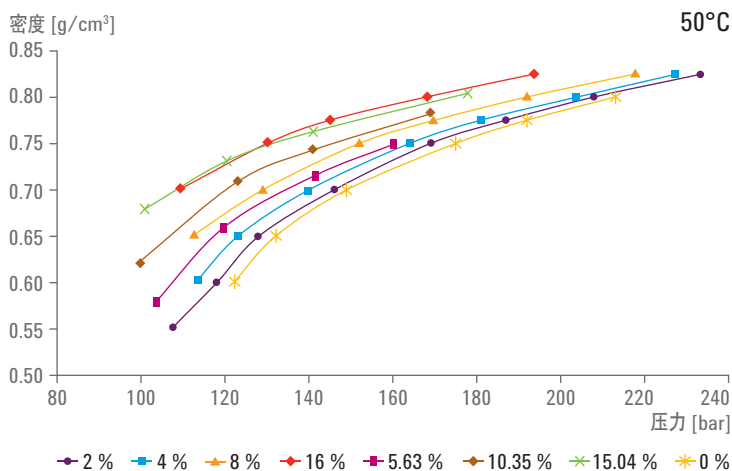


图 2.2 在 50 °C 下，MeOH/CO₂ 混合物的密度是压力的函数，纯甲醇的密度为 0.791 g/cm³。开放符号表示的数据摘自参考文献 39。实心符号表示的数据摘自参考文献 40

将方法中的 5 μm 颗粒换为亚 2 μm 颗粒时，色谱柱的压降将显著增加因此，色谱柱中的平均密度将改变。保留值和选择性都将明显改变。然而，这通常是副效应，如后续章节所示。

2.3.2 改性剂溶剂强度等级

几乎任何有机溶剂都可用作改性剂。它们的洗脱强度大致符合 Snyder 的 P' 洗脱强度等级^{41,42} 或针对硅胶的 Hildebrand 溶剂强度等级⁴³，这两种溶剂强度等级均是多年前在正相 HPLC 中针对硅胶洗脱开发而得。几种常用有机改性剂的值列于表 1.1 中。实际值已经随时间发生了变化。例如，与最初的看法相比，如今认为甲醇更接近于水。甲醇、乙腈、乙醇和异丙醇的最新 P' 值分别为 6.6、6.2、5.2 和 4.3。如果使用相同浓度的改性剂，则相对保留值往往符合表 2.1 所示的溶剂强度等级顺序，但也有例外。

改性剂	P'	Hildebrand 洗脱强度 (基于硅胶)
水	9	
甲醇	6.6	0.73
乙腈	6.2	0.5
甲氧基乙醇	5.7	
丙酮	5.4	0.47 - 0.53
乙醇	5.2	0.68
异丙醇	4.3	0.62
乙酸乙酯	4.3	0.38 - 0.48
四氢呋喃	4.2	0.53
二氯甲烷	3.4	0.32
二氯甲烷	3.4	0.32
四氯化碳	1.7	
庚烷, CO ₂	0	0.01
乙酸	6.2	
辛醇	3.4	

表 2.1 一些与 CO₂ 完全混溶的改性剂的 Snyder P' 值和 Hildebrand 值

在某一手性分离中⁴⁴，当改性剂由甲醇换为乙醇和异丙醇时，第二洗脱峰的保留时间将由 7.98 分钟增加至 8.32 分钟和 10.48 分钟，与预期结果一致，如图 2.3 所示。分离度实际上随保留时间的增加而降低。使用相同浓度的乙腈作为改性剂时，能够分离与上述相同的对映异构体对。最后一个色谱峰的保留时间大幅增加至 16.13 分钟，但分离效果得到显著改善。情况通常如此，因为乙腈是一种比大多数醇类要弱得多的溶剂。根据 Hildebrand 等级，所有三种醇类的值均高于乙腈，与图 2.3 所示的结果一致。显然，氢键对于 SFC 异常重要。

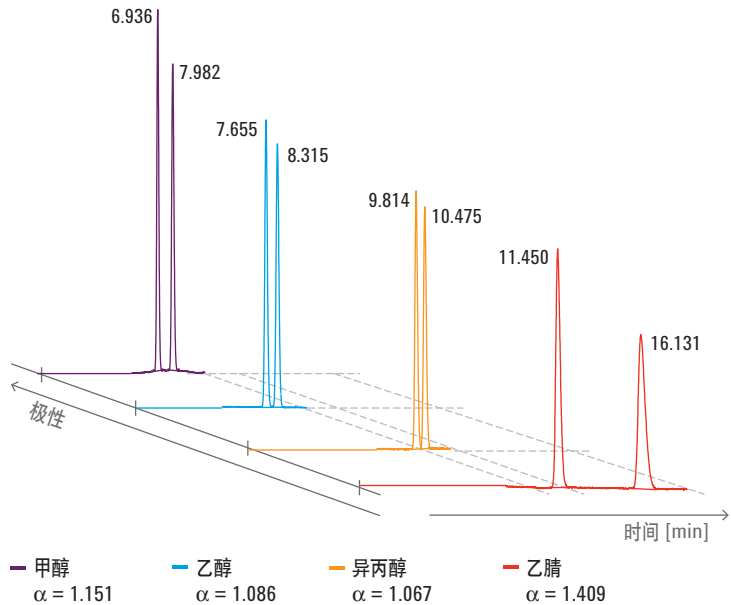


图 2.3 手性分离结果表明，根据 P' 和 Hildebrand 溶剂强度等级，保留时间随改性剂极性的降低而增加。根据 P' （而非 Hildebrand 溶剂强度）预测的结果，乙腈的极性比预期更低。除改性剂的成分以外，所有其他条件均保持不变

2.3.3 非线性溶剂强度

Snyder 的 P' 等级^{41,42} 假设流动相溶剂强度（以 P' 来衡量）为两种纯液体的摩尔分数的线性函数，参见公式 2.1，其中 x 为 A 的摩尔分数。

$$P'_{AB} = xP'_A + (1 - x)P'_B$$

公式 2.1 计算流动相溶剂强度的 Snyder 法。不适用于 SFC

因此，逐渐将流动相的组成由一种纯溶剂改为另一种纯溶剂应当与溶剂强度之间存在线性关系。然而，保留值（洗脱强度）为 %B 的非线性函数。在正相 HPLC 中，这种非线性可解释为由于改性剂 (B) 与溶质之间存在竞争吸附。

在 SFC 中， $\log k$ 对 %B 的曲线也是非线性的，如第 4 章“流动相变量对保留值和选择性的影响”所述。不过，SFC 中的解释则不同。

2.3.3.1 溶剂致变色染料

测量实际流动相溶剂强度（与洗脱强度相反）的一种方法涉及到溶剂致变色染料。此类染料吸收光谱中的 UV 顶点会根据溶解染料的溶剂的极性而改变。尼罗红就是这样一种染料。根据吸收最大值的波长计算得到的尼罗红能量等级 (E_{NR}) 与 P' 进行绘图，把 E_{NR} 与 P' 关联起来。

使用尼罗红作为溶剂致变色染料，所得到的纯溶剂数据显示于图 2.4⁴⁵。 E_{NR} 溶剂强度的相对顺序与 P' 值一致。尼罗红还可用于测量这些相同改性剂与 CO_2 构成混合物的极性^{45,46}。所得到的几个结果如图 2.5 所示。与 Snyder 假定的线性关系不同，测得的溶剂强度是改性剂浓度的非线性函数。由于不存在固定相，因此竞争吸附机制无法解释这种非线性现象。另外，在改性剂浓度为至少大于约 1% 的情况下，替换 %B 的 E_{NR} 能量等级可得到 $\log k$ 的线性曲线⁴⁶。

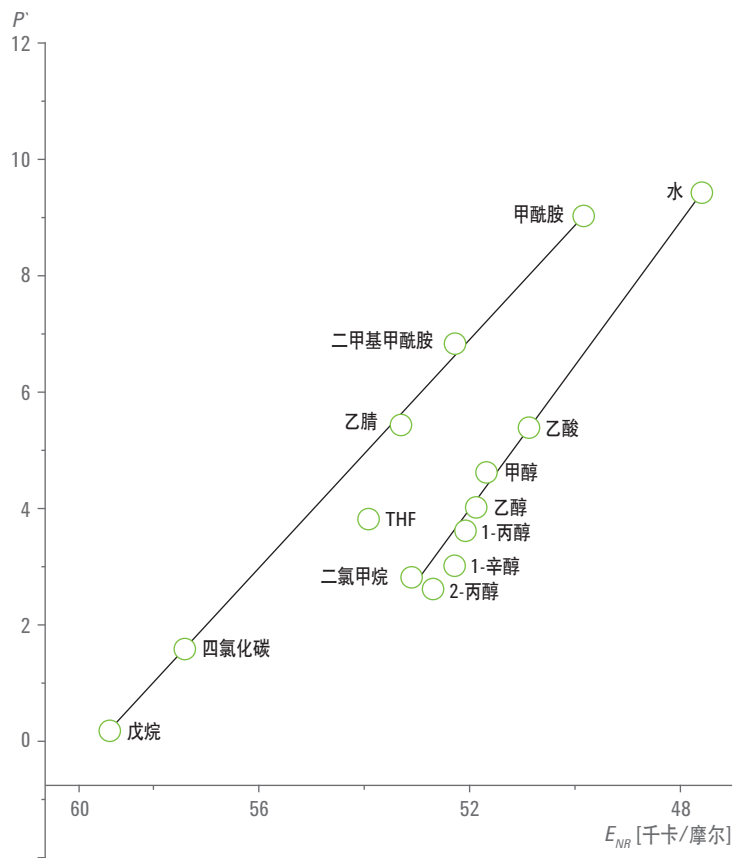


图 2.4 纯溶剂的 Snyder P' 等级与尼罗红溶剂强度等级之间的关系。请注意，根据 P' 等级来看，ACN 的极性强于 MeOH，而根据尼罗红等级，前者的极性则弱得多，这与图 2.3 所示的结果一致。

利用尼罗红测得的非线性溶剂强度

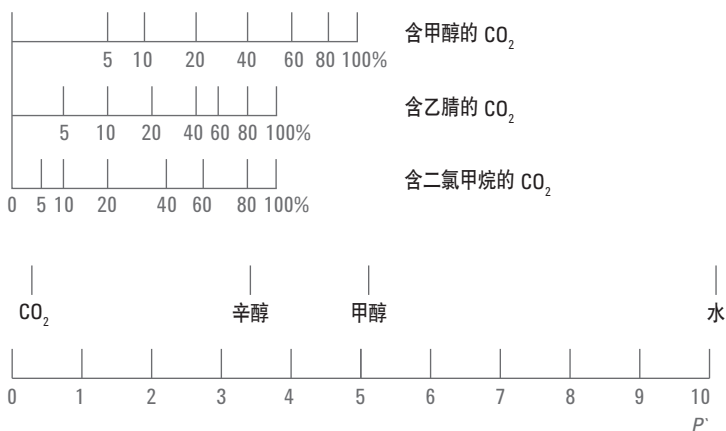


图 2.5 尼罗红还可用于测量 CO₂ 与有机溶剂混合物的溶剂强度。结果再次表明，ACN 的溶剂强度弱于 MeOH。请注意，溶剂强度与改性剂浓度之间主要为非线性关系

2.3.3.2 聚类

已取得的普遍共识是，极性改性剂分子会与 CO₂ 形成局部非均一的混合物。看起来，当改性剂的极性大大强于 CO₂ 时，极性改性剂分子将团聚在一起，尤其会在极性溶质分子周围形成团簇⁴⁷。溶质颗粒被溶剂化球包围，导致局部改性剂浓度高于体相流体中的浓度。这些团簇不适合用“胶束”来定义。

2.3.3.3 固定相上的吸附作用

示踪物脉冲 MS 实验结果表明向 CO₂ 中最初添加的第一种少量极性改性剂就导致改性剂分子大量吸附于极性固定相上。事实表明，大约 1% 的甲醇即可使多层改性剂覆盖到二醇基色谱柱上⁴⁸。在更高的浓度下，额外吸附的量相对较少。被改性剂覆盖往往会改变固定相的化学性质。

同时，多个单层 CO₂ 也可发生吸附⁴⁹。因此，在极性固定相上有大量高密度改性后的流体，其组成取决于温度、压力和组分⁵⁰。这些影响尚未得到详细研究。

2.3.3.4 利用改性剂改变选择性

表 2.2 中所列的洗脱强度绝对值仅是溶剂强度全貌的一部分。Snyder 还以乙醇、二氧六环和硝基甲烷在 82 种溶剂中的 Rohrschneider 气-液分配系数为基础设计了一张溶剂选择性分类图^{41,42}。其中假定范德华力是普遍存在的。因此，他将数据绘制在三角图上，三角形的各条边分别表示溶剂与质子供体、质子受体或偶极子发生相互作用的能力。简化结果如图 2.6 所示。在组内溶剂趋于堆积在一起，Snyder 将其分为八组系列溶剂，各组溶剂具有相似的选择性。在一个选择性系列中换用不同的改性剂并保持改性剂的 P' 不变，将不会显著改变绝对保留值，但会改变选择性。换句话讲，如果一种改性剂无法使密切相关的化合物得到充分分离，可尝试其他溶剂系列中的改性剂溶剂，而不要使用同一系列中的其他改性剂。

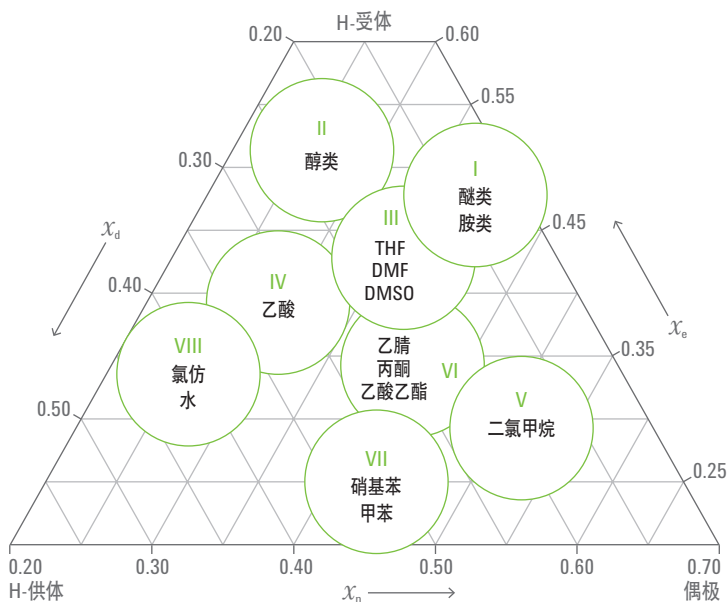


图 2.6 Snyder 的溶剂三角，将溶剂分为八个系列。要显著地改变选择性，可换用不同溶剂系列中的改性剂。

添加剂	备注
异丙胺	与某些酮类发生反应
二甲基乙胺	具有挥发性且有恶臭味
三乙胺	由于存在空间位阻，有时不太有效
许多其他胺类	
氨	相对较新
烷基叔铵盐	
烷基磺酸	
三氟乙酸	
甲酸	
乙酸	
柠檬酸	
醋酸铵	
甲酸铵	
水	

表 2.2 广泛应用于 SFC 中的添加剂

2.4 添加剂

使用 CO₂ 与诸如甲醇或乙醇等改性剂组成的二元混合物进行洗脱时，许多强酸和强碱以及大多数两性化合物都无法洗脱出来或洗脱得到的峰形很差。溶于改性剂中的强极性添加剂的少量加入^{51,52} 通常能够显著改善峰形，如图 2.7 所示。添加剂的浓度通常介于改性剂的 0.1% 至 2% 之间。

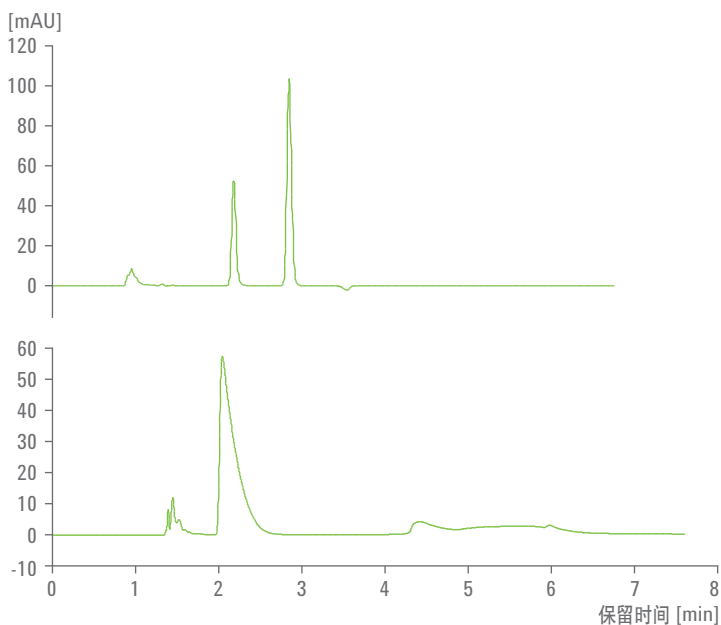


图 2.7 使用药物阿得拉 (Adderall) 作为示例，展示添加剂对峰形和洗脱效果的影响。阿得拉是安非他命对映异构体的非外消旋混合物，其中包含过量的 D 型对映异构体。下方色谱图展示了不加添加剂时的洗脱结果；上方色谱图展示了添加三乙胺时的洗脱效果。所有其他条件均不变。

通常，强酸添加剂有助于改善强酸的峰形，而强碱添加剂则有助于其他强碱的峰形。然而，这仅是一般情况，有时会出现相反的状况⁵³（酸用作碱的添加剂，反之亦然），原因可能类似于 HPLC 中的离子对。两性溶质通常最难洗脱，可能需要多种离子或对离子。常用添加剂的列表如表 2.2 所示。添加剂能够：

- 抑制溶质电离
- 覆盖固定相的活性位点，并
- 与溶质形成中性离子对

强烈吸附到极性固定相上的添加剂⁵⁴有时会形成接近单层，甚至在浓度只占改性剂 1% 以下（远远低于总流动相的 1%）时也会如此。添加剂最初导入流动相后，在几分钟内通常没有添加剂被洗脱出来，在改性剂浓度较低的情况下尤其如此。应注意等待足够长的时间，使添加剂浓度达到平衡。

添加剂从流动相中除去后不一定能够淋洗下来。使用添加剂会永久性⁵⁵、至少暂时性改变色谱柱特性。事实往往是，即便从流动相中除去添加剂后，在一定时间内峰形仍然可得到改善，但其性能可能逐渐下降至不含添加剂时观察到的初始结果。此类明显不可重现但可预测的行为会使筛选复杂化，或需要使用多组相同的色谱柱，例如，一组色谱柱配合酸性添加剂使用，而另一组色谱柱则配合碱性添加剂使用。应避免在酸性与碱性添加剂之间来回切换而不进行中间清洗。

色谱柱在使用添加剂（特别是胺类）后必须经过仔细清洗才可进行储存。在作者的实验室中，使用碱性添加剂后，会依次用大约 10 倍色谱柱体积分含 40% 甲醇的 CO₂、含 40%（甲醇 + 0.2% 乙酸）的 CO₂ 以及含 40% 甲醇的 CO₂ 对色谱柱依次进行淋洗。乙酸作为一种相对较弱的酸可置换或中和固定相表面上吸附的碱性添加剂，而其自身通常用 CO₂/甲醇即可淋洗下来，得到不含吸附态极性添加剂的、几乎裸态的固定相。

其他添加剂有时可以用纯有机溶剂进行脱附。在极端情况下，可依次使用异丙醇、异丙醇-水混合物、异丙醇，以去除极性添加剂。

色谱柱在储存之前应当至少用 3 倍至 10 倍色谱柱体积的、含 40% 改性剂的 CO₂ 进行淋洗。清洗之后，将色谱柱以润湿或干燥状态进行储存。在作者的实验室中，会将色谱柱减压至大气压，即色谱柱不再填充以液体溶剂。然后，将色谱柱从系统中取下后，储存时无需在色谱柱两端插入堵头。

近年来，人们致力于开发不需要在流动相中加入添加剂的固定相。这些固定相将在第 3 章“固定相”中予以更详细的讨论。

添加剂会干扰质谱 (MS) 检测，当其具有弱挥发性时尤其如此。使用质谱仪进行检测时，选择挥发性较强的添加剂（如乙酸铵或甲酸铵，甚至氢氧化铵）很重要。

2.5 添加水以扩展溶质极性

正相 HPLC 不适用于水样，当流动相为非极性时尤其如此。少量水（来自改性剂中的痕量水或水性样品）往往优先吸附到极性固定相上。再平衡过程往往很慢，以前有些报告指出需要使用最高 1000 倍色谱柱体积才能实现再平衡。因此，通常应避免分析水性样品。SFC 则不存在这些问题，与己烷或庚烷相比弱极性的 CO_2 能够与极性更强的溶剂混溶。这些极性更强的改性剂有助于对少量水的溶剂化。

水在纯 CO_2 中的溶解度仅可达到 1% 的十分之几。然而，当甲醇与 CO_2 混合时，可添加至少 10% 的水至甲醇中，不会显著影响强极性化合物的色谱峰。此时仍然可加入添加剂。添加乙酸铵和甲酸到含 10% 水的甲醇溶液，可在氨基柱上快速分离核酸与核苷⁵⁶。平衡时间很短。与单纯使用甲醇相比，水的加入能够分离极性更强的溶质。另外，水性样品可采用甲醇按 3:1 或 4:1 的比例进行稀释并直接进样，而不会影响保留时间或峰面积重现性。

3.1 材料

绝大多数 SFC 应用使用的是全多孔、纯度极高的未键合硅胶或键合到同样全多孔硅胶上的固定相。不存在颗粒强度的问题，因为颗粒不会经受超高压或高压降。仅有几篇报告使用了其他材料，例如多孔薄壳整体式色谱柱或氧化锆基颗粒。

如今，全多孔颗粒几乎都是直径为 1.7 至 5 μm 之间的球形颗粒。颗粒越大则用得越少，即使半制备型规模最多也只采用内径为 5 cm 的色谱柱。可提供最佳保留值和峰形（至少对于极性溶质）的颗粒通常为全多孔、孔径较小、表面积较大的颗粒，其孔径介于 60 和 120 埃之间，且表面积大于 350 m^2/g 。

3.2 非手性键合相

3.2.1 非极性固定相

许多早期的 SFC 成果采用较非极性的溶质，能够在非极性色谱柱（例如 C18）上实现最佳分离。少数研究人员将该成果视作反相 SFC，采用 C18 或类似固定相以及中等极性的改性剂进行分离时尤其如此。然而，流动相通常主要包含 CO_2 和溶剂强度类似于庚烷的高度非极性溶剂，并混合以极性较强的改性剂。改性剂浓度几乎总是按程序逐渐提高。因此，流动相按由低到高的极性程序变化，按定义并非为反相。

反相 HPLC 很明显是得到无数人采用的最主要的色谱技术之一，最常与 C18 配合使用。因此，市场上提供有许多此类高质量色谱柱。这些色谱柱也可用于 SFC。C18 固定相很适合分离甘油三酯、表面活性剂、硅油、类胡萝卜素、其他萜类及许多具有长脂肪链的化合物。极性溶质一般很少得到保留且峰形通常很差。

3.2.2

极性固定相

SFC 一般按照正相技术进行操作，其中使用极性固定相，且流动相按极性由低到高的梯度进行改变。尽管 HPLC 最初也是一种正相技术，但在手性分离和旧版药典方法以外的几乎每个应用领域中，其早已被反相技术所取代。后来，直到最近，色谱柱制造商已经很少致力于开发更新的极性固定相。

传统的极性正相固定相包括未键合硅胶、氰基、氨基和经典的二醇基等多种形式。咖啡因、茶碱和可可碱混合物的色谱图展示了 C18、氰基、未键合硅胶、氨基和二醇基固定相的选择性差异，如图 3.1 所示。这些具有中等极性的化合物在非极性 C18 柱上几乎不发生保留，即使在较低的甲醇浓度 (8%) 下也是如此。相比之下，它们在相同条件下的氰基柱上可得到良好的保留和分离。未键合硅胶柱的保留性能更强，需要使用较高的改性剂浓度 (18%) 才可获得相近的保留时间。选择性与氰基柱类似。氨基柱实际上形成了相反的洗脱顺序 (按 1、3、2 而非 1、2、3 的顺序洗脱)，但化合物 2 与 3 之间的分离度仍然不够理想。二醇基固定相的保留性能略强于氨基固定相，色谱峰洗脱顺序并未逆反，但由于选择性不同，色谱峰的分离度稍好。这些色谱图表明仅仅键合相的成分不同即可导致相对保留值发生显著变化。此处展示的色谱图是在多年前采集得到的，使用了相同的高纯度硅胶基材料。然而，尽管现代二醇基柱更类似于未键合硅胶柱，这些结果同样能够代表现代的结果。

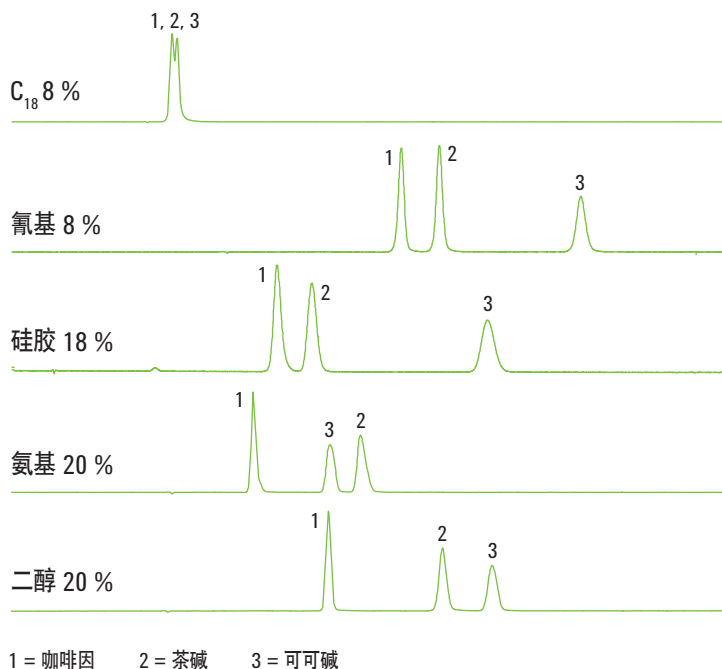


图 3.1 咖啡因 (1)、茶碱 (2) 和可可碱 (3) 在各种固定相上的保留时间和选择性

SFC 和相互作用的亲水性液相色谱 (HILIC) 重新引起了色谱柱制造商开发新型极性固定相的兴趣。HILIC 色谱柱看起来类似于未键合硅胶柱，但有时称作二醇基柱。

大多数创新都来自试图满足 SFC 用户特有需求的小色谱柱制造商。如第 2 章“流动相”中所述，通常有必要向流动相中加入添加剂，对于脂肪胺溶质而言尤其如此。许多乙基吡啶固定相专为分离胺类而开发出来，其通常能够最大程度减少或消除添加剂的使用。制造商还针对在不用添加剂的情况下分离酸类开发出了其他专利固定相，这些新型固定相往往比经典的极性固定相具有更强的保留性能，需要更高的改性剂浓度，这使它们不太令人满意。较常用的固定相的部分列表如表 3.1 所示。

安捷伦	其他供应商
RX-SIL (5, 3.5, 1.8 μm)	乙基吡啶 (5, 3, 1.7 μm)
SB-CN (5, 3.5, 1.8 μm)	Premier (5, 3 μm)
己苯基 (5, 3.5, 1.8 μm)	二醇 (5, 3, 1.7 μm)
HILIC (5, 3.5, 1.8 μm)	许多其他产品
SB-C18 (5, 3.5, 1.8 μm)	
Eclipse C18 (5, 3.5, 1.8 μm)	
XDB C18 (5, 3.5, 1.8 μm)	
氨基 (5 μm)	

表 3.1 常用固定相

值得一提的是，这些极性固定相中有一些种类较难获得具有更小粒径的型号。这些固定相包括二醇和氨基固定相。然而，HILIC、未键合硅胶、氰基、己苯基和 C18 均可轻松得到 1.8 μm 及其他亚 2 μm 粒径。

3.2.3 固定相过多？

在 SFC 中，我们提供了各种具有不同选择性的优质固定相以试图分离复杂的峰对，尽管通常并不需要如此。如图 3.2 所示，将固定相与溶质匹配起来是相当简单的。通常有若干不同的固定相都可用于任何特定的分离，可选择其中的任何一种，多半都能得到可行的分离结果。

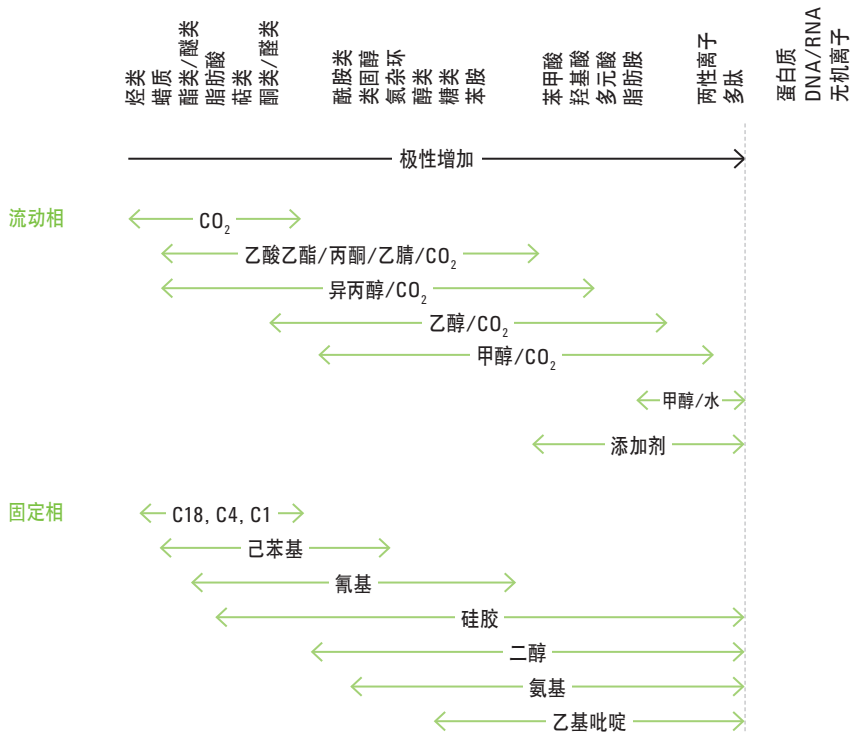


图 3.2 与溶质系列相匹配的特定流动相和固定相。随着溶质的极性逐渐提高，流动相和固定相的极性也需要逐渐提高。

对于极性溶质，几乎任何极性固定相都适用。通过改变流动相组成、温度和压力通常可以对方法进行优化，如第 4 章“流动相变量对保留值和选择性的影响”中所概述。唯一需要改变固定相的情况是在改变流动相参数仍无法获得足够选择性的时候。

3.3 固定相比较

Lesellier⁵⁷ 基于溶剂化参数模型开发出了可形象展现色谱柱选择性差异的方法，其大致类似于 Snyder 的溶剂三角形，不同之处仅在于它应用于固定相而非流动相。在这种情况下，他使用五个参数生成蛛网图，在此对色谱柱进行评估和比较。简化结果如图 3.3 所示。从中可以看到，所有经典的极性固定相（如未键合硅胶、氰基、氨基和二醇聚类）在质子受体轴上相当接近。二醇基固定相也比其他固定相更易于作为质子受体，而氰基和氨基固定相则倾向于具有偶极子极化率的特性。相对较新的五氟苯基 (PFP) 固定相在 SFC 中尚未得到广泛应用。在该模型中，表明偶极子极化率在一定程度上类似于 Snyder 三角形中的一些氯代溶剂。

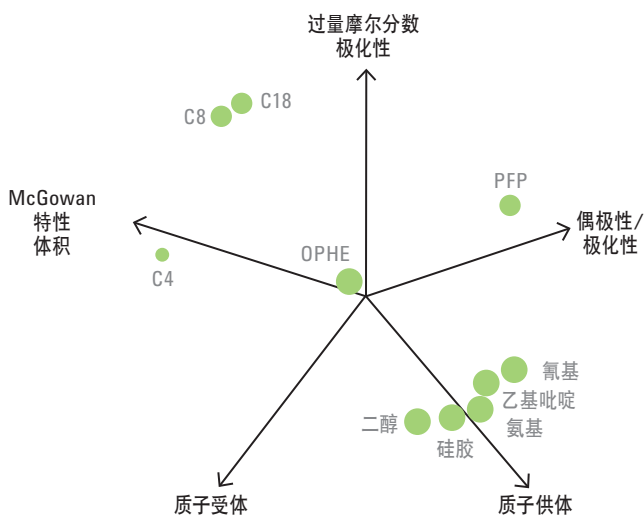


图 3.3 使用 Lesellier 的溶剂化参数模型得到的色谱柱选择性。OPHE: SynergiPolar RP (苯丙基) Phenomenix, EP: 2-乙基-乙基吡啶, PFP: 五氟苯基-丙基 (Supelco)

烃类 C8 和 C18 聚集成簇，如所预期的，或多或少会与经典极性固定相截然相反（反相对正相）。相对较新的苯丙基固定相呈相对中性，将其置于图中心附近，位于非极性脂肪烃（C8，C18）和极性经典色谱柱（未键合硅胶、氰基、氨基或二醇）之间。C4 远离其他脂肪烃。同样地，如果一种固定相的分离效果较差，则多半需要切换至其他固定相组。

3.4

填料粒径与色谱柱尺寸之间的关系

以前的 SFC 应用大多使用填充 5 μm 全多孔颗粒的 4.6 \times 250 mm 色谱柱。数十年来，市面上已出现能够充分发挥 3 或 3.5 μm 颗粒填充的色谱柱效的仪器，但此类颗粒并不常用于 SFC 中。甚至在 10 年前，大部分 SFC 非手性应用均采用 4.6 \times (50 ~ 150) mm 色谱柱进行快速筛查，但大多数色谱柱仍填充以 5 μm 颗粒。

亚 2 μm 颗粒已经出现了十多年，但大多以 C18 形式使用于 UHPLC 中。在相同柱效下且以最佳速度操作时，与 3 μm 颗粒相比此类颗粒的分析速度提高了三至四倍，与 5 μm 色谱柱相比提高了大约 9 倍。粒径的减小会通过两种方式缩短分析时间。最佳流速和柱效均与 d_p 成反比。粒径减小一倍时需要将流速提高两倍，在相同柱长下可获得两倍的柱效。将柱长减半可以获得如同用较大的颗粒的柱效，但分析时间仅为原来的四分之一。由于 van Deemter 方程中的 C 项相当平稳，早期很多 UHPLC 文献强调使用更短的（甚至 30 至 50 mm）色谱柱在大大高于最优速度的条件下操作，以进一步加快分析速度。

目前并没有理由显示为何此类颗粒不可用于 SFC，只要采用适当的流动相且仪器具有适当较低的扩散性即可。尽管亚 2 μm 颗粒在 UHPLC 中已经使用了十几年，但最近几年才开始应用于 SFC⁵⁸。最初仅有未键合硅胶可用。然而，近年来多种经典的极性固定相和 2-乙基吡啶基固定相均已该规格出售。色谱柱内径和粒径 (d_p) 均已迅速减小，采用 3 mm 内径和 100 mm 柱长并填充以亚 2 μm 颗粒的色谱柱逐渐成为实际上的标准配置。

3.4.1

压降、温度梯度和柱效损失

柱效不变时，色谱柱的压降是 d_p^2 的函数。因此，在柱效不变且各自均采用最佳速度时，使用 1.8 μm 颗粒得到的压降比使用 5 μm 颗粒得到的压降高出大约 7.7 倍。在两倍于最佳速度的速度下操作将进一步增加 ΔP 达 15 倍以上。在如此高的压力下，许多泵系统都需要重新设计才可实现 UHPLC 分析。

3.4.1.1

UHPLC 中的热梯度

在最早期的 HPLC 应用中，预计高压降会引起轴向和径向的温度梯度⁵⁹⁻⁶¹，在极端条件下使用亚 2 μm 填料时会出现问题⁶²。流动相在膨胀过程中会变热，色谱柱出口的温度可能显著高于柱温箱的设置温度。人们不认为沿轴向的梯度会出现问题。然而，如果从流动相到柱温箱之间存在显著的热传递，则沿色谱柱会形成径向温度梯度。此类径向梯度会导致色谱柱轴处的粘度较低且速度较高，而柱壁附近的粘度较高且流动相速度较低。因此，同一色谱峰的不同部分可能以不同的速度流出色谱柱，导致色谱峰展宽并引起柱效下降。此类径向梯度的存在是使用 2.1 mm 内径（甚至 1 mm 内径）色谱柱的主要原因，因为色谱柱轴与柱壁之间更短的距离会减小径向温度梯度的幅度。

这些因素对仪器具有重要影响，并且关于该主题产生了大量争论。其他人使用填充以亚 2 μm 颗粒的 4.6 mm 色谱柱在高达 600 bar 下操作时并未发生显著的柱效损失。这可能是由于柱温的控制方法不同。流动相可在进入色谱柱之前被加热至工作温度，将色谱柱置于不流动的空气浴柱箱中并与热交换器隔绝。这样能够最大程度减少柱外和沿色谱柱的热交换，因为不锈钢硬件和不流动的空气都是不良的导热体。在此条件下，色谱柱在很大程度上处于绝热状态。这样能形成不重要的轴向梯度，但会最大程度减小任何有问题的径向梯度。

3.4.1.2

SFC 中的热梯度

在 SFC 领域中也出现了关于由温度梯度引起柱效损失的类似争论^{63,65}。如果将色谱柱置于水浴中，则整个不锈钢硬件都可维持在同一温度下。色谱柱中将形成轴向梯度，但此时由于膨胀所引起的柱轴与柱壁之间的温差将生成径向梯度，并且经证实会发生严重的柱效损失。因此，与 UHPLC 类似，通常建议使用内径 2.1 mm（甚至 1 mm）的色谱柱。

然而，大多数相关实验均采用的是纯 CO₂ 或含 5% 甲醇的 CO₂。在那种条件下，流动相在膨胀时将显著冷却。与 UHPLC 不同，在 SFC 中由 Joule-Thomson (J-T) 膨胀引起的温度梯度高度依赖于流动相的组成。对于纯 CO₂ 而言，如那些报告中所述，由 600 bar 膨胀至 100 bar 将导致温度沿色谱柱长度方向下降 16 度。在 5% 甲醇下，最大温差仍有大约 10 度。然而在 10% 甲醇时，在降低 5 度前流体的温度首先升高 2 至 3 度。在大约 18% 以上，流体实际上将被缓慢加热，而在 50% 甲醇条件下，流体不会发生冷却，其温度反而会升高 10 度。

甲醇浓度 [%]	T_{out} [°C]	ΔT
0	40	-10
5	44	-6
10	47	-3
20	52	+2
50	60	+10
100	65	+15

表 3.2 沿色谱柱的理论绝热温降，假定进样口处于 600 bar，50 °C，出口处于 150 bar 的条件

切记 SFC 中的压降只有 UHPLC 中的三分之一到五分之一。尽管某些仪器能够在 600 bar 条件下操作，但实际上几乎从不需要如此高的压力。更典型的操作是采用 150 bar 的出口压力和介于 200 到 350 bar 之间的进样口压力。在这些条件下，轴向梯度不会超过几度。安捷伦恒温柱箱为静态空气柱温箱，其中使用热交换器在流动相进入色谱柱之前对其进行预热，并且色谱柱不难与热交换器隔绝。因此，在实际条件下，几乎不会形成径向梯度以及由于该现象引起的柱效损失。这使得 SFC 中几乎不需要使用内径 2.1 mm 或 1 mm 的色谱柱，尽管有时在 UHPLC 和 SFC 中推荐使用此类色谱柱。

基于柱外谱带展宽的问题，使用 2.1 mm 甚至 1 mm 内径且填充以亚 2 μm 颗粒的色谱柱将严重限制色谱仪的设计。例如，填充以亚 2 μm 颗粒的 2.1 mm 色谱柱需要使用体积小于 1 μL 的检测器流通池，以及内径 125 μm 甚至 100 μm 的短（小于 60 cm）接头管路。当前市售的仪器无法在标准配置下使填充以亚 2 μm 颗粒的 2.1 \times 100 mm 色谱柱的柱效大于理论柱效的大约一半。使用此类色谱柱需要对全部现有的 SFC 系统进行较大幅度的重新设计和/或重新布管。然而，使用较大内径的色谱柱既可行也可取，它能够降低柱外谱带展宽要求，只需经过适当修改，即可利用现有硬件充分发挥亚 2 μm 颗粒的柱效。

在另一个方向，几乎也不需要填充以亚 2 μm 颗粒的 4.6 mm 内径色谱柱，因为在 SFC 中 4.6 mm 色谱柱的最佳流速接近 5 mL/min。这是安捷伦分析型 SFC 系统的最大流速。某些其他 SFC 系统采用较低的最大流速（特别是在柱头压力较高的情况下），大部分时间需要在次优的条件下操作。因此，使用显著小于 4.6 mm 的色谱柱内径是可取的，并且有必要在高于亚 2 μm 颗粒的最优线速度或流速下进行操作。由于 2.1 mm 和 4.6 mm 内径色谱柱存在柱外谱带展宽或流速限制的问题，合理的折衷选择是使用内径 3 mm 的色谱柱尺寸。采用填充以 1.8 μm 颗粒的 3 \times 100 mm 色谱柱，安捷伦分析型 SFC 系统可轻松进行重新配置以达到色谱柱理论柱效的大约 90%（或大于等于 96%），如第 3.5.2 节“高速分析工作”中所述。

3.5 推荐的色谱柱尺寸

3.5.1 日常工作

对于新方法而言，在 SFC 中使用全多孔 5 μm 颗粒进行分析已不存在任何明显的优势，它在分析速度、分离度或灵敏度等方面均逊色于在较短、较快的色谱柱中使用较小颗粒。目前市面上很容易获得具有同等性能的仪器和小粒径颗粒的色谱柱，且分析速度更快且灵敏度可能也更高。对于经过验证的方法，将继续使用填充以 5 μm 颗粒的 250 mm 色谱柱。

内径为 4.6 mm、填充以 3 或 3.5 μm 颗粒的色谱柱可兼容较大的 UV 检测器流通池，例如广泛应用于安捷伦多波长和二极阵列检测器的流通池，具有 10 mm 光程和 13 μL 流通池体积。UV 检测器流通池的长光程能够保持或改善 5 μm 颗粒得到的灵敏度，因为采用较小的颗粒和使用更高的流速，因此色谱峰的保留时间更窄且峰更高。

连接进样阀与色谱柱以及色谱柱与检测器的管路总长度为 1 m（内径为 175 μm ）。采用此类系统，可达到几乎 100% 的色谱柱理论柱效。175 μm 管路可最大程度减小整个系统的柱外压降。

在日常工作中，推荐使用填充以 3 或 3.5 μm 颗粒的 4.6 \times 150 mm 色谱柱。采用此类色谱柱开发的方法稳定可靠，并可获得与 HPLC 最佳结果相近的效果。保留时间重现性应远小于 1.0% RSD ($n=10$)，除最极端的情况以外通常可获得小于或等于 0.1% 的 RSD。峰面积重现性取决于信噪比。对于信噪比高于大约 100 的色谱峰，峰面积 RSD 应小于 1%。对于很大的色谱峰，RSD 应远低于 1%，有时会接近 0.1%。校准曲线的线性一般超过 0.999，如后续章节所示（例如，参见第 8 章“SFC 定量分析”）。

3.5.2 高速分析

对于高速分析工作，可使用亚 $2\ \mu\text{m}$ 颗粒。安捷伦的亚 $2\ \mu\text{m}$ 填料为 $1.8\ \mu\text{m}$ 。如上文所述，以 $1.8\ \mu\text{m}$ 颗粒填充的 $4.6\ \text{mm}$ 内径色谱柱，其最佳流速为大约 $5\ \text{mL/min}$ ，这是安捷伦分析型 SFC 系统的最大流速，调节的余地很小甚至没有调节余地。将色谱柱内径降低至 $3\ \text{mm}$ 时，最佳流速将降至大约 1.7 至 $2\ \text{mL/min}$ ，具有较大的最优流速空间。这一较低的流速（与使用 $4.6\ \text{mm}$ 内径色谱柱相比）会显著降低系统柱外组件（例如，连接管路）的压降。然而，同时使用较小的颗粒和较小的内径需要显著减小柱外扩散。必须将安捷伦分析型 SFC 系统中的许多标准 $175\ \mu\text{m}$ 内径连接管路替换为尽可能短的 $125\ \mu\text{m}$ 内径管路。此外，必须用新型 $3\ \text{mm}$ 、 $2\ \mu\text{L}$ 高压流通池替换标准的 $10\ \text{mm}$ 、 $13\ \mu\text{L}$ 流通池。通过这些相当简单的更换，即可获得大约 90% 的色谱柱理论柱效，甚至在 k 约等于 2 至 3 时也是如此。填充以 $1.8\ \mu\text{m}$ RX-SIL 的 $3 \times 100\ \text{mm}$ 色谱柱在三倍的分析速度下，得到的柱效是填充以 $3.5\ \mu\text{m}$ RX-SIL 的 $4.6 \times 150\ \text{mm}$ 色谱柱的 120%，如图 3.4 所示。

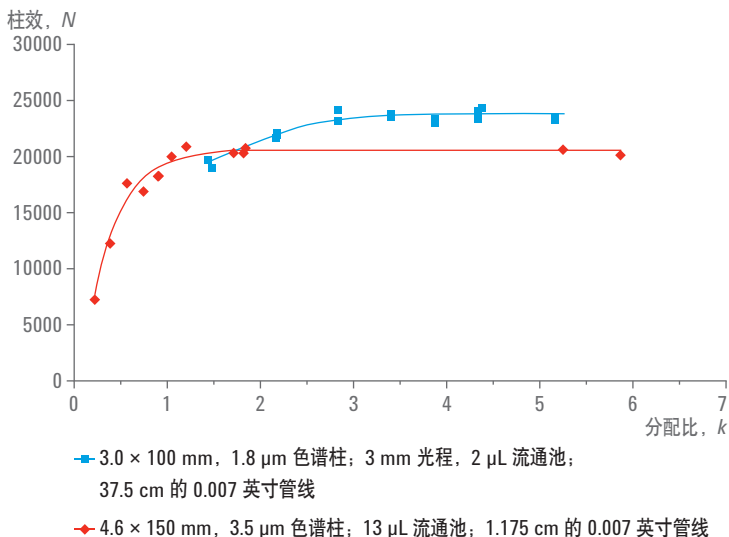


图 3.4 测得的色谱柱柱效。上部曲线使用 $3 \times 100\ \text{mm} \times 1.8\ \mu\text{m}$ 色谱柱并在 $3\ \text{mm}$ 光程、 $2\ \mu\text{L}$ 流通池、 $37.5\ \text{cm}$ 的 0.007 英寸管路（标准热交换器）和 $80\ \text{cm}$ 的 0.005 英寸连接管路条件下获得。下部曲线使用 $4.6 \times 150\ \text{mm} \times 3.5\ \mu\text{m}$ 色谱柱在 $13\ \mu\text{L}$ 流通池和 $1.175\ \text{m}$ 的 0.007 英寸管路条件下获得。尽管较小的色谱柱得到的峰形较差，但它能够在不到三分之一的时间内获得高出大约 20% 的绝对柱效。

3.5.3

应用较少的色谱柱

多孔外壳颗粒尚未广泛应用于 SFC，但已发表有几篇报告^{66,68}。经证实，某些较大的表面多孔颗粒能够在更高的速度下得到比相同内径全多孔颗粒明显更高的柱效⁶⁶。这些较大的颗粒在柱效和分析速度方面可媲美亚 2 μm 全多孔颗粒，但压降则小得多。研究表明，此类色谱柱在 HPLC 中用于 400 至 600 bar 的色谱仪时能够得到类似于亚 2 μm 的性能。这在 HPLC 中非常引人关注，但对于 SFC 则不重要，因为全多孔亚 2 μm 颗粒的压降已经相当低了。

对于多孔外壳颗粒，样品容量需要作进一步的研究。在一项研究中⁶⁶，研究人员使用各种极性溶质和极性流动相将塔板高度降低至大约 1.6 d_p ，而进样量仅不到 0.5 μL 且适用 4.6 mm 内径色谱柱。样品溶剂为甲醇。在另一篇报告中⁶⁷，研究人员使用 C18 固定相和非极性溶质，曾用较高的进样量（最高 3 μL ，4.6 mm 色谱柱）而不会导致柱效发生显著损失。在这种情况下，样品溶剂为甲醇/二氯甲烷，但溶质则为高度非极性物质。由同一作者撰写的另一篇论文⁶⁸表明使用 C18 多孔外壳色谱柱时，增加进样量时会导致柱效不断降低。

这些异常现象似乎与强溶剂效应有关，其中样品溶剂的强度高于流动相。已知注射较大体积的此类强溶剂会使早先的洗脱峰变形，对于表面积较小的色谱柱而言尤其如此。

已发表的论文中，使用这些颗粒得到类似结果的 SFC 论文相对较少。无法对进样量与色谱柱内径、改性剂浓度或样品溶剂之间的关系进行有效的概括。然而，我们很容易发现问题，并且通过使用极性较低的样品溶剂有助于纠正这一问题。任何形式的无溶剂进样（移去样品溶剂，然后将溶质复溶于流动相中）都可避免这一问题。

3.6 用于手性分离的色谱柱

几乎所有类型的手性固定相都可有效用于 SFC，Pirkle 型、环糊精型和氨基酸型固定相已得到相当普遍的应用。然而，目前基本上最通用的固定相是采用衍生化粗晶纤维素或直链淀粉涂覆到硅胶上制成。这些极其成功的固定相的多项专利已经过期，现在有多家制造商都在生产这些产品。这一状况促使人们去开发能够运用各种改性剂的键合相。

由于涂覆相为粗晶，因此通常将其涂布到孔径较大（1500 埃或更大）的颗粒上。这样会形成较低的表面积和相对较差的样品容量。某些其他类型（例如 Pirkle 型固定相）可键合到孔径较小的硅胶上，明显得到更高的表面积和样品容量。这对于以通量为最高优先的半制备工作而言至关重要。

分析型 SFC 担负着 10 到 15 年前开始由标准 10 μm 颗粒向普遍使用 5 μm 颗粒的转移。过去几年中，3 μm 颗粒已变得很普遍，因此，色谱柱柱长和（在某些程度上）内径都在减小。仅有几篇报告^{65,67}使用亚 2 μm 颗粒在 UHPLC 中进行手性分离，关于 SFC 的应用则没有报道。这一状况将来可能会发生改变。

至于非手性分析，SFC 的发展趋势是快速筛查，为实现分析速度的提升而牺牲柱效。当前的趋势是使用以 3 μm 颗粒填充的 50 至 100 mm 色谱柱。填充以 3 至 5 μm 填料、柱长 150 至 250 mm 的色谱柱更多用于痕量分析（对映体过量率 EE 测定）。有关更深入的讨论，请参阅第 7 章“手性分离”。

SFC 软件为分析人员提供了 4 种流动相控制变量：

1. 改性剂浓度
2. 温度
3. 压力
4. 流速

每个变量都在不同程度上影响着保留值和选择性。

4.1 改性剂浓度

在这些流动相控制变量中，调节改性剂浓度是对保留值最有力的控制，但却不太能影响选择性。

根据经验法则，改性剂浓度加倍会使保留值减半。

文献中的两个例子^{69, 70}是针对极性较大的混合物系列，即羟基类固醇和三环类抗抑郁药的洗脱，如图 4.1 中的图 A 和 B 所示。正如第 2 章“流动相”中溶剂致变色染料的研究所预测的那样，最初加入的少量改性剂对保留值就有很大影响。在第一个例子中，5% 以上的甲醇使羟基类固醇的保留值改变得很小，如图 4.1 的图 A 所示。但在 1% 到 2% 的前十分之几这个区间，分配比 k 从大约 40 降到 5 以下。 k 的对数值对改性剂百分比作图所得的曲线是非线性的。改性剂浓度微小变化即引起保留值这样大的改变，这种现象会导致在不同时间和不同实验室之间难以实现重现性。因此，应避免使用这种条件。不过，这个例子也证明了改变改性剂浓度的作用。

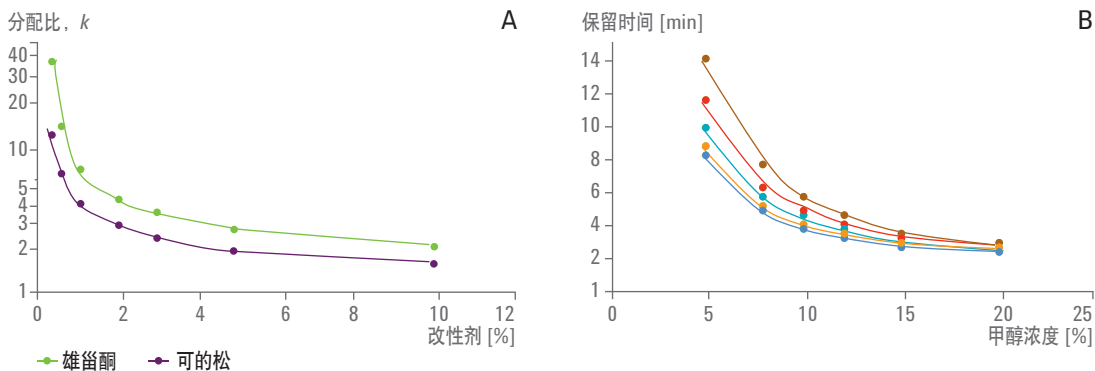


图 4.1 A: 可的松和雄甾酮的保留值随改性剂的浓度而变化，显示在低浓度下，浓度的微小改变即可带来很大变化。B: 5 种三环类抗抑郁药的保留值在较高改性剂浓度下随改性剂浓度的改变而变化

更典型的例子见图 4.1 的 B 图中三环类抗抑郁药的分离。在这个例子中，在改性剂 5% 到 20% 之间，所有 5 种化合物的保留值有明显变化。在最极端的情况下， k 从 5% 时改变了 14，到 20% 时仅改变为 2。在改性剂浓度相当宽的范围，所有曲线几乎是平行的。这些曲线不会交叉，说明不存在色谱峰位置的颠倒，因此，改变改性剂浓度对保留值有很大影响，但对选择性的影响很小。

4.2 温度

相比改性剂的浓度，温度改变对保留值的影响要小，但有时会引起选择性的明显改变。改变改性剂浓度使得所有溶质都进入合理的短保留窗口后，再通过改变温度来改变选择性。

所有其它变量都保持恒定时，在不同温度下两个磺胺类药物⁷¹的色谱图显示为，28 °C 时以 1、2 的洗脱顺序达到基线分离，但在 40 °C 时保留值减少，两个峰共洗脱，而在 60 °C 以上，保留值和分离度都增加了，但洗脱顺序却变成了 2、1，如图 4.2 所示。

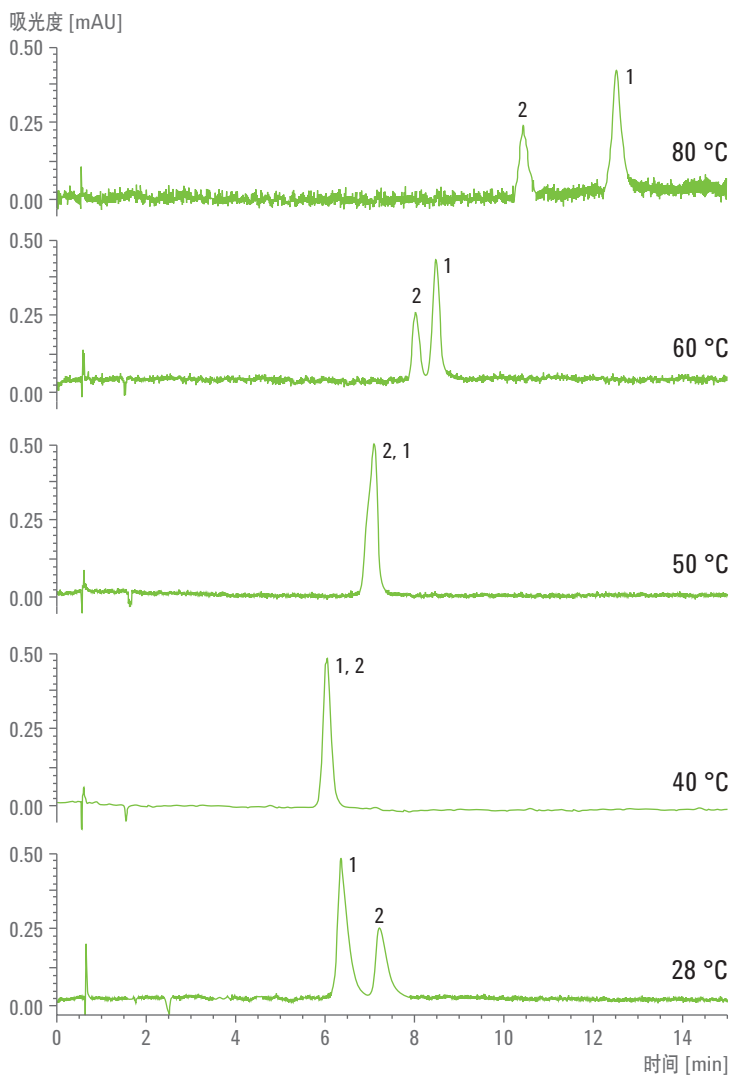


图 4.2 温度的微小变化引起两个磺胺类药物的峰位置颠倒

图 4.3 给出了三个其它图例^{70,72,73}。在图 A 显示的第一个例子中，用固定的流速、流动相组成和色谱柱出口压力下对几种兴奋剂进行分离，温度从 30 到 90 °C 变化。当温度升高时，某些化合物的保留值增加，有的减少，有的几乎保持不变。交叉的曲线表明色谱峰位置发生了颠倒。但请注意，保留时间的总体变化不大，特别是相对于改性剂浓度对保留的影响来说。

同样，在相同条件但不同温度下进行 10 种抗抑郁药的分离（B 图）。再一次看到，某些化合物的保留值增加了，某些有所减少，而其它化合物在 30 到 60 °C 之间几乎没有什么变化。曲线几乎水平，说明保留只有很小的变化，但几个交叉表明出现了色谱峰前后颠倒的现象。

在图 C 显示的第三个例子中，抗精神病药物的分离显示了与上述其它两个系列化合物类似的现象。这里有个明显的细节。35 °C 下，在 6 分钟左右，三个溶质峰共洗脱，形成单一的对称峰。其它两个峰也在 7 分钟附近共洗脱。但是，在 40 °C 时，也就是说只升高了 5 度，6 分钟附近的三个共洗脱峰和 7 分钟左右的两个峰都完全得到了基线分离！这些化合物都具有相同的中心三环结构，区别仅在于环上的几个取代基。

遗憾的是，在 40 °C 时，3 分钟和 8.5 分钟附近的峰存在共洗脱。进一步将温度提高到 45 °C，前面的三峰和双峰都得到了基线分离。实际上，在 45 °C 时，几乎所有溶质都得到了几乎等间距的完全分离，除了第二个和第三个最小保留的峰，这些峰在 40 °C 时合并，在 45 °C 以上仍然共洗脱。在类似这样的条件下，进行温度编程可以分离所有化合物。

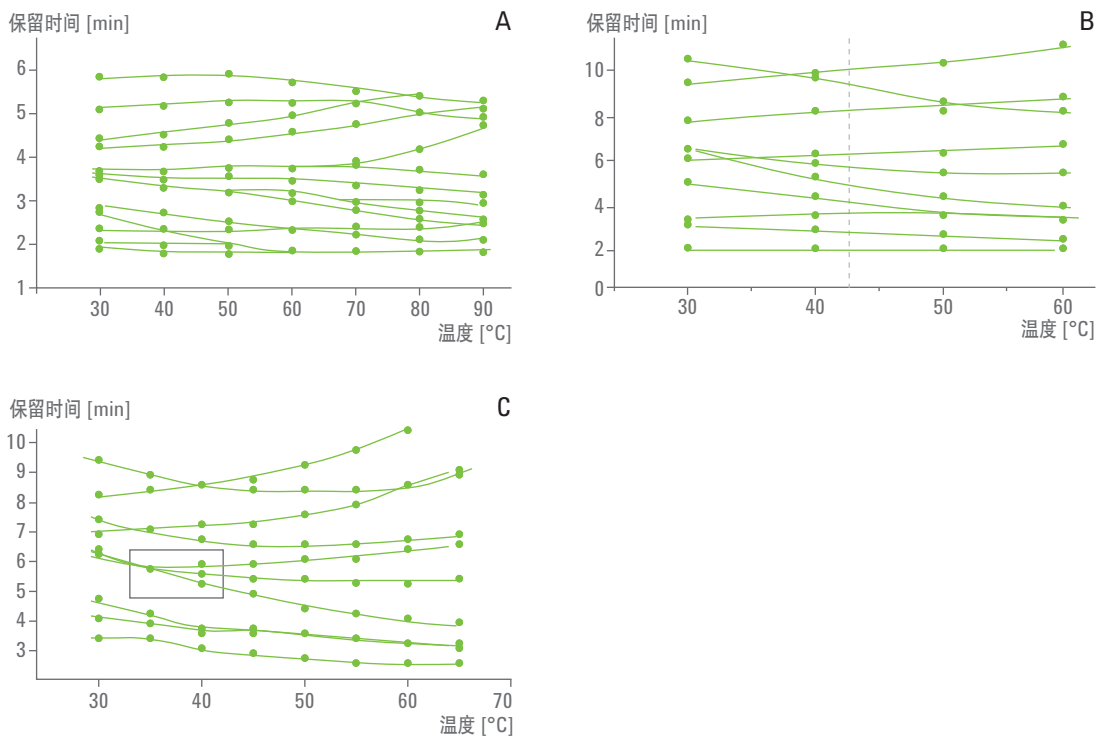


图 4.3 温度对保留和选择性的影响。某些化合物增加了保留值，而其它化合物则减少了保留值，从而使选择性发生了很大变化。A: 兴奋剂; B: 抗抑郁药; C: 抗精神病药

4.3 压力

使用纯 CO₂ 时，压力是首要控制参数。然而，对于含改性剂的流体，压力对保留或选择性的影响要小得多，尤其是含高浓度的较强极性改性剂时。同样，对三个不同系列的化合物^{70,73,74}，包括苯脲农药、三环类抗抑郁药和兴奋剂，使用不同的色谱柱出口压力但其余条件不变的情况下进行分离。图 4.4 中的图 A、B 和 C 所示出的各条曲线，除了兴奋剂外，每个系列的各组分几乎都是平行并相当平坦的。有几个曲线存在交叉，但这与改变温度所发生的交叉不同。

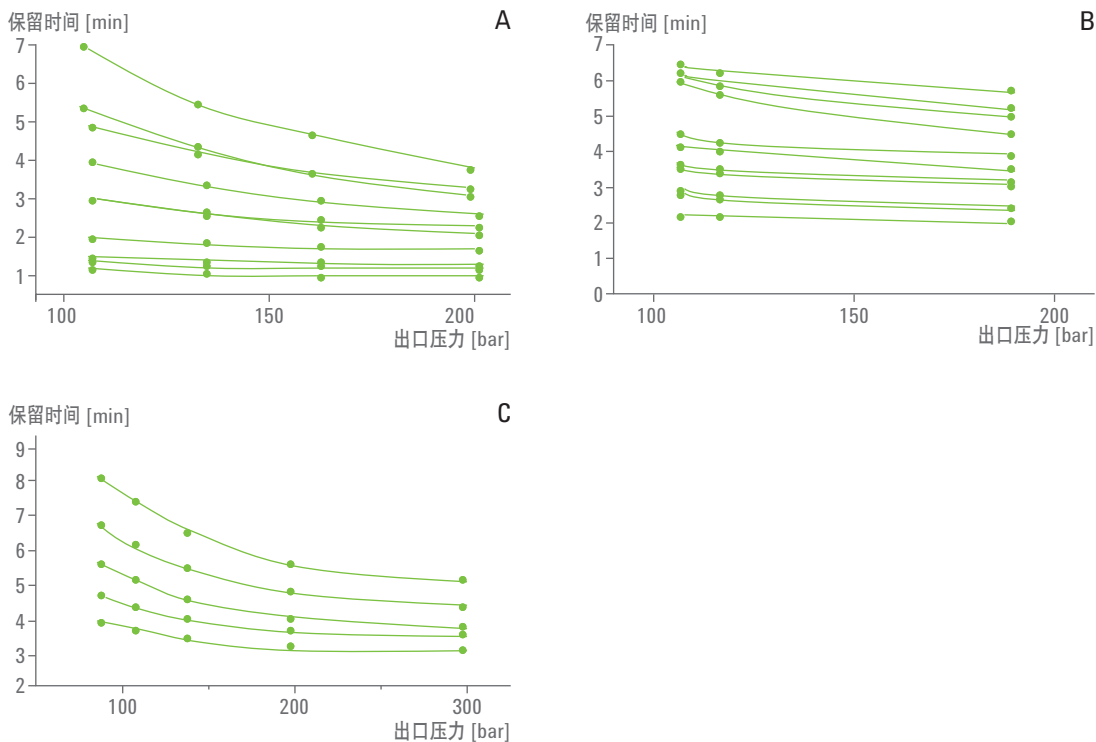


图 4.4 色谱柱出口压力对保留值和选择性的影响。A: 苯脲农药, 注意, 峰 8 和 9 之间发生了颠倒; B: 三环抗抑郁药; C: 兴奋剂

将 5 μm 柱上的方法转移到亚 2 μm 柱上, 使用更小粒径填料时, 柱头压力明显提高。压降与粒径平方的倒数成正比。因此, 在柱效相同 (减少柱长) 的情况下, 1.8 μm 粒径的色谱柱的压降是 5 μm 粒径的 7.7 倍。这意味着两根柱子上的平均压力和流动相密度明显不同。如上所述, 这在保留值和选择性上有着微妙的影响。这在低改性剂浓度, 尤其是低色谱柱出口压力 (低于 120 bar) 和低温 (低于 50 $^{\circ}\text{C}$) 时最为明显, 如前面图 2.1 中纯 CO_2 的密度和图 2.3 中的 CO_2 和甲醇的密度所示。密度对压力的曲线斜率在高压下往往不是很陡, 最大限度地减小了这种影响。

两种色谱柱平均密度的差异近来引发了新的争论，而这一概念已经被充分了解了几十年。如果原来在大粒径填料色谱柱上是在高于 100 bar（即 150 到 200 bar）时进行分析，那么降低小粒径填料色谱柱的出口压力可以让两根柱子上的平均压力（和密度）相同或至少相似。

如果从大粒径色谱柱向小粒径色谱柱转移方法时出现问题，可以取小粒径色谱柱压降的二分之一，以得到平均压降。提高大粒径色谱柱的出口压力，直到平均压力与小粒径色谱柱的平均压力相同。密度效应是非线性的，要得到相似的选择性，可能只需要稍微改变色谱柱的出口压力。

或者，可以简单地升高大粒径色谱柱的出口压力，使该效应归一化或最小化。

4.3.1 平均色谱柱密度

很难计算出二元流体在色谱柱中的平均密度。记住，几乎没有一个系统可以大致了解或计算出二元流体的密度。最好的例子是甲醇/CO₂。有适用于窄范围条件的数据库和状态方程⁷⁵⁻⁷⁷。

虽然缺乏数据的状况在未来有可能改观，但过去的经验表明，在目前缺乏 SFC 基础研究经费的情况下，产生和收集这些数据是不太可能的。

4.4 流速

在 HPLC 中，流速的变化往往对选择性的影响很小，倘如分离度与速度相折衷的话可以缩短分析时间。而 SFC 则有点儿复杂，因为提高了流速即增加了色谱柱和连接管线的压降。由于反压调节器保持着系统出口压力的恒定，压降增大的结果导致了泵压力升高。高压导致相应的密度增加和保留值降低（较低的 k ），超出了如前所述单纯因高流速而引起的预期变化。

流速对咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶保留值的影响如图 4.5 所示。压降从 2 mL/min 时的 33 bar 增加到 5 mL/min 时的 147 bar，当流速增加同样的数量时，保留值缩短了 2.5 倍。因为保留值的变化与流速的变化成正比，因此该结果表明，压降的效应是最小的。然而，将保留时间归一

化到 2 mL/min 时的数值 (实际 k) 时, 得到的数值见图 4.6。保留时间 (k) 缩短了 13%。虽然效果不是特别大, 但还是应该意识到这种形式的作用。

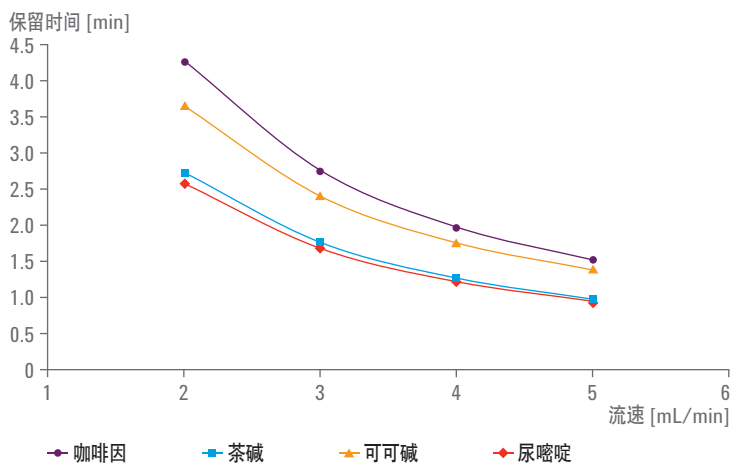


图 4.5 流速对咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶保留值的影响。由于高流速下柱压降增加引起了流动相密度变化, 因此曲线是非线性的。压降从 33 增大到 147 bar (188 到 297 bar 入口压力)。条件为 15% 甲醇, 50 °C, 150 bar 出口压力。色谱柱: 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m RX-SIL 柱

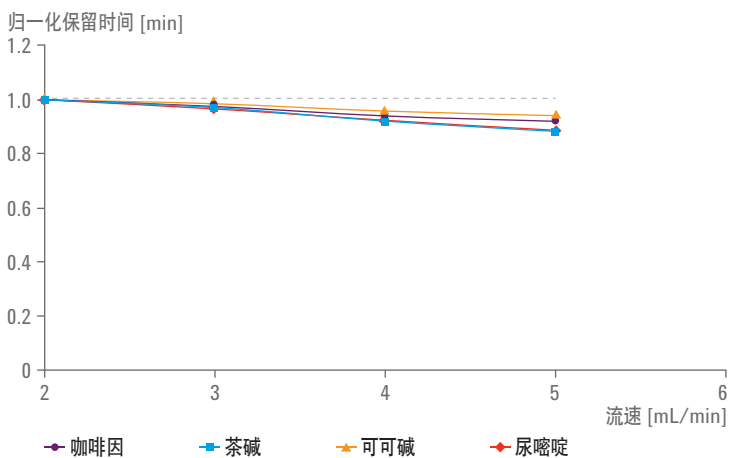


图 4.6 对图 4.2 的保留时间归一化显示, 当流速从 2 增大到 5 mL/min 时, 由于通过色谱柱流动相的密度增加, 保留值缩短了 13%。压降从 33 增大到 147 bar (188 到 297 bar 入口压力)。其它条件保持不变, 15% 甲醇, 50 °C 和 150 bar 出口压力。色谱柱: 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m, RX-SIL 柱

该数据采自 4.6 x 150 mm 色谱柱，填充 3.5 μm RX-SIL 填料 ($P_m = 188$ 至 297 bar)。由于压降的变化，填充亚 2 μm 填料的色谱柱可能会有更大的偏离。但是，在最佳流速左右，色谱柱压降很少超过 250 bar (小于 400 bar 出口压力)，在合适的改性剂浓度下， ΔP 值常在 50 到 100 bar 左右，与图 4.4 的范围相似。

4.5 可控变量对保留值和选择性的影响概述

要想不更换色谱柱而大幅度改变峰保留值，改性剂浓度是最有效的途径。改性剂浓度加倍，则保留值大约可以减半。改性剂浓度应该是用来移动色谱峰进入相应保留窗的首要变量。

如果色谱峰没有完全分开，微调温度常常可以改善具体色谱峰对的分离度。改变 ± 10 度通常可以看出选择性是否有改善。如果有改善，尝试向最好的方向以 5 到 10 度为单位递增进行优化。

压力应作为第二控制变量，但大幅度的压力变化 (即 25 到 50 bar) 可能会导致保留时间或选择性或两者都产生微小变化。流速应设置在接近最佳流速，直到可以优化或最大化所有溶质的分离度。然后可以增加流速，直到分离度刚好可以接受。

第 1 章“超临界流体色谱介绍”对超临界流体色谱是给读者下了一个广义的定义，什么是 SFC，什么不是 SFC。第 2 章“流动相”是让读者熟悉流动相各方面的特性，比如纯的 CO_2 是低极性、加入极性改性剂对溶剂强度有很大的影响，溶剂强度如何与浓度呈非线性关系，有多少溶质需要在流动相中加入强极性添加剂才能洗脱。第 3 章“固定相”解释了适用的柱硬件的尺寸和形状，以及对实际可用固定相的相对极性和相互作用的评价。第 4 章“流动相变量对保留值和选择性的影响”描述了各种流动相变量对保留值和选择性的影响，说明了到目前为止与其它仪器流动相设置点相比，改性剂浓度对保留值有最大的影响，但对选择性的影响较小。温度对保留时间的影响小得多，但对选择性有令人惊讶的效应。压力仅仅是第二控制变量，对保留值和选择性的影响都较小。流速对选择性的影响更小，只是通过改变色谱柱的压降而实现。现在是时候将所有这些背景信息都融合成进行方法开发的一个合理途径。

5.1 溶质与固定相的极性匹配

老话说*相似相溶*，意思是与溶质具有相似官能团的溶剂很可能就是良好溶剂，而具有不同化学特性的溶剂很可能是不良溶剂。例如，盐和水相溶，而盐和庚烷就不相溶。这种说法可以扩展到色谱中，选择与目标溶质具有类似化学特性的固定相和流动相。在分离极性较强的溶质时， CO_2 在某种程度上可以被看成是相对惰性的稀释剂。改性剂的极性和化学官能团主要支配流动相的特性。特别是需要溶质和固定相之间、溶质和改性剂之间发生强相互作用。

这种强竞争性相互作用会产生快速平衡。而弱相互作用则不明显，因此，导致长平衡时间和保留时间重现性差。

各种溶质官能团列于图 3.2 的顶部。溶质下面是几种流动相和固定相，箭头指示着每个相所相称的极性范围。这些都是近似值，但提供了很好的起点。找到合适的溶质系列，然后划一条垂直线，显示流动相和固定相的几种可能性组合，以获得多半可行的分离。

酸和碱需要极性固定相和流动相，如未改性的硅胶、二醇或氨基。能提供强氢键的溶质应该用氢键固定相和流动相进行分离。在水相介质中会根据 pH 环境进行离子化的溶质，可能需要极性改性剂，甚至极性更高的添加剂。应选择抑制其潜在离子化的添加剂。

而另一个极端，具有最低极性官能团或长烃链或两者兼有的溶质最好用非极性固定相（如 C18）和较非极性的改性剂进行分离。对于这种分离，不太可能需要添加剂。

5.1.1 添加剂

为了选择添加剂，另一个可能有帮助的类比是**酸碱摇出实验**。在水相的 pH 环境中允许碱发生离子化的条件下，与不溶性有机溶剂接触时，碱就分配到水相介质中。但是，在水相 pH 环境抑制离子化时，同样的碱很可能从水相中出来进入有机相。将固定相想做水相，流动相看作有机相。添加剂应该能够抑制碱性溶质的离子化，使其不被吸附在固定相上。

真正优化时可能需要尝试几种不同的添加剂。但大多数类似添加剂都起到相似的作用，通常不值得付出更多努力，除非在没办法的极端情况下。

需要添加剂的最明显例子涉及了脂肪伯胺和脂肪仲胺。在这个案例中，可能值得从乙基吡啶柱开始尝试，以避免使用碱性添加剂，特别是在使用质谱作为检测器的时候。但乙基吡啶柱比经典固定相（氰基、硅胶、二醇和氨基）的保留能力更强，因此常常需要比较高的改性剂浓度。因而降低了溶质的扩散系数、减慢了优化的线性速度、增加了粘度和压降。另一种方法是，将一种强碱，例如三乙胺向改性剂中加入 0.1%，很可能改善整个柱效，并且只需要非常低的改性剂浓度（具有更高的速度和效率）。

两性化合物一般最好使用甲酸铵或乙酸铵作为添加剂，通常补充更强的酸或碱。这些添加剂可以抑制这类溶质的酸性和碱性离子化，或形成中性离子对。

5.2 极性窗口

流动相可能形成包括溶质在内的*极性窗*。如果样品包含了范围广泛的极性、尺寸和官能团，则流动相的极性差异应更宽，形成宽的*极性窗*，可以通过对较大范围内的组分进行编程使窗口变窄。如果样品含有极性相近的一组同类化合物，流动相应当收拢范围，且与溶质类似。

5.3 入门指南

在一开始就确定分离目标非常重要。可以采取不同途径进行优化，比如一个目的是让峰之间具有最小分离度以实现最快分离，而另一个目的则是痕量分析。我们的目标应该始终是建立一个尽快完成分析的方法。为此，常常是从最高浓度的相应标准品开始尝试，使用强洗脱条件，尽量避免不确定性。如果需要特异性检测器，如蒸发光散射 (ELS) 检测器，需要分别开发分离方法和优化检测器。通常是在溶质具有弱发色团时使用 ELS 检测器。使用的溶质尽可能接近目标溶质，但一定要有发色团。然后可以使用 UV 检测器，用带有发色团的溶质帮助优化 ELS 检测器，以此得到几乎适合目标溶质的操作条件。

5.4 极性溶质

下一节将介绍开发优化方法的一步过程。图 5.1 显示了极性溶质遵循该指南的决策树。

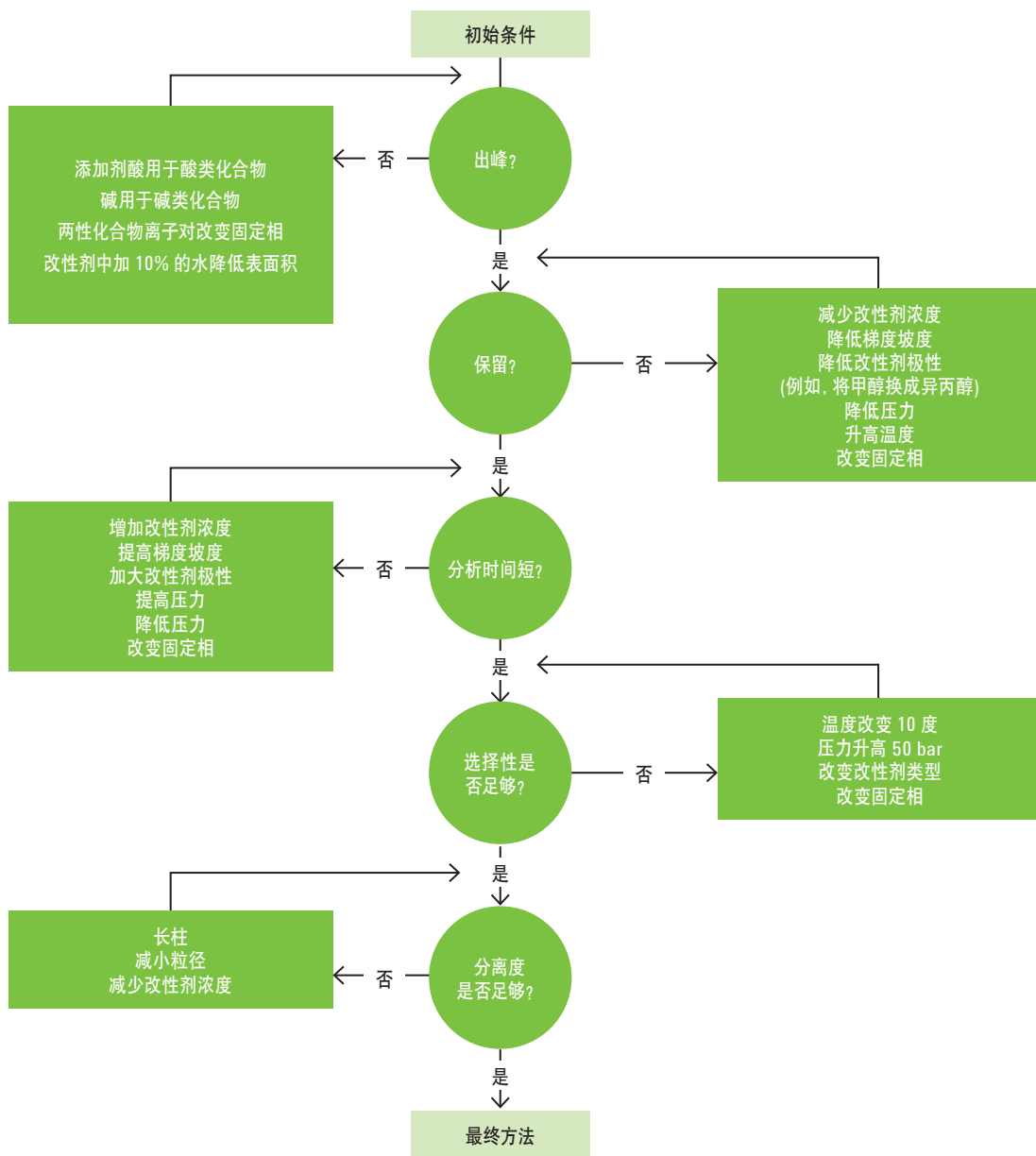


图 5.1 使用极性溶质的方法开发决策树

高极性溶质，如多元酸或脂肪胺可以在图 3.2 的右上方找到。向下划垂线显示可以使用的极性固定相。这条线还提示可能需要甲醇和适当的添加剂。

5.4.1 需要添加剂吗？

极性溶质需要解决的第一个问题是流动相是否需要添加剂。选择极性固定相，如未改性的硅胶。使用含 40% 甲醇的 CO₂，50 °C，1.5 倍最佳流速，出口压力为 150 bar。在这样强的条件下，大多数溶质应在几分钟内洗脱。第一次进样后，是否得到了对称的高效峰？

5.4.1.1 出峰？

如果峰形合适，没有拖尾，则不需要添加剂，可以优化改性剂浓度。

5.4.1.2 未出峰？

如果成分没有洗脱下来，或者峰严重拖尾，则需要添加剂。通常向改性剂中加入 0.1% 至 0.2% 足矣。如果溶质是碱，则添加强碱，如氨或三乙胺。如果溶质是酸，则添加强酸，如三氟乙酸。许多溶质都具有多官能团。对于这种溶质，两性添加剂，如甲酸铵或乙酸铵可能比较合适。在包含添加剂的第二次进样中，是否得到了对称、高效的色谱峰？

5.4.1.3 出峰！

在 90% 以上的例子中，添加剂的加入都得到了峰形合适的峰。如果加入添加剂后色谱峰良好，则继续优化改性剂浓度，与不使用添加剂时的方法完全一样。只需进行几次快速等度运行来回答关于极性溶质的一个重要问题。

5.4.1.4 还是未出峰？

如果没有出现峰，或者峰形很差，可尝试使用离子对（碱性溶质用酸性添加剂，反之亦然）。如果还是没有出峰或者峰形差，分离的成功与否将取决于是否能找到合适的添加剂或添加剂组合。最后尝试在甲醇和添加剂中加入 10% 的水。

另一个办法是更换新的固定相，如用乙基吡啶柱分离碱，或用 *Premier* 分离酸。这些固定相可以使溶质洗脱，而不用添加剂。

5.4.2

优化改性剂浓度 – 甲醇

甲醇是与 CO₂ 完全混溶的一种最强溶剂。其本身对许多溶质来说是一种过强的溶剂，使其在 40% 甲醇下在色谱柱死时间附近被共洗脱。

利用经验法则，改性剂浓度减半，大致可以使保留时间加倍，以 2 为分母逐渐减少改性剂的浓度（到 20%，然后 10%，再到 5%），观察所有峰的保留时间。通过缓慢改变改性剂的浓度，可以很清楚地了解峰的洗脱顺序是否颠倒。另一方面，只要进行几次等度运行，就可以表明什么是必要的后续步骤。

如果溶质显示出宽范围的保留值，下一步将是组成梯度。如果大部分峰都被保留，却以相似的保留时间聚在一起，接下来可能需要等度方法。开发任何一个方法然后运行一段较短的合理时间，不要期望只用一种改性剂浓度就能分离出所有峰。当改性剂组成接近最佳时，所有峰至少部分分离，然后继续通过柱温来调节选择性。

5.4.2.1

甲醇极性仍然太强

如果使用 5% 甲醇时，某些峰还是接近不保留，没有足够的分离度，则改用较弱的溶剂，如乙醇或异丙醇。在大多数情况下，其中一种醇将实现可行的分离。在极端情况下，可能需要改用不同的溶剂系列。如果醇类不合适，对样品的最初判断可能是错误的。

5.4.3

用温度改变选择性

如第 4 章“流动相变量对保留和选择性的影响”所述，温度对保留值是有限的影响，而对选择性可能有明显影响。一旦优化了改性剂浓度得到合理的短分析时间，以 ± 5 到 10 度改变温度，常常可以改变难分离峰对的相对保留值。如果这种温度变化改善了难分离峰对的分离度，可以尝试沿同样方向进行较大的温度改变。

5.4.4

压力

对于极性溶质，压力是次要控制变量，很可能不能明显改变保留值或选择性，特别是在高改性剂浓度下。但如果分离没有实现优化，还是值得以 25 或 50 bar 的增量改变压力。这种尝试很简单，只需要一点时间，实际上可能很有用。改变出口压力便可改变流体的密度，可能起到某些令人满意的效果。在高压下 UV 检测器的噪音更低。因此，在高压下进行痕量分析通常是明智的。

5.5

低极性溶质

许多低极性溶质都适合 SFC。许多是复杂的天然产物或同系物。图 3.2 的左上方列出了一些典型的低极性溶质系列。选择一种类型的溶质，划一条垂直线找到合适的固定相。对于带长烃链的化合物，最合适的固定相可能是 C18，但其它固定相比如 C8、苯基和氰基可能也适用。极性固定相很可能没有保留值和出现变形峰，因为极性固定相与非极性溶质之间相互作用较弱。

在低温低压下，使用纯 CO₂ 很可能不会得到好的峰形。为非极性但重溶质开发耐用方法的最可靠方式是使用改性流体，可以等度洗脱，也可以是组成编程洗脱。梯度还是按从低到高的改性剂浓度进行编程。

以较低极性的改性剂，如异丙醇作为起点是一个不错的选择。因为低极性溶质一般没有氢键，非醇性改性剂可能更好。与高极性溶质相比，更常用的是低极性溶质乙腈。尽量避免使用氯代溶剂，虽然也可以使用。对于这种溶质，不太可能需要添加剂。

5.5.1

优化改性剂浓度

对于复杂样品，可能需要梯度洗脱。但最好尝试在高改性剂浓度的等度条件下进行快速分析，确保所有组分均洗脱，这样可以最大限度地减少迷惑。对于极性溶质，洗脱条件从 40% 改性剂，50 °C 和 150 bar 开始。

极有可能所有组分都被快速洗脱。将改性剂浓度减半会使保留时间加倍。如果 5% 异丙醇仍然是过强的溶剂，可以在庚烷中加入 10% 异丙醇，然后将混合物作为改性剂。

5.5.2 温度和压力

对于极性溶质，稍微改变温度可以显著影响溶质与固定相之间的极性相互作用，导致选择性的改变。对于极性很小的溶质，相互作用以范德华力为主，温度对选择性的影响很小。

温度和压力的最大影响可能都是通过改变流动相密度来实现的。在高温和低压（降低密度）下可能会使保留值增加。保留值也可能是密度的函数，特别是使用低浓度的低极性改性剂时。

5.6 多变量方法

上述途径开发的方法可能比较老式，因为是遵循单变量的方法。下一步，你需要作出一些近乎实时的决策，否则会浪费时间和原料。正如后面的章节中将介绍的优化分离，对许多分离来说，多因素分析方法很难找到最佳条件。与更细致的单变量方法开发优化相比，这种多变量方法不太可能得到优化分离，温度改变的确常常导致峰的顺序颠倒。但 SFC 的高速度使其可以快速开发这样的方法，比 HPLC 所用时间要短得多。

在本章中，我们展示了关于如何开发特殊方法的几个案例研究。所选择案例研究都是相当困难的，随流动相参数的变化，发生不同寻常的峰顺序颠倒和响应。希望按照本书前面章节中的建议对这些难分离混合物的分离，能够帮助您开发自己的方法。必须强调，这些例子并不典型，不代表常态。大多数分离很容易根据具体的分析要求进行优化。还要记住，什么才是优化的分离并没有一个统一的标准。所有分离都要在速度、分离度和灵敏度这三者之间达到平衡。在下列例子中，所有这些问题都得以解决。

6.1

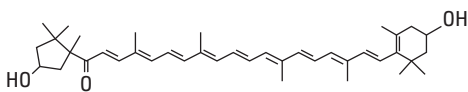
案例研究 1 – 典型的低极性样品

第一个例子是过去 20 年来常用 SFC 分离的典型样品类型。但这种应用在早期 SFC 中更为常见。这个应用提示，这项技术在药物研究以外的其他领域还有很大潜力。

辣椒红素的分离是非极性系列化合物分离的良好例子⁷⁸。该产品是辣椒胡椒的提取物，近年来用以替代加工食品中的大多数人造红色染料，具有重要的经济价值。

目前只存在两种主要色素：辣椒黄素和辣椒红素。每个都带有两个羟基，分别位于萜类链两端的环上，如图 6.1 所示。这些羟基与一系列脂肪酸形成了大量单酯和双酯。样品中含有大约 70 种化合物，大多数是双酯。这些酯类不会明显改变母体化合物的颜色，却有助于增强稳定性。

辣椒红



辣椒红素

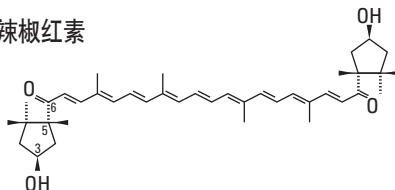


图 6.1 红辣椒中的红色来源于辣椒黄素和辣椒红素这两种化合物。它们的大多数是与各种脂肪酸形成单酯和双酯的形式存在。胡椒中仅存在相对较少的高极性单醇和二醇

由于脂肪酸上有长烃链，所以这些酯类都是非极性的。可以在图 6.2 的顶端的左侧找到酯类。垂直的大箭头指示出相应的流动相和固定相。根据溶质的结构选择使用相似的长烃链固定相，如 C18 固定相，以及在 CO₂ 中加入相对非极性的改性剂，如异丙醇。使用三根选择性略有不同的 C18 柱（安捷伦出品），每根都是 1.8 μm 粒径。

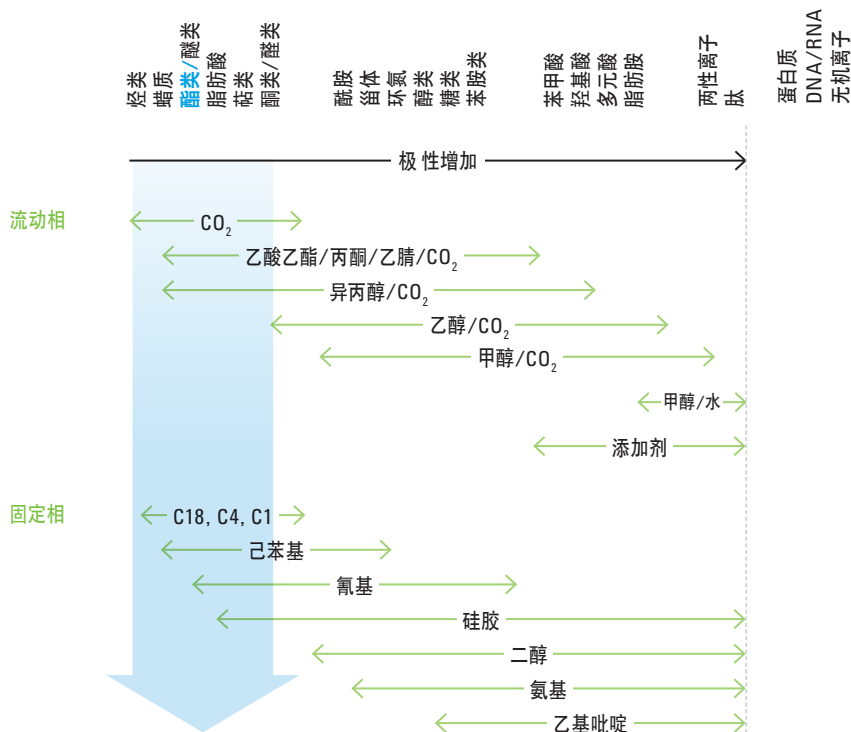


图 6.2 辣椒油中含有大量辣椒黄素和辣椒红素的单酯和双酯。箭头指示了这些酯类的固定相和流动相。

在 CO₂ 中用 5% 到 20% 异丙醇的相同梯度，在三根不同的 C18 柱上分离同一样品，得到分离度稍有细微差异的、不同的色谱图，如图 6.3 所示。色谱峰均被良好保留，间隔合理。相反，同一样品在极性较大的固定相上分离时，虽然也使用相同的梯度和条件，但大多数峰形都很差，保留值也位移到更短的时间，如图 6.4 所示。显然，溶质与这些极性较大的固定相之间的相互作用比它与 C18 固定相之间的相互作用更弱。

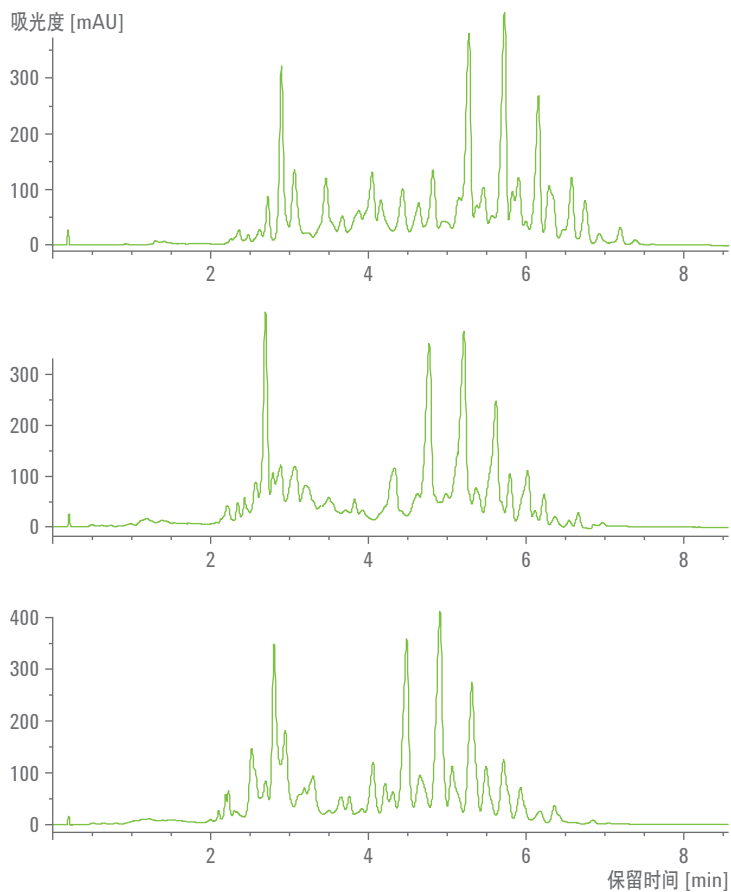


图 6.3 在三种不同 C18 柱上分离辣椒油，色谱柱均为 3 x 100 mm，1.8 μ m（均来自安捷伦），6.5 分钟内用 5% 到 20% IPA 梯度洗脱

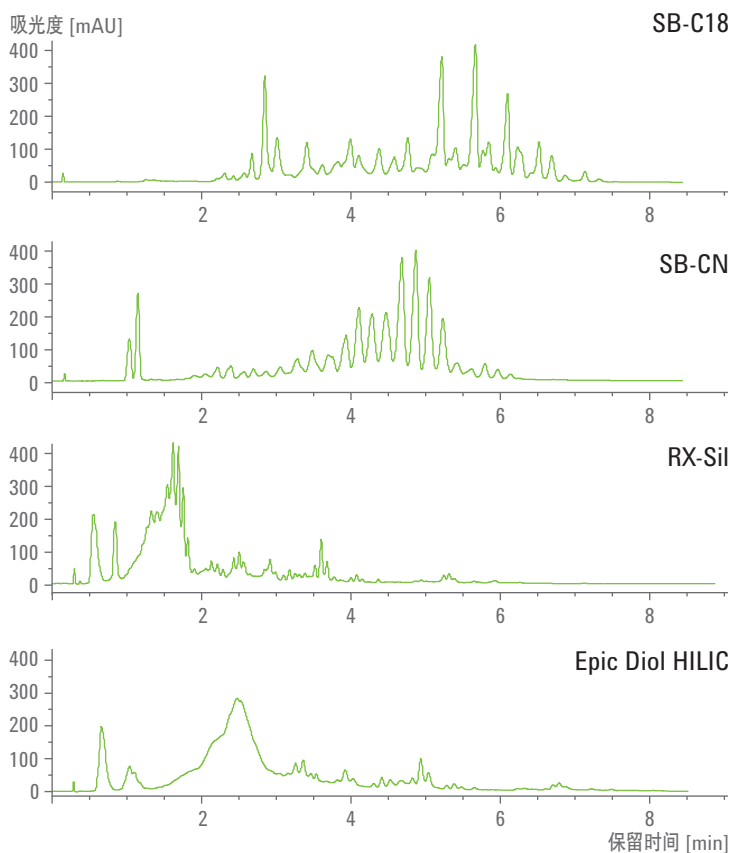


图 6.4 在极性柱上使用相同的洗脱条件分离相同的辣椒油，与顶级的 SB-C18 柱进行比较。所有色谱柱均为 3 x 100 mm，1.8 μm 。非极性分析物的保留都很差，尤其是在未改性的硅胶和二醇固定相上

在同样的梯度和条件下用 ZORBAX SB-C18 柱分离，使用其他改性剂取代异丙醇，如图 6.5 所示。乙腈和丙酮的极性较强，而醋酸乙酯的极性与异丙醇相当，根据表 2.1 所列的 Snyder P' 等级，所有三种溶剂都使样品的保留时间更短。观察到的保留顺序为：乙腈 (6.2)、醋酸乙酯 (4.3)、丙酮 (5.4)、异丙醇 (4.3)。括号中的数字为表中每个溶剂的 P' 溶剂强度值。显然， P' 值不能正确预测这种类型样品的保留顺序。使用 Hildebrand 等级得出的保留顺序甚至更糟：乙腈 (0.5)、醋酸乙酯 (0.38–0.48)、丙酮 (0.47–0.53)、异丙醇 (0.62)。

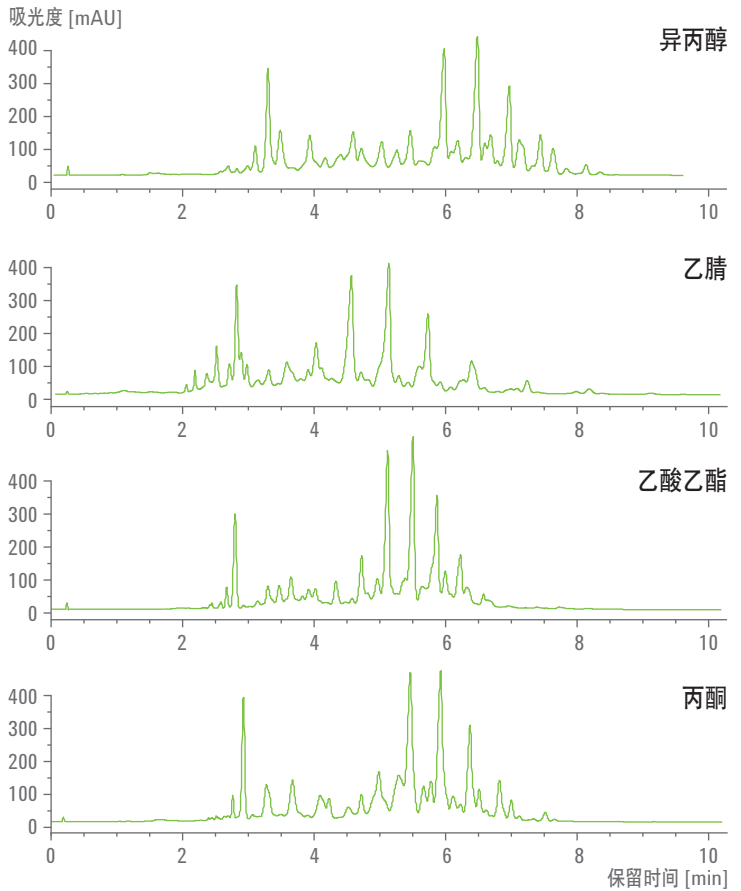


图 6.5 用同样条件分离同一辣椒油，但用其他改性剂替代。与极性较大的 IPA 相比，所有高极性改性剂都使保留时间变短。

在某种程度上，该分离类似于反相 HPLC。在极性较小的固定相中保留值更大，而极性较大的改性剂使得保留值减少（或多或少）。然后所有例子都采用在低极性 CO_2 中增加极性改性剂浓度的梯度法。因此，在整个梯度洗脱过程中流动相极性逐渐增大，与反相 HPLC 相反，在后者的梯度洗脱过程中，流动相极性不断降低。

6.2

案例研究 2 – 中等极性样品

如前面的例子所述，在过去十年间进行的大多数 SFC 分离都没有在 C18 柱上分离过相对非极性的溶质。反之，使用 SFC 的大多数工作都是分析药物类小分子。

虽然第 4 章“流动相变量对保留和选择性的影响”中的概要性阐述对结果预期起了很好的指导，但那仅仅是概述。咖啡因、茶碱和可可碱常被用作 SFC 的测试溶质，因为它们相对安全，而且不需要流动相添加剂。它们都拥有相同的四环氮骨架结构。区别只是氮上的单甲基取代位置不同，如图 6.6 所示。由于其结构相似，所以是检验该通则的良好测试样品。加入尿嘧啶是因为其具有不同的结构，可能在条件变化时有不同的表现。最初的目标是开发最快速的分离，所有化合物峰对间的分离度均大于 3。

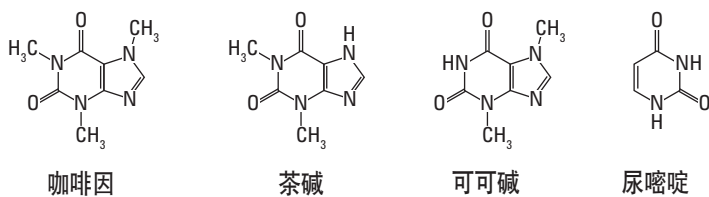


图 6.6 咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶的结构

溶质均为中等极性，比前面的例子需要极性更大的流动相和固定相。氮只存在于环上，不太可能需要添加剂。含共轭环氮的化合物大约位于图 6.7 顶端极性表的中间。从选项中选择了未改性硅胶柱，以甲醇作为改性剂。本实验所用的色谱柱为 4.6 x 150 mm，填充 3.5 μm RX-SIL 填料。硅胶通常具有高柱效，很少出现复杂情况。

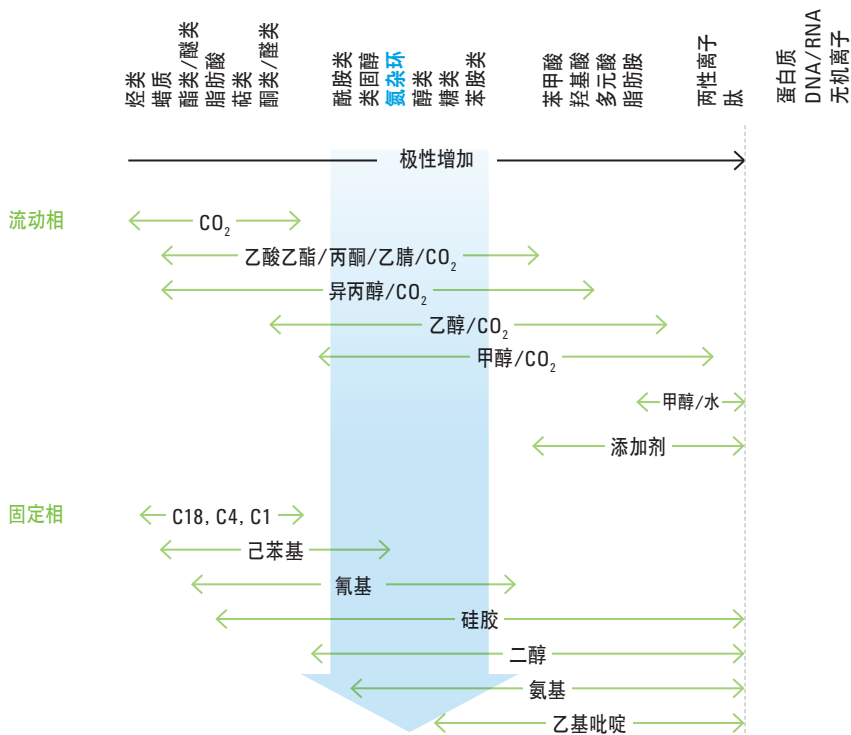


图 6.7 氧杂蒽和尿嘧啶上的氮都在环上，因而只有中等极性。它们不太可能需要添加剂。

甲醇是能够与 CO₂ 完全混溶的极性最大的改性剂。如果对溶质是否会被洗脱有疑虑的话，首选的改性剂就是甲醇。此外，如前所述，甲醇具有价廉、中等毒性、粘度低等特点。

随意选择了通用的温度 (50 °C) 和压力 (150 bar)。将流量设置为最佳流速的 1.5 倍 (4 mL/min)，以加快方法开发的速度。

6.2.1 分离度大于 3 的 最快速色谱图

如前所述，改性剂浓度是改变保留值的最重要流动相参数。所以，评价的第一个变量就是甲醇浓度。首次运行采用了不含添加剂的高浓度甲醇等度洗脱，主要是看是否需要添加剂。如果峰没有洗脱或洗脱峰形很差，则需要添加剂。在这个例子中，30% 的甲醇使得所有色谱峰均在短时间内（大约 1.25 分钟）以高柱效被洗脱，所以不需要添加剂。但有一个峰在另一个峰的肩上，如图 6.8 中最上面的色谱图所示，说明改性剂浓度应该降低一些。

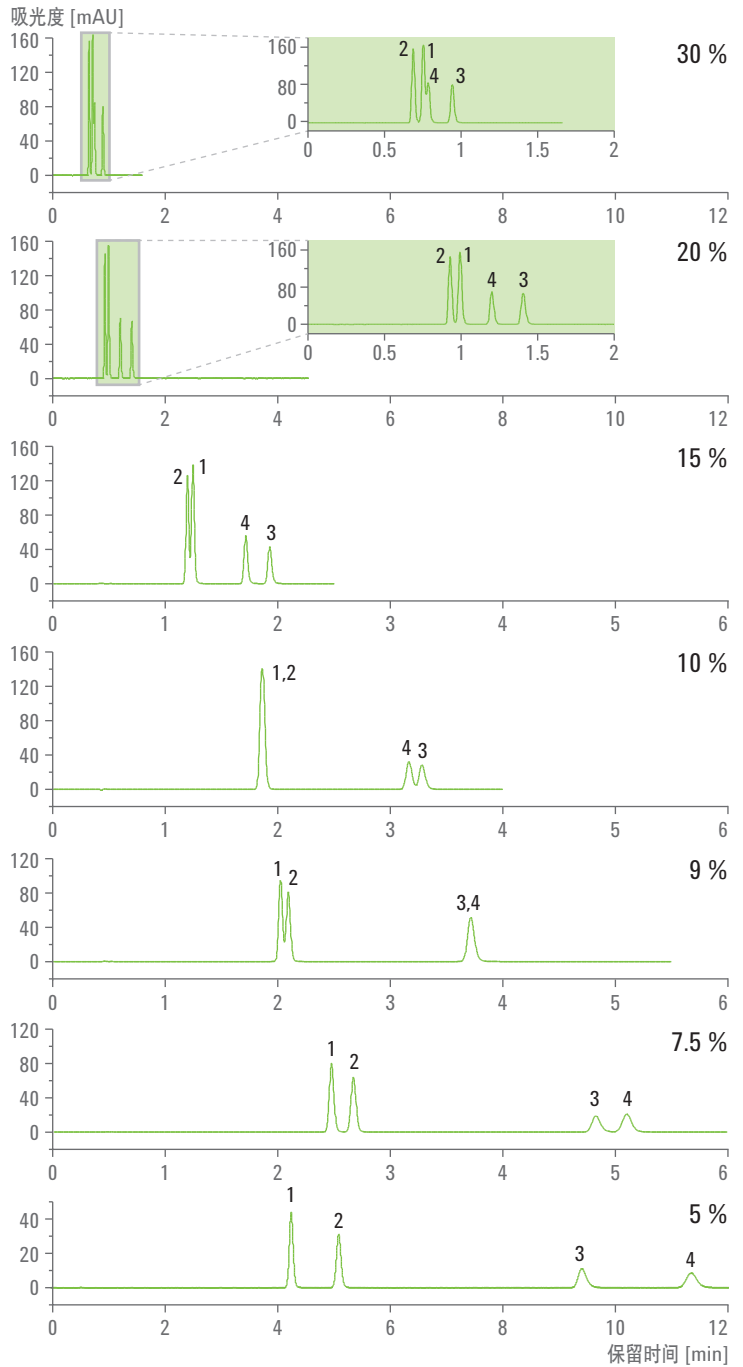


图 6.8 改性剂浓度对咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶分离的影响，流速 4 mL/min，50 °C，出口压力 150 bar，使用 RX-SIL 柱，4.6 x 150 mm，3.5 μm 填料。注意出现了不常见的多个峰顺序颠倒

逐渐减少改性剂浓度，开始分离度略好（20% 时），然后前两个峰失去了基线分离（15% 时），接着第一峰对共洗脱（10% 时），最后一对峰的分度受到损失。接下来（9% 时），第一对峰顺序颠倒，最后一对峰共洗脱。在更低浓度下（7.5% 和 5%），第一对和最后一对峰的分度逐渐增大。图 6.8 中的所有色谱图基线时间为 6 分钟，但 5% 时的基线时间为 12 分钟。

从表面上看，在最低改性剂浓度（5%）条件下的分离似乎得到了最大分度，并且形成了进一步优化的基础。但如果分离的目标是实现最快分离，那么两对峰之间的时间就过长了。在 7.5% 甲醇时收集的色谱图只用了一半的时间，并且保持着比基线分离更好的分离。因此，选择 7.5% 甲醇，4 mL/min，50 °C 和 150 bar 出口压力开始进一步优化。

通常，改变温度只对保留值有一定的影响，但却常常引起选择性的明显改变。在这个例子中，尝试通过改变柱温来改变选择性，进而改善分度，然而却失败了，如图 6.9 所示。将温度从 50 °C 提高到 60 °C 改善了分度，但只有在保留时间足够长的情况下才得以实现。在温度降低 10 度（40 °C）的条件下，第一对和最后一对峰都失去了基线分离。将温度进一步降低 10 到 30 °C，两对峰均出现了共洗脱，如顶部的色谱图所示。很明显，不同化合物对温度细微变化的响应程度是不同的。选择性发生了改变，但在这个例子中对方法开发并没有什么帮助。

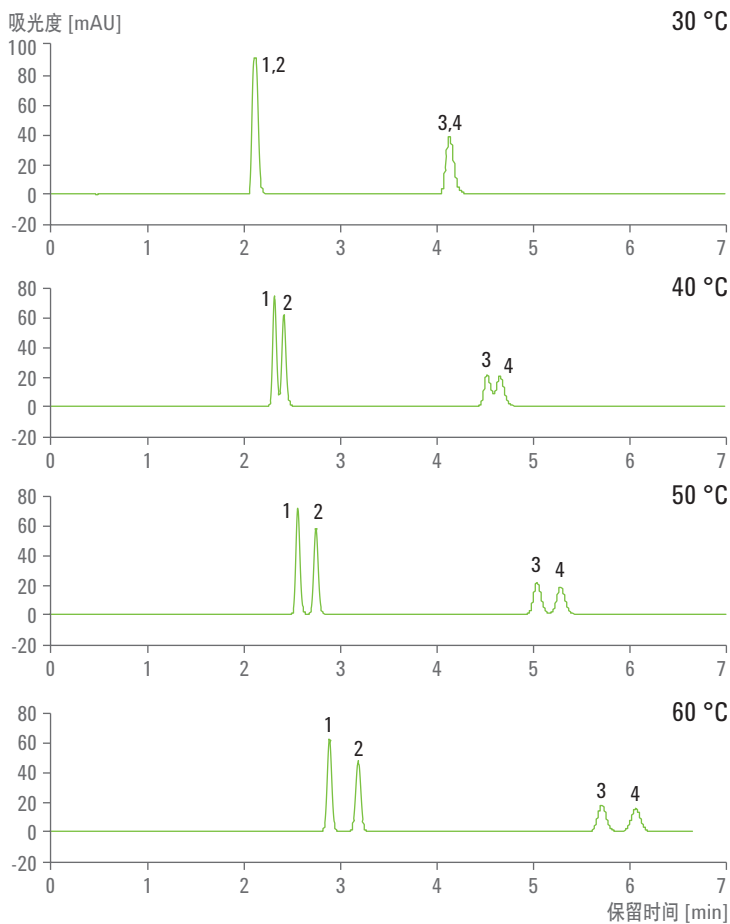


图 6.9 温度对咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶保留值和选择性的影响，改性剂 7.5% MeOH，流速 4 mL/min，出口压力 150 bar

压力被认为是第二控制变量，但对保留值和选择性有一定影响。回到 50 °C 和 150 bar，改变柱出口压力，观察柱出口压力对保留值和选择性的影响。逐渐降低出口压力，分离度随之降低。在 120 bar，最后两个峰出现共洗脱，但在 100 bar 下，它们洗脱顺序颠倒，如图 6.10 所示。

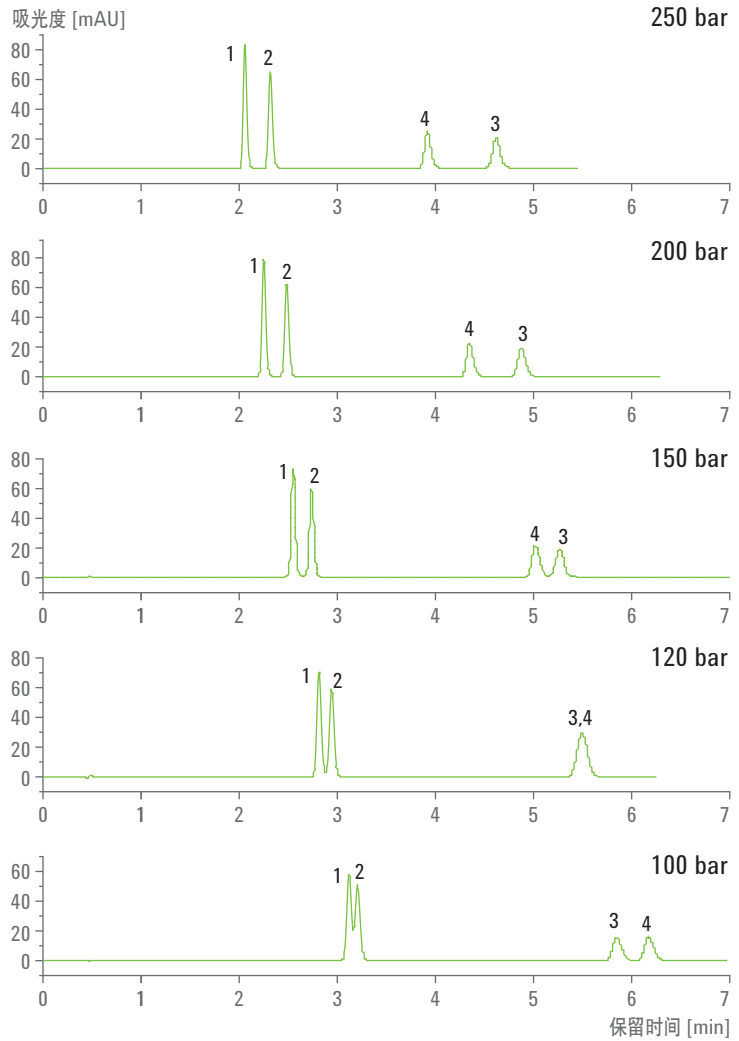


图 6.10 压力对咖啡因、茶碱、可可碱和尿嘧啶的保留值和选择性的影响。条件：4 mL/min, 7.5% MeOH, 50 °C

在更高的出口压力下，两对峰的分度明显改善，而保留时间也降低，两者都是我们期望得到的结果。采用 4 mL/min, 7.5% 甲醇, 50 °C 和 250 bar 获得的结果似乎已接近最佳，分析时间约为 5 分钟。

这并不是让人满意的优化结果，因为在第二个和第三个洗脱峰之间还有相当大的时间间隔。重新评价图 6.8，我们注意到在 20% 甲醇条件下，仅用 1.25 分钟所有峰几乎都得到了基线分离。这比用 7.5% 甲醇得到优化结果的速度明显要快得多。但这组条件并不是最初选择要进一步优化的条件，因为很显然，改性剂浓度的微小变化不太可能会引起分离度的明显改善。这是因为在更低 (15%) 和更高 (30%) 浓度下，由于在这个范围内两对色谱峰的洗脱顺序发生颠倒，因此分离度更差。因此，必须将这个作为起点，依赖于温度和压力进一步改善分离。

发现使用高改性剂浓度 (20%) 时，出口压力和温度改变的影响可能是因为改性剂浓度在流动相密度中处于主导地位。通过降低色谱柱出口压力来改善分离度 (未显示)。降低流速也可以改善分离，尤其是对第一对峰而言，可能通过降低柱上的压降和密度梯度来改善。

令人吃惊的是，在这些条件下，温度几乎对保留值和选择性都没有影响。图 6.11 显示了在 2 mL/min，20% 甲醇，100 bar 出口压力，30 到 60 °C 之间采集的色谱图。与图 6.9 相比，在 30 到 60 °C 之间保留值和选择性没有明显变化。分析时间缩短到 3.25 分钟，总分离度更好。最佳温度是尝试的最低温度，而之前的优化发现最高温度是最佳温度。同样，最低压力提供了最佳分离，而之前的优化中则是最高压力提供了最好结果。

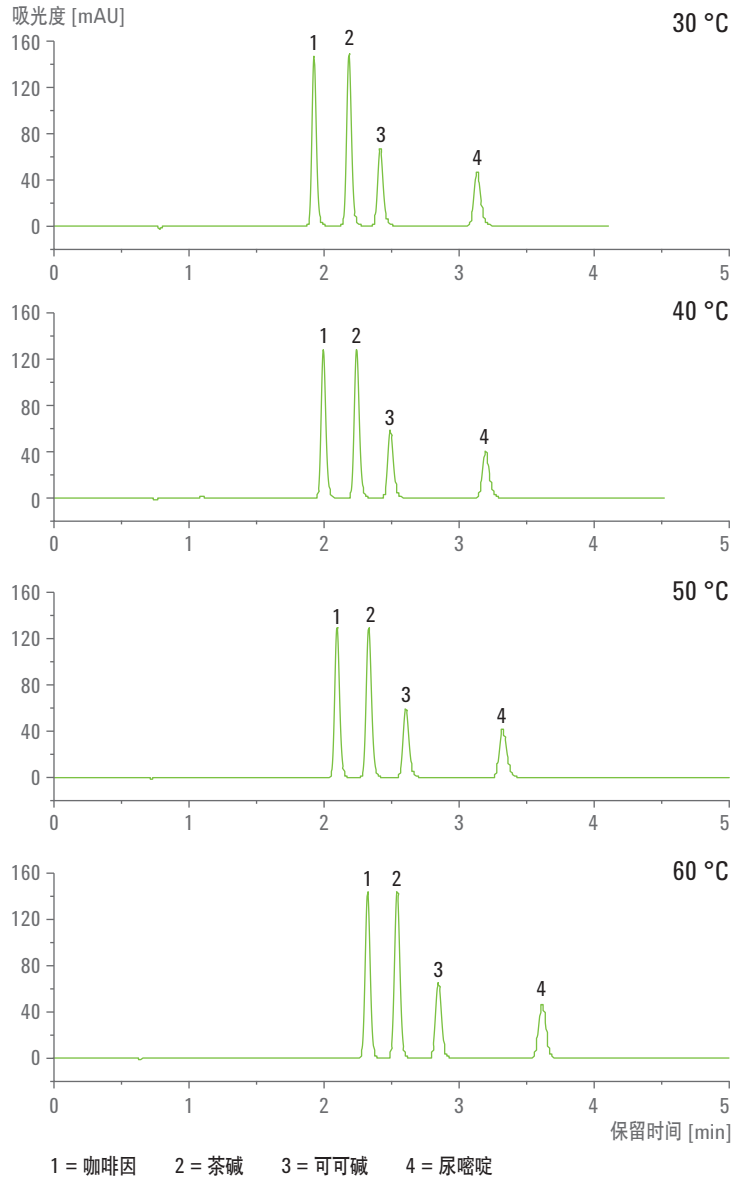


图 6.11 温度的影响，分离条件为 2 mL/min，20% MeOH，100 bar 出口压力。与图 6.9 相比，令人吃惊的是选择性没有发生变化。

对条件进行一些小调整，得到分离度大于 3，运行时间小于 2 分钟这样的速度优化分离，使用条件为 3.5 mL/min，20% 甲醇，60 °C 和 100 bar，如图 6.12 所示。

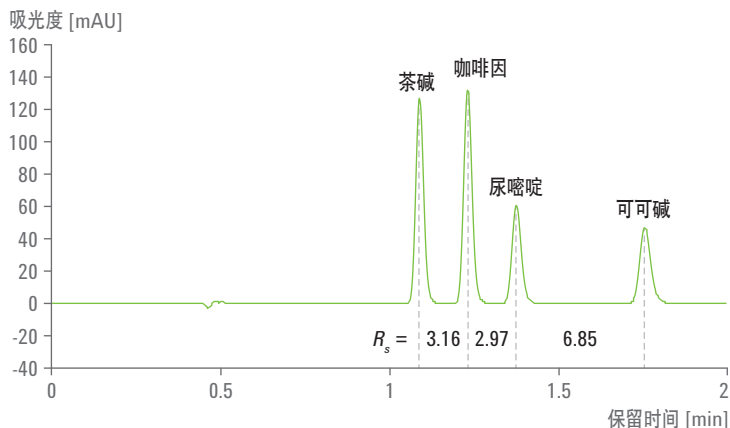


图 6.12 所有峰对的分度度均接近 3 的最快分离。峰下面的数字表示峰之间的分度度。

条件: 3.5 mL/min, 20% MeOH, 30 °C 和 100 bar

6.2.2 痕量分析

由于所有分离都要在速度、分离度和灵敏度之间进行权衡，所以确定分析的目的非常重要。分离度大约或大于 3 的最快分离是采用以下条件获得的：3.5 mL/min，CO₂ 中 20% 甲醇，30 °C 和 100 bar，如图 6.12 所示。但是，如果目标是痕量分析，主要的要求就是达到足够分离度时具有最高的灵敏度，而速度则是次要考虑因素。

通常认为痕量分析的最小分离度应大于 6，在最低压力下 UV 噪音通常最高。图 6.12 中的色谱图是在最低压力下、噪音最大时采集的。而且，从方法开发经验来看，从这个起点似乎不可能将分离度提高到 6 以上。这两个事实提示，具有最高速度的色谱图不可能最适合痕量分析。

制备了相同溶质的另一份标样，其中第二个峰为痕量级浓度，而第一个峰则为主成分，用以研究痕量分析中的典型情况。在这种情况下，微量成分很可能在主成分的尾部（拖尾无法回到基线，像高斯峰一样）。由于可能存在拖尾，所以痕量分析需要这样高的分离度。到目前为止，用 5% 甲醇，50 °C 和 250 bar 的条件使最前面两个峰之间获得了最大分离度，如图 6.8 中的下面色谱图所示。用这些条件作为优化痕量分析的起

点。减少改性剂浓度会增加保留时间，但同时也会提高分离度，这正是希望得到的结果。还发现，温度稍微升高到 60 °C 时，最前面两个峰的分度进一步增大。实验结果发现，涉及最前面两个峰的痕量分析，其最佳分离条件为 4 mL/min，5.5% 甲醇，60 °C 和 250 bar 出口压力，如图 6.13 所示。

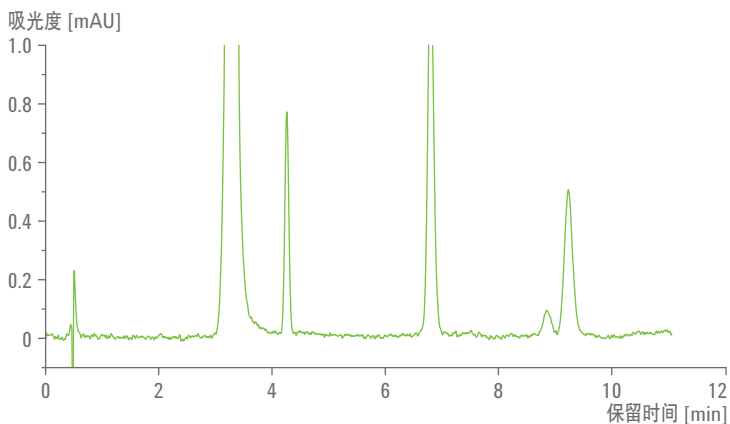


图 6.13 痕量分析的优化。最前面两个峰的分度增大到 8.68。第一个峰峰高约为 800 mAU，第二痕量峰约为 0.8 mAU。所以，小峰约为大峰的 0.1%，信噪比约 60 至 80。估计信噪比大于 10 处的定量限 (LOQ) 为 0.013% 至 0.017%。条件：4 mL/min，5.5% MeOH，60 °C，250 bar

主成分是第一峰，峰高大约 800 mAU。第二个峰在主峰尾部洗脱，这是不希望出现的情况。但主峰和后面的痕量组分之间的分离度为 8.68，可以轻松实现定量。痕量组分的峰高约为 0.8 mAU 或是主峰的 0.1%，信噪比在 60 到 80 之间。主成分的定量限（信噪比大于 10）估计为 0.013% 到 0.017%，差不多优于一般痕量分析所需的定量限一个数量级。

在这个例子中，最前面两个峰的分度可能也超出了要求。稍微增加初始改性剂浓度，分度从 8.68 降低到 6，同时缩短了运行时间。然后，在关键峰对洗脱后，再将流动相组成编程到更高值，更快速地洗脱出其它分离良好的峰对。

可以通过几种方式优化分离。最终的条件很大程度上取决于从哪里开始。在低改性剂浓度下，温度和压力同时改变会引起多个峰顺序颠倒。而在高改性剂浓度下，温度和压力改变不会引起峰顺序颠倒。在固定温度和出口压力下对改性剂浓度从低到高进行编程，可能得到混乱的结果（各种情况的峰顺序颠倒），这取决于程序的速率。这些溶质所出现的峰颠倒数量是很不常见的，但这对于用户了解可能发生的情况非常重要。大多数分离都更为简单。

6.3

案例研究 3 – 磺胺类药物

磺胺类是一类老抗菌素，仍在人类中广泛使用。但目前大多数磺胺药是用作兽药。许多不同种磺胺药仍在使用，但作为这一类的食品残留物已被禁止使用。9 种这类化合物的结构见图 6.14。虽然所有这类化合物结构的一侧都是相同的，但另一侧却含有范围广泛的不同官能团。

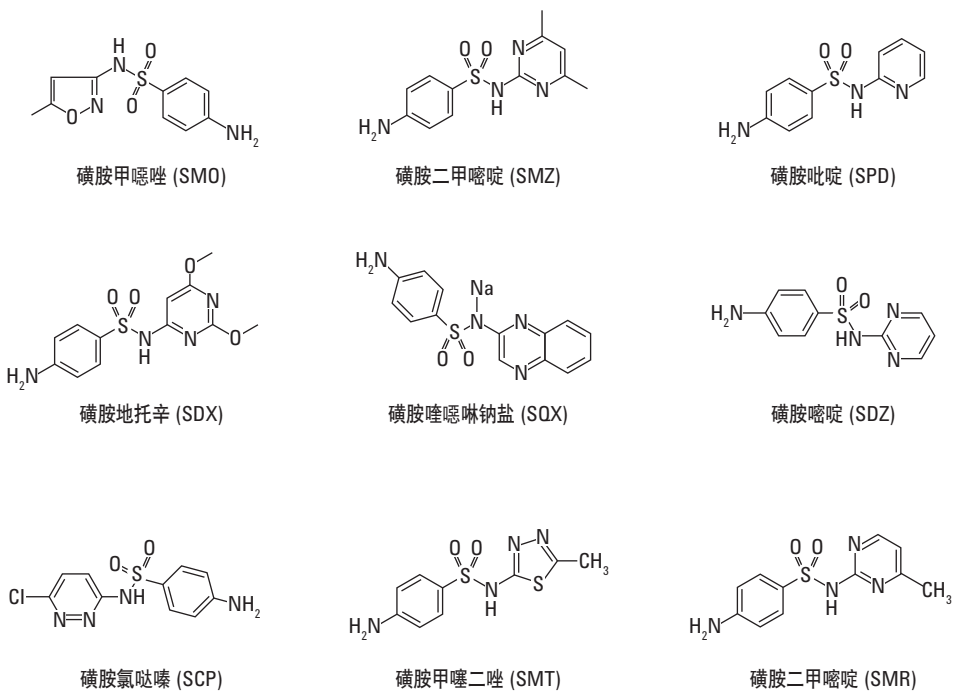


图 6.14 9 种磺胺的结构

这是一种有挑战性的样品。这些化合物中等极性，如图 6.15 所示，仍然不需要添加剂。但分子相似性使其一直很难被分离。两个峰之间可以接受的最小分离度是 1.5，这成了方法开发的实际目标。

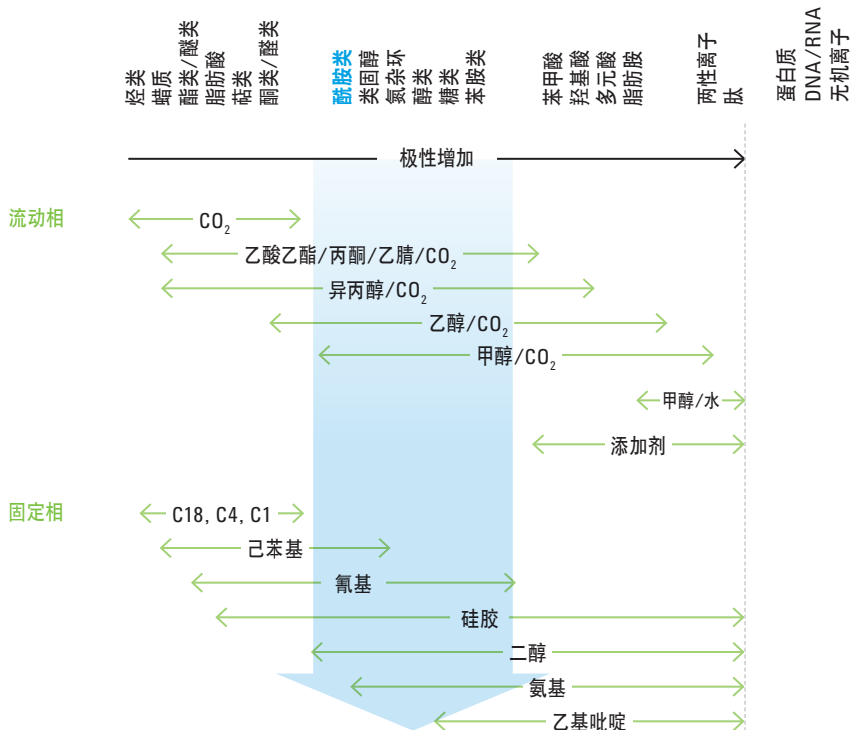


图 6.15 展示流动相和固定相选项的硅胶类相对极性

分离这 9 种相似化合物的初始条件⁷⁹ 为：2 mL/min 甲醇改性的 CO₂，梯度从 5% 到 30%，50 °C，出口压力 150 bar，使用 3 x 100 mm，1.8 μm RX-SIL 色谱柱。预试验显示，混合物中的所有化合物在合适的甲醇浓度下被洗脱，但有几个是共洗脱。峰形比较合理，因而不需要添加剂。几种化合物的峰有轻微的前伸。将样品溶剂从甲醇换成异丙醇，明显改善了峰形。

所有化合物均洗脱出，但间距较密，对温度和压力变化的响应不同。为改善某几对峰之间的分离度而改变某一个参数，但却降低了其它峰对之间的分离度。在这里使用了另一种数据表示形式，即四对最难分离峰之间的分离度对每个流动相变量作图。

无论所用改性剂的百分比如何，在最初尝试的温度和压力下，混合物都不能完全分离。改性剂浓度为 13% 似乎能提供最佳结果，但分离还是不完全。先升高温度，然后再降低 10 °C，以确定选择性是否改变。结果发现，降低温度有助于改善峰形和分离度。进一步将温度降低到 30 °C，所有溶质至少得到了部分分离。

再次对改性剂浓度进行优化。在 30 °C 和 150 bar 下，用四对难分离峰之间的分离度对 8.5% 到 11% 的窄范围改性剂浓度作图。从图 6.16 中可以看出，4-5 和 5-6 两对峰的分度随着改性剂浓度降低而得到改善。6-7 峰之间的分度降低，而 3-4 峰之间的分度保持不变。只有在 8.8% 和 9.8% 改性剂之间时，所有峰对的分度都大于 1.5。图 6.16 中的垂直虚线表明，所有峰对之间最大分度是在 9.2% 甲醇处获得的。

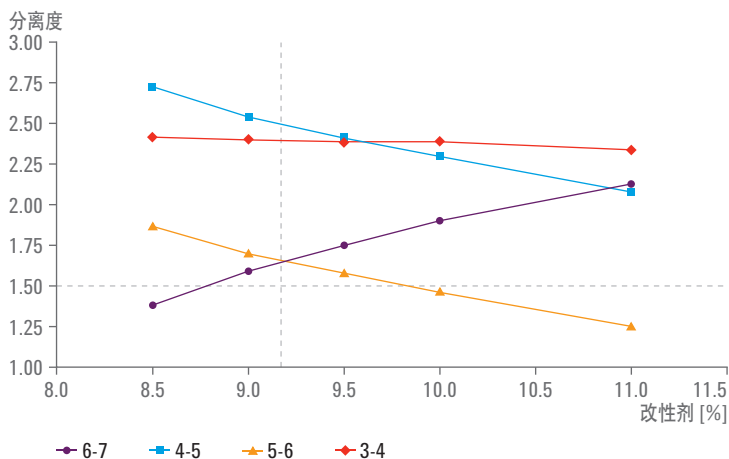


图 6.16 甲醇浓度对 9 种磺胺混合物中 4 个关键峰对的分度影响。所有峰对的最高分度都是在 9.2% 甲醇处得到的。在 8.5% 到 11% 窄范围改性剂浓度之间，某几对峰的分度增加，而其它则降低

接下来，在 9.2% 甲醇和 150 bar 条件下，在 25 到 40 °C 之间改变，再次以峰对之间的分离度对温度作图。结果如图 6.17 所示。结果表明，在 40 °C 下 6-7 峰共洗脱，最好的总体温度是 30 °C。

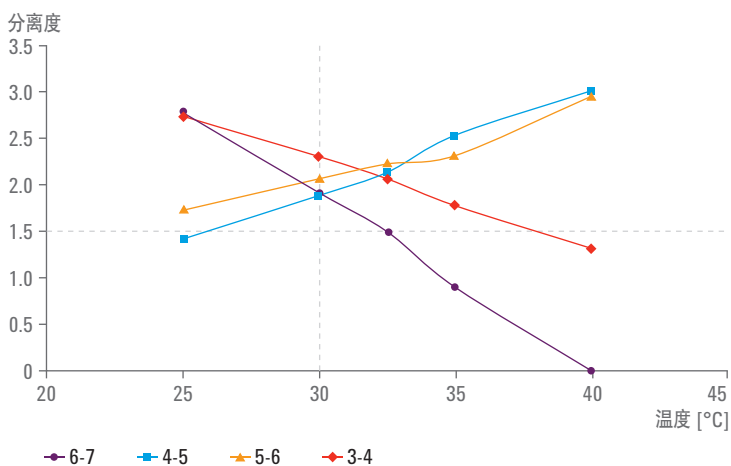


图 6.17 柱温对 9 种磺胺混合物中 4 个关键峰对分离度的影响。在所研究的 15 度温度变化范围内，某些峰对之间的分离度增加，而另一些则显著降低。在 30 °C 下得到了最高的总体分离度

然后在 100 到 180 bar 之间改变压力，用峰对之间的分离度对压力作图。结果如图 6.18 所示，压力降低到 110 bar 时分离度改善，但继续降低压力则分离度变差。因此，在 110 bar 时可获得约为 2 或大于 2，这对所有峰对来说是最好的总体分离度。压力对选择性有这么大的影响很不寻常，但改性剂浓度相当低，并且改性剂只是中等极性。最佳总分离度的最后优化条件为 1.7 mL/min，9.2% 甲醇，30 °C 和 110 bar。

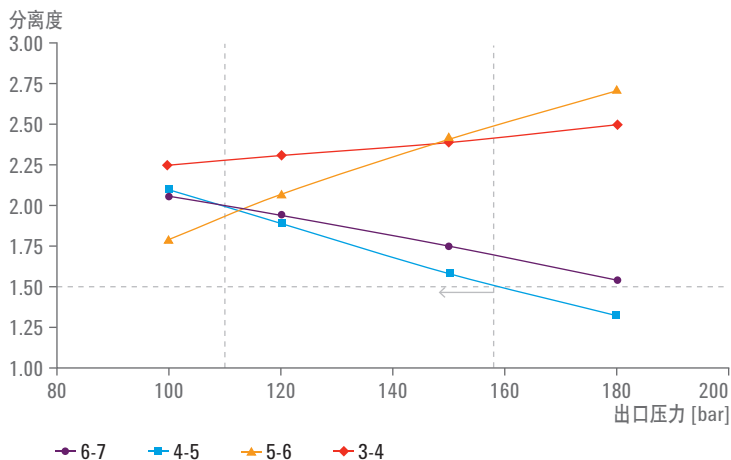


图 6.18 色谱柱出口压力对 9 种磺胺混合物中 4 个峰对分离度的影响。在 100 到 180 bar 之间，某些峰对的分离度增大，而另一些则减少。在 110 bar 时得到了最高的总体分离度。

然后进行进一步优化。改变流速。由于此前分离度高于 1.5，因此我们将分离度等于 1.5 设为分析目标，可以牺牲超过部分的分离度来换取速度，以得到更短的分析时间。四对峰对流速作图，结果如图 6.19 所示。在分离度降低到 1.5 之前，流速可以提高到 2.9 mL/min，分析时间缩短了 40%。速度优化的分离见图 6.20。

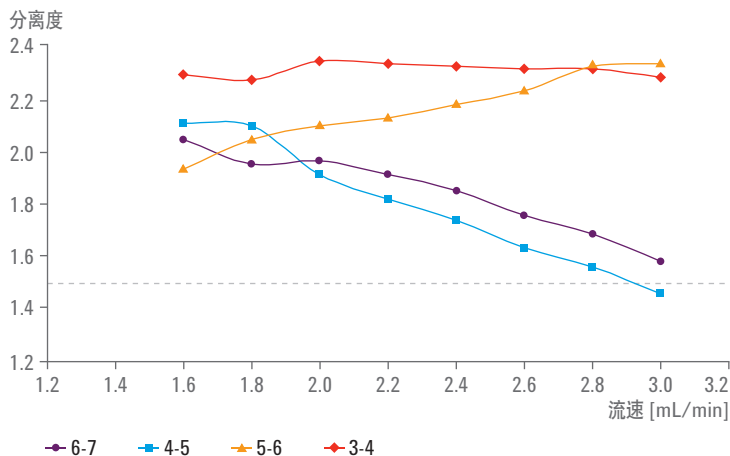


图 6.19 流速对 4 对关键色谱峰对的分离度影响。虽然最佳总体分离度（所有峰的 $R_s > 2$ ）是在 1.7 mL/min 流速下获得的，但可以接受的分离度 ($R_s > 1.5$) 可以在 2.9 mL/min 下得到，分析时间缩短了 40%

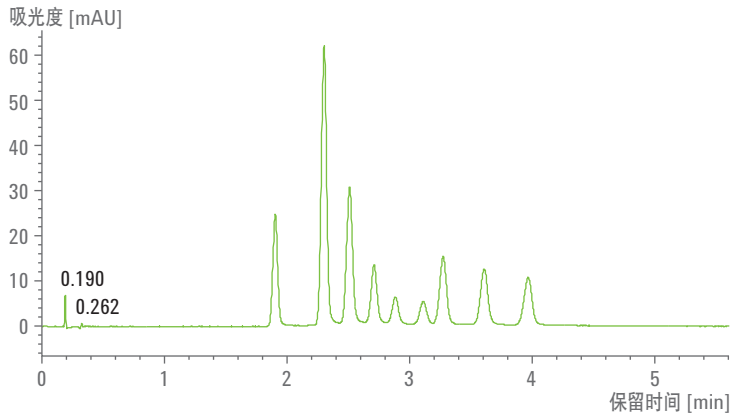


图 6.20 9 种磺胺药的优化分离，所有峰对的 $R_s > 1.5$ 。色谱柱：3 x 100 mm，1.8 μm RX-SIL 柱。条件：2.9 mL/min， CO_2 含 9.2% 甲醇，30 $^\circ\text{C}$ ，110 bar。流通池：3 mm，2 μL 锥形。样品定量环：1.25 μL 。检测器：信号 260 nm，16 nm 带宽，参比 360 nm，40 nm 带宽，狭缝 16 nm，滤光 > 0.05 分钟

6.4 其它结果

上面所有研究实例均未使用添加剂。但是，需要或不需要添加剂通常是显而易见的。任何样品的第一次进样能产生比较对称的峰，不需要使用添加剂，而如果得到严重变形峰，或是未洗脱的，则需要使用添加剂。一旦流动相中含有添加剂，其对保留值或选择性几乎都没有影响。

7.1 背景

过去 15 年来, SFC 主要用途是用于制药行业的手性分析和半制备分离, 在石油化工、聚合物、表面活性剂、农药和食品等行业中也有少量应用。大多数小分子药物都具有手性, 即, 它们以互呈镜像的几种形式存在, 称为对映异构体。在自然界中, 许多化合物只有其中一种存在形式。但在实验室合成中, 它们一般都是以等量浓度的各种形式存在。含等量浓度对映异构体的混合物, 称为外消旋体。

众所周知, 许多化合物的各对映异构体都具有不同的生理作用。例如, 布洛芬的其中一种对映异构体就比其他异构体的抗炎作用小得多。纯的良好对映体药效更强, 因为其剂量相当于外消旋体的两倍, 因此起效更快, 效果更强。另外, 纯对映体只需外消旋体一半的剂量就能发挥同样的药效, 但毒副作用更低。

某些对映异构体可能像萨力多胺一样具有危险性, 萨力多胺的其中一个异构体会导致先天畸形。因此, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 和其他监管机构要求完全检出任何外消旋体中的每一种对映异构体。

因此, 可为以外消旋体形式销售的老药重新申请专利, 以纯对映体形式重新推出。这将为经过临床试验的药物再提供一个 20 年的专利保护, 并且能够更容易、更快速地推向市场。制药公司立即认可了这一经济激励, 开始开发纯对映体药物。今天, 大多数新的手性药物都是以纯对映体形式销售。

纯对映体通常通过一系列不对称合成开发而得, 其中每一步都意在只生成一种对映异构体。合成步骤从小的结构骨架开始, 经过一系列步骤, 逐渐增加体积和官能团, 直到得到最终产物。在合成的每个阶段中, 都需要对中间产物进行对映体纯度监测, 以确保此合成步骤可为下一合成步骤生成合适的纯物质。因而, 分析型和半制备型手性色谱的使用大量增加。

7.2

对映体过量测定

如果目标是开发纯对映异构体，则需要对其他对映异构体进行定量测定。因此，此类痕量分析很常见。分析中使用对映体过量来衡量不对称合成或手性分离是否成功。定义对映体过量 ee 最常用的是公式 7.1，其中 R 和 S 是两种对映体。

$$ee = 100 \left(\frac{R - S}{R + S} \right)$$

公式 7.1 计算对映体过量。

7.3

用于手性分离的正相技术

正相 HPLC 与反相相比，对对映体和其他异构体的分离效果更好，过去这是大多数实验室进行手性分析时使用的常规方法。但是，许多正相分离都是采用庚烷与其他有机溶剂（如异丙醇）混合作为流动相。庚烷具有严重的火灾隐患，尤其是大量使用时，而且也非常昂贵。少量水对正相 HPLC 保留时间重现性具有很大影响，平衡需要很长时间，正相分离中很少使用梯度。另一方面，SFC 的分析速度甚至比反相 HPLC 还要快至少 3 到 5 倍，而且没有痕量水、或再平衡等问题，如前所述 CO_2 也很便宜。而且，溶解在 CO_2 中的改性剂几乎不可能燃烧。

SFC 在药物研发中的主要优势是可以放大到半制备规模，一次进样可以含多达 100 mg 的外消旋体混合物，并保留了分析型 SFC 在速度和压降方面的优势，与正相 HPLC 相比，易燃性更低。SFC 分离结束时，大多数流动相都可以蒸发，剩下含有纯对映体的小体积改性剂，大大加速和简化了干燥过程。对于获得的纯对映体，首先需要使用分析型手性色谱证明其纯度，然后即可用作下一阶段合成的原料。在某些情况下，必须对每个纯对映体的纯单体形式进行吸收、代谢和毒性 (ADMET) 研究。因

为百分之九十的潜在药物会不合格，相对于开发一系列不对称合成步骤生产每个纯对映体来说，此方法更快速、更廉价，它只需要制备少量外消旋体混合物，进行对映体色谱分离。因此，只有对成功的化合物才需要花费时间和经费开发一系列不对称合成方法。

SFC 进行手性分离的优势显而易见，许多较大的制药公司都认可这一点，许多公司都已将大多数手性分离从使用正相 HPLC 转为 SFC。

例如，2005 年，White⁸⁰ 使用 4 种 4.6 x 100 mm 短柱（ChiralPak AD-H 和 AS-H，以及 ChiralCell OD-H 和 OJ-H），2.5 min 内 15 到 55% 的梯度（周期时间 6 min），5 mL/min，120 bar 和 35 °C。他预先选择了改性剂和添加剂，以最大限度地减少手性固定相使用于无效的改性剂和添加剂组合中。对于碱性溶质，他在甲醇、乙醇或异丙醇中使用了碱性添加剂。但是前两种都不能提供良好分离，因此只选择了异丙醇。对于酸性溶质，他用 0.1% 的三氟醋酸代替了碱。在一整年的时间内，White 向其分析服务实验室提交了几百个样品，对 SFC 和 HPLC 方法作了比较，确定应该用哪种技术进行放量纯化。年终时，他发现 SFC 在 96% 的分离应用中表现突出，因而决定在今后的所有工作中将其作为首选筛分技术。作为进一步的结果，可以接受的最大纯化量从 5 到 60 克不等（快速色谱分离、快速干燥、更安全）。

在参与评估的化合物中，有 64% 采用 ChiralPac AD-H、10% 采用 ChiralCell OD-H、17% 采用 OJ-H、9% 采用 AS-H 获得基线分离（均购自手性技术公司）。切换色谱柱时，他花了 1 min 的平衡时间，切换溶剂时，花了 5 min 的平衡时间。因此，一个溶质可以在 4 根色谱柱上，用一种改性剂-添加剂组合，在 19 min 内进行筛分。溶质可以在所有 4 根色谱柱上，用三种不同的改性剂-添加剂组合，在 54 min 内筛分。

Maftouh⁸¹ (2005) 还用 4 根色谱柱通过多达 6 种不同溶剂执行了筛分。色谱柱采用手性技术公司的 10 μm 粒径 4.6 x 250 mm 柱，固定相为 ChiralPac AD 和 AS，以及 ChiralCel OD 和 OJ，与 White 使用的固定相相同。他也和 White 一样，预先为每种溶质选择了流动相组合。使用纯的甲醇和异丙醇，或者含三氟乙酸或异丙胺。碱性、中性和两性溶质用含改性剂和异丙胺的 CO₂ 洗脱。酸则用含改性剂和三氟醋酸的 CO₂ 洗脱。

500 种专利手性化合物的成功率为 AD 60%、OD 31%、OJ 8% 和 AS 2%，这 4 种色谱柱的总成功率为 95%，另外一大批市售药物的成功率为 98%。分离条件为 3 mL/min，200 bar 和 30 °C，用改性剂梯度洗脱。SFC 用作首选分析工具，而毛细管区带电泳 (CZE) 则为备用技术。

7.4 可控变量对手性分离的影响

手性分离的进行或多或少与非手性分离相似。但在大多数情况下，溶质存在于简单的混合物中，常常只含有目标对映异构体。

7.4.1 每个变量的相对效果

实验用 Lux Celulose-1 柱分离华法林，用含甲醇的 CO₂ 洗脱，考察了改性剂浓度、温度和压力的影响。所有结果见图 7.1，再次表明，改性剂浓度是调节保留值的主要手段。温度和压力对选择性或保留值的影响都不太大，分析中表现出温度越低分离度越高的轻微趋势。

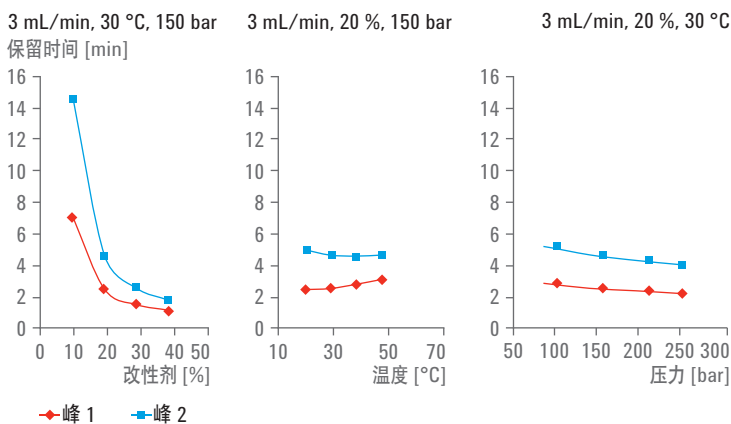


图 7.1 流动相参数对华法令对映体分离的影响

7.4.2 常用的改性剂

与非手性分离一样，甲醇是能与 CO₂ 完全混溶的极性最大的溶剂。同样，在尽力确保洗脱所有样品组分时，它通常也是首选的改性剂。许多手性化合物（特别是起始原料和中间体）极性都不太大，常常在接近死体积的条件下洗脱，即使用低浓度甲醇时。这种情况下最明确的选择是降低改性剂的极性。常用的方法是尝试乙醇，如果乙醇太强（即使浓度为 5% 时极性仍过强），则可以选择异丙醇。为了分离更低极性的溶质，可以将相对低浓度的异丙醇（5 到 10%）加入到庚烷中，用泵输送此混合物作为改性剂。通过这种方法，能够可重现地输送相对低浓度的极性改性剂。

7.4.3 键合相和不常用的改性剂

过去，许多溶剂都不能用作改性剂，因为许多成功的老式固定相不是键合相，而是用纤维素或淀粉衍生物涂敷而得。遗憾的是，许多潜在的溶剂（如二氯甲烷和四氢呋喃）可能会洗掉固定相。而且，某些溶质在传统溶剂中溶解度较低。最近几年，生产键合（固定化）相方面有了显著成效⁸²⁻⁸⁵，这些固定相可以使用更广泛的溶剂。

制造商们最初尝试过复制旧固定相的选择性，但没有成功。但是，键合相可适用于范围更广的溶剂，从而能够更多地控制分离，并可以明显改善溶解度。不过，这些新键合相在筛分上还没有明显取代旧固定相，而是主要用于次要筛分⁸⁴，尤其是用于在传统溶剂中溶解性较差的溶质。

7.4.4 添加剂的必要性

在非手性 SFC 中，许多手性化合物（特别是脂肪胺）需要在流动相中加入高极性添加剂才能改善峰形。阿得拉是一种用于治疗注意力缺失紊乱的市售产品，主成分是 D-苯丙胺，含有少量 L-对映体。脂肪伯胺如图 7.2 所示。上图是用不含添加剂的 30% 甲醇洗脱得到的色谱图，未见洗脱峰。但在同样的 30% 甲醇中加入 0.2% 三乙胺后，即得到了快速而高效的分离。溶质保留值对改性剂的浓度高度敏感，通常在手性 SFC 分离中，将改性剂浓度加倍，保留时间的偏移会超过一倍。

30 % MeOH,
无添加剂

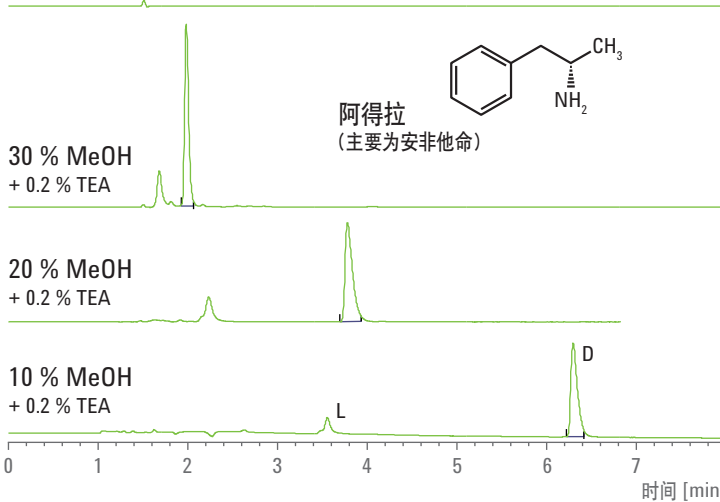
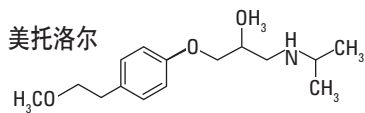
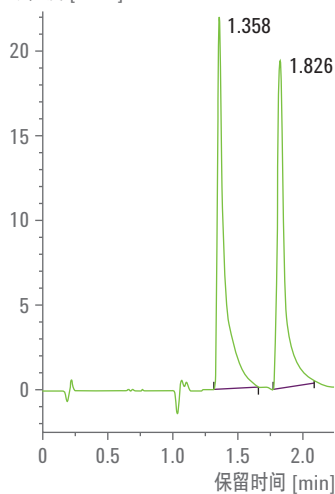


图 7.2 安非他命（一种脂肪伯胺）非外消旋体混合物的分离，无添加剂时无洗脱

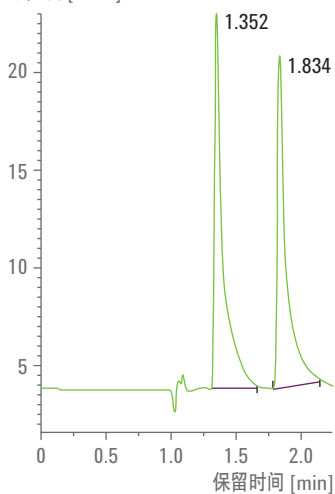
第二章“流动相”中曾大概提到，空间位阻对保留值有明显影响。美托洛尔是一种仲胺，如图 7.3 所示。异丙基阻止了氮上的孤电子对与固定相接近，这使得 30% 的甲醇能够洗脱并快速分离对映体，但会出现严重拖尾。在甲醇中添加 0.1% 的醋酸时，峰形或保留值没有改变。但换用 0.1% 的三乙胺则会得到对称峰，并可在不影响分离度的情况下明显缩短运行时间。



无添加剂
吸光度 [mAU]



0.1 % 乙酸
吸光度 [mAU]



0.1 % TEA
吸光度 [mAU]

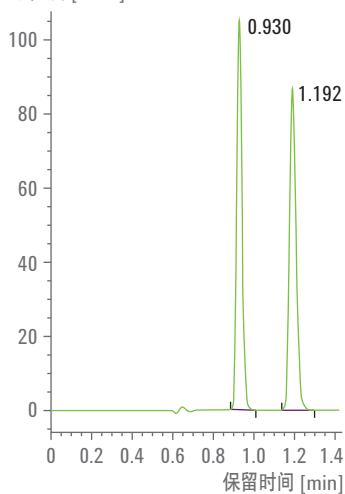


图 7.3 添加剂对美托洛尔（一种仲胺）峰形的影响。左图：纯 MeOH，3 mL/min，30%，30 °C，120 bar；中图：同样条件，但在甲醇中加入了 0.1% 的冰醋酸。右图：同样条件，但在甲醇中加入了 0.1% 的三乙胺。色谱柱：4.6 × 250 mm，5 μm Regiscell

位阻较小的脂肪叔胺氮平，采用不含添加剂的 40% 甲醇无法洗脱，见图 7.4。但添加了三乙胺后，可洗脱出尖锐峰，但几乎无保留 (k 约等于 1) 或分离度。降低改性剂浓度后，保留值和分离度均显著增加。

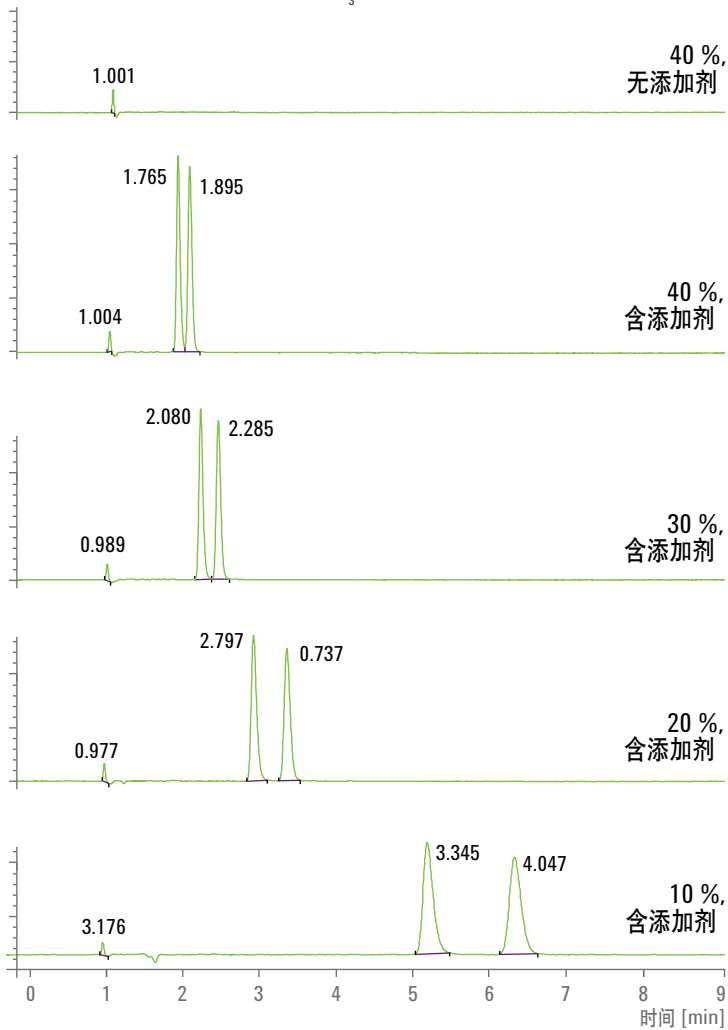
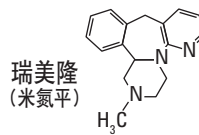


图 7.4 添加剂存在与否及改性剂浓度对叔胺米氮平分离的影响，无添加剂时无洗脱。
3 mL/min, 各种百分比的 MeOH + 0.1% TEA, 40 °C, 150 bar。4.6 x 250 mm,
5 μm Chirapak AD-H

有趣的是，请注意，这三个示例均需要添加剂，这与图 6.11 所用化合物的性状极为不同，那里的氮在环上，氮的孤电子对既与 C-C 键共轭，又与碳氧双键共轭。在那些示例中，不需要添加剂。

应该记住的是，添加剂强烈地吸附在固定相上，可能很难，甚至无法洗出。对于可以去除的添加剂，应注意不要直接从酸更换为碱，反之亦然，这样可能会产生不可重现的结果。还要注意，使用添加剂后某些手性固定相将发生不可逆的改变。许多分析人员都拥有两套色谱柱，一套用于酸，另一套用于碱。

7.4.5 温度

对映异构体的化学结构相同，彼此的区别只是在形状上。降低温度将减少动能，从而有利于提高手性识别。Gasparinni⁸⁶ 在低至 -50 °C 条件下进行了手性分离，改善了对映体的分离度，但在如此低的温度下，流动相的粘度会变得很大。人们基本认同这样一个规律：低温不会明显提高通量。大多数标准柱温箱的温度下限都在 20 到 30 °C，而且，实际上降低温度会使实验室空气中的水发生冷凝，这也是个问题。所以，大多数 SFC 手性分离都是在 30 到 40 °C 之间进行。

7.5 开发手性方法

7.5.1 选择固定相

实际上我们还是无法预测哪种固定相可以分离特定的对映异构体。因此，合适的手性固定相选择是为了减少试验和错误。目前已开发有筛分系统用于尝试自动化地找到流动相和固定相的最佳组合。最通用的方法是使用自动化的色谱柱和溶剂选择阀，以及允许您能够选择色谱柱和流动相的软件向导，以便对每个特定的化合物进行尝试。

虽然有许多手性固定相可供选择，但 White⁸⁰ 和 Maftouh⁸¹ 只在 4 种旧的涂层固定相上获得了 95% 以上的成功率。许多其他研究者也获得了类似的成功，这就说明，任何初始筛选都可以从比较少量的固定相开始，以便最大限度地减少时间和原料的浪费。非常普遍的做法是一个阀上有 4 到 6 种不同的手性固定相柱，或用两套匹配的阀同时切换。通常是用同一种流动相依次尝试各手性固定相。

其他人还用有有更多通路的阀，或将几个阀串联。例如，Welch⁸⁷报道过使用两个 14 通路的 SFC 系统。每个阀上安装了 5 根色谱柱和一个旁路，可连续评估 10 个独立色谱柱或 2 根串联色谱柱的 25 种组合。其他人还开发了类似的非商用系统，最多用到了 19 根不同的色谱柱。

有人不断用短柱和小粒径填料开发出了更快速的筛选方法。Hamman⁸⁸最近 (2011) 比较了 6 种不同的 4.6 x 50 mm 3 μm 填料柱，采用 1.5 min 从 10 到 55% 的改性剂梯度洗脱，在 55% 处保持 1 min。这些色谱柱为 AD, Cellulose-1, OJ, IC, AS 和 Cellulose-4，有三种不同的改性剂可供选用：甲醇、乙醇和异丙醇。如果溶质是碱，则在改性剂中添加 0.1% 的二乙胺或三乙胺。同样，作者预先选择了改性剂和添加剂组合。作者声称，6 根色谱柱筛选用了 20 min (6 根色谱柱，一种改性剂)。

还有几个平行系统，来自一个大泵的液流被分流成多达 8 支液流，每一支直接通过不同色谱柱。每根色谱柱同时接触到相同的流动相，进样也被分流。实验使用带有最多 8 个多路流通池的特定检测器，或者也可以每个通道各自用一个检测器。因此，实验在一次运行时间内通过最多 8 根不同色谱柱对每个溶质进行了评估。这种系统存在的一个问题就是缺乏通用性。

7.5.2 选择流动相

选择流动相时有两个问题：首先，也是最重要的，是否需要添加剂？第二，需要何种极性的改性剂？

关于添加剂，建议像 White⁸⁰，Maftouh⁸¹，Hamman⁸⁸ 和其他人一样，将溶质按酸性、中性、碱性和两性基团进行分组。如果某手性固定相需要一种添加剂，那么不论溶质是极性还是非极性，所有类似手性固定相都需要该添加剂。自动运行纯改性剂意义不大，需要在初始筛选过程中为每种溶质添加酸性和碱性添加剂，特别是先运行纯改性剂时。使用纯改性剂可能无法洗脱所有溶质，这些溶质会积聚在色谱柱上，有可能改变选择性。

针对每个溶质在酸性和碱性添加剂之间反复切换很有可能引起色谱柱的损坏，产生不可重现的结果，尤其是不遵循更换步骤小心操作时。最保守的方法是针对碱性溶质使用强碱作为添加剂，酸性溶质用强酸作为添加剂，从一种添加剂更换到另一种添加剂时，要小心地进行预平衡。或者，可以使用两套不同的色谱柱，一套用于酸性添加剂，一套用于碱性添加剂。

7.5.3

其他变化

Medvedovici⁸⁹使用 6 种不同手性固定相（3 种类型）对具有多种官能团的 44 种手性化合物进行了筛选，采用含三氟醋酸或三乙胺的 5 到 30% 甲醇进行梯度洗脱。Chiralcel OD 分离了 66% 的峰对。Chiralpak AD 分离了 70% 的化合物。A Chirobiotic V 柱分离了 48%，而 Chirobiotic T 分离了 50%。“刷型”固定相效果不太好，Chirex 3022 分离 34%，Chirex 3005 只分离了 20%。

Welch⁹⁰建立了一个 48 种外消旋体的多样性库，将其专门保存在 96 孔的微量滴定板上，用于评估新的手性固定相。通用的方法是使用含 4 到 40% 甲醇和异丁胺的 CO₂。只使用碱性添加剂。ChiralPak AD-H 基线分离了 60.4% 的溶质，而 OD 分离了 30% 的不同溶质，与 Maftou 的数据几乎一致⁸¹。

在另外一种方法中，Zhao⁹¹在 2003 年将多达 12 种外消旋体混合物混在一起，并用 SFC-MS 基于质谱对峰进行鉴定。酸性、碱性和中性化合物实现了分离。酸性化合物用甲醇和三氟醋酸进行分离，碱性和中性化合物用甲醇和异丙胺进行分离。实验对 4 种不同色谱柱（Chiralpak AD, AS, Chiralcell OD 和 OJ）进行了依次筛选。采用 8 种不同浓度的改性剂在 20 多分钟内对混合物样品进行了分离，起始 40%，每次递减 5%。流速为 2.5 mL/min，温度为 35 °C，出口压力 110 bar。实验报道的成功顺序为 AD—AS—OJ—OD。

还是在 2003 年, Garzotti⁹² 用电喷雾质谱与 SFC 联用, 分离多种外消旋体, 并根据质谱对这些峰进行区分。他使用了 Chiralpak-AD、Chiralcell-OD 和 Chiralcell-OJ 柱, 分离条件为 35 °C, 180 bar 和 2.5 mL/min。据他报道, AD 分离了 80%、OD 分离了 45%、OJ 分离了 50% 所研究的外消旋体。Garzotti 主要使用以异丙胺作为添加剂的乙醇, 进样最多 4 种外消旋体混合物的混合标准品。他表示, 随着温度降低, 立体选择性显著增加, 但压力几乎对分离度没有影响。

上述最有效的手性固定相是非键合固定相, 但限制了可以使用的改性剂范围 (不会将固定相洗出色谱柱)。人们采用新键合固定相尝试复制非键合固定相的选择性, 得到了各种不同结果。并不存在一对一的替代品。但这些新的键合固定相可以使用大多数有机溶剂作为改性剂和样品溶剂, 将逐渐得到普遍应用。

7.5.4 方法开发系统

安捷伦方法开发系统使用 2 或 3 个恒温柱箱, 带有 4 或 6 个独立的热交换器, 可以将温度控制在低于室温 10 °C 至 100 °C。两个柱温箱含有一个 8 位/9 通切换阀, 进行色谱柱选择。系统中可以放置多达 8 根色谱柱。每根色谱柱的入口通过一个热交换器连接到阀的其中一个通口。所有色谱柱的入口都连接到同一个阀, 所有色谱柱的出口都连接到另一个阀。阀切换同步, 将色谱柱依次连入流路中。

几个低散热的热交换器可安装在每个标准热交换器上, 能够显著缩短连接色谱柱与阀所需的管路长度。为了进行快速筛选, 一个柱温箱中可安装最多 4 个低散热的热交换器和 4 根 100 mm 长的色谱柱。每个柱温箱中也可以安装更长的色谱柱, 可以长短柱组合安装。较短的色谱柱可用于快速筛选, 确定适用于分离的最佳固定相, 然后可以用适当的长柱提高分离度。

最近，安捷伦提供了另一种方法，即，使用一个柱温箱配置可以平行连接 5 根色谱柱和一条旁路的阀，使用带有小端口的单阀连接色谱柱入口和出口。此系统明显缩短了连接色谱柱与阀所需的管路长度，降低了柱外谱带展宽。

用 12 位/13 通阀还可以实现溶剂选择自动化，这意味着可以尝试使用最多 12 种不同的改性剂。因此，可以尝试甲醇、乙醇和异丙醇三种改性剂，分别使用纯改性剂、含碱性添加剂或酸性添加剂。色谱柱和溶剂选择阀都可以通过软件进行控制，有助于按顺序快速开发。设置很简单，色谱柱的识别标志将列在一张表里，而改性剂则列在另一张表中。

实际上常规使用的往往是特定、已建立的方法，但并非连续使用。方法开发系统可帮助主要从事不对称合成的一群药物化学家们，不同于大量间歇性使用的机器，或需要为每种不同方法不断地更换色谱柱，此系统可以配置最常用的固定相和流动相。然后每个用户可以提交样品及其方法的名称（色谱柱和改性剂组合）进行自动化分析。

8.1 验证的几个阶段

过去，人们很少将 SFC 用于常规 QA/QC 应用，因为 UV 检测器的动态范围不足以在一次分析中既监测主成分，又监测微小或痕量组分，也鉴于滤波设置大于 0.1 min 时，UV 噪音为 0.5 mAU 数量级，这比 HPLC 要差，最高 50 倍。这意味着，占主成分（吸光度小于或等于 1000 mAU）0.1% 的微量成分，无法在大于 10 的信噪比条件下进行定量。此类定量分析需要使用小于 0.1 mAU 的噪音水平。不久以前，人们通过将 UV 检测器的噪音降低 50 倍在很大程度上解决了此问题，详见第 9 章“仪器注意事项”。常规分析用户在数量上比方法开发用户要多 10 倍，这对 SFC 来说是一个广而新的应用领域。

要进行常规分析，仪器和方法都必须稳定耐用。也就是说，它们必须能够日复一日、年复一年地从实验室到实验室、从仪器到仪器等等，充分执行要求其完成的任务。其中包括动态范围、灵敏度、线性、准确度、精密度和重现性。

关于专门的方法验证有许多内容需要叙述，显然在这短短的章节中所做的任何详细讨论都是不够的。但是，我们提供了一个概要，以及您应如何参考这些内容的建议。

8.1.1 设计认证

设计认证 (DQ) 是关于生产厂商是否理解客户的需求，并按其需求设计仪器。主要是将制造商提供的描述硬件性能的指标表与客户所了解的顾客需求进行对比。

8.1.2 安装认证

安装认证 (IQ) 一般由仪器制造商来做，在其安装仪器之后，他们需要证明该硬件至少初步符合制造商声明的设计指标。最终用户和制造商需要事先就如何描述合格达成共识。流速、压力、温度、范围、精密度、准确度、检测器性能指标等，均在 DQ 过程中预先规定，测量这些参数的方法也需要在 DQ 层面上达成共识。请记住，SFC 与 HPLC 不同，SFC 的流动相具有高度可压缩性。对于流速和 % 改性剂的概念需要谨慎定义。

最好是按照检测方案，用标准色谱柱进行色谱实验，根据标准样品的保留时间和组分之间的分离度来确证性能。如果设计得当，可以经一次检测确证流量准确度、组成准确度、温度准确度、压力控制准确度，等等。

8.1.3 操作认证

操作认证 (OQ) 与常规维护密切相关，常需要定期重复。这里，主要问题是：*在此时，用此方法，该仪器是否在双方约定的性能指标内操作？*这是最初的问题，也是一直持续的问题。同样，用标准测试样品以及标准测试色谱柱（仅用于此目的），可以证明系统是否正常运行。

认证人员有时要使用各种计量器具直接测量温度、压力、流量、组成或其他参数，这些计量器需要用可溯源的标准品至少每年校准一次。但是，这些计量器具的准确度往往还不如使用标准样品和标准色谱柱以及观察色谱结果所达到的准确度和重现性。

8.1.4 性能认证

性能认证 (PQ)，或性能验证 (PV，通常指的是同一件事)，更多的是关于当前仪器方法的质量和仪器使用情况，尽管就实际上是否包含几个子步骤还存在着某些争议。

要验证一个方法，用户需要证明该方法的准确度、精密度、分离度、线性范围和耐用性，能够可重复地获得需要的结果。

关于要获得公认的合格结果，分析方法必须能够达到国际公认的标准。下列实例对各种饮料和一些粘性食品中山梨酸盐和苯甲酸盐（广泛用于食品防腐剂）以及咖啡因的定量方法进行了开发和验证，至少大致涉及了需要的步骤。

后面还展示了用于氟比洛芬手性分离的一个示踪法。

8.2

开发方法用于定量分析饮料和食品中的山梨酸盐、苯甲酸盐和咖啡因

8.2.1

问题表述

为了展示主成分和微量组分的典型常规定量方法，我们测定了多种饮料和食品中的几种防腐剂和咖啡因。苯甲酸和山梨酸及其钠盐、钾盐和钙盐被用作酸性食品中的防腐剂，它们被广泛用于⁹³⁻⁹⁵软饮料、果汁和其他饮料、酱油、番茄酱、沙拉酱和其他加工食品中。这些化合物禁止用于新鲜肉类，但可以用于一些香肠中。它们会抑制霉菌和酵母菌的生长，也能够有效地抑制范围广泛的细菌，因而使用广泛并基本上有益于健康。

山梨酸盐和苯甲酸盐都被认为是安全的。山梨酸盐还有另一个好处，就是它无味，并且比苯甲酸盐的毒副作用低，它可以通过人体代谢。但有一些不良反应已经引起了注意，从而限制了其在食品中的使用浓度。在美国，苯甲酸的限值为小于 0.1%，食品标签上标注为*苯甲酸钠低于 1% 的 1/10*。虽然美国没有针对山梨酸盐的法定限制，但一项国际协议将最大限量设定为 0.3%。欧盟指令 95/2/CE 有更多的限制，如果分别使用，苯甲酸的限值为 150 mg/L (0.015%)，山梨酸为 300 mg/L (0.03%)，如果联合使用，则为 150 和 250 mg/L (0.015 和 0.025%)。这些限值以苯甲酸和山梨酸来表示（而非盐）。

8.2.2

某些背景（插入语）

由于公众关注，而且这些添加剂无处不在，一些国家（包括美国、英国和中国）已制定了最大的年接触量。因此，每年要针对此工作进行大量的分析。作为此类分析项目的一部分，要对这些添加剂在各种食品中的实际量进行常规检测，从而估算出每年总的饮食摄入量。其他几个国家，如巴西⁹⁴、葡萄牙⁹⁶和新西兰⁹⁷，都已进行了类似的研究。

使用过的几种技术包括衍生生化气相色谱法^{98,99}、各种光谱方法¹⁰⁰和毛细管电泳法¹⁰¹。不过，采用离子对 HPLC 法最为广泛^{102,103}，似乎是首选方法。然而，峰形和分离度不够好，分析时间 10 到 20 min¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。实验中仍然使用酸化的乙腈，用 C18 柱分离。人们还在继续开发新的 HPLC 方法。

令人意外的是，没有关于使用 SFC 对食品和饮料中的防腐剂（如，苯甲酸盐或山梨酸盐）进行分析的文献报道，虽然在早期的 SFC 实验中，苯甲酸常作为检测试样，有几篇文章涉及到羟基酸¹⁰⁸和多羧基芳香酸¹⁰⁹的分离。SFC 基本上不用于水样的分析，可以解释为缺乏参考文献。但是，许多样品可以用甲醇稀释、过滤和/或离心，然后无需进一步处理即可进样。

苯甲酸在 227 nm 附近具有最大 UV 吸收，靠近 280 nm 处有一个小的肩峰。山梨酸的最大 UV 波长为 255 nm，咖啡因为 280 nm。当这三种化合物都存在时，许多研究均采用 235 或 280 nm 附近的单一波长进行检测。但最佳检测方法是使用最佳波长比较简单地测定每个化合物的存在。

有时分析样品中也会存在其他的食品添加剂，可能使分析变得更复杂¹¹⁰⁻¹¹³。最常见的是咖啡因、糖精和一种或多种对羟基苯甲酸酯。这些物质可以看做是苯甲酸盐-山梨酸盐分析的干扰物，但通常也包含在检测中。

8.2.3

目的

本工作的目的，是使用 SFC 开发出几种水性饮料和食品中苯甲酸盐、山梨酸盐和咖啡因的定量方法，并展示出验证该方法所需的一个个步骤。

8.2.4

色谱方法的开发

由于没有苯甲酸、山梨酸和咖啡因分离的文献报道，所以需要开发出一个方法。初步研究显示，使用相对低浓度的甲醇作为改性剂，可以洗脱这些分析物，在不使用酸性添加剂的情况下，苯甲酸会出现严重拖尾。经实验证实，三氟醋酸和醋酸都可以改善苯甲酸和山梨酸的峰形。最终选择醋酸进行进一步研究，因为醋酸比较便宜，更通用，更绿色，操作起来也更安全。柱温随意设置在 50 °C，出口压力选择为 150 bar，以避免显著降低压力时引起噪音问题。自动进样器设置为使用 15 μ L 标准品或样品超载进样到 5 μ L 样品环中。

初始实验中采用 ZORBAX RX-SIL 柱，显示用 7.5%（甲醇和 0.3% 醋酸）浓度洗脱时，山梨酸盐和苯甲酸盐之间的分离度仅为大约 1.0，几乎没有保留，而同时，苯甲酸盐和咖啡因之间的时间则过长。

采用为 SFC 酸分离而特别设计的 Premier 柱，得到了卓越的选择性和高分离度，如图 8.1 中的上图所示。但是咖啡因几乎不保留，这些防腐剂的分离需要使用 40% 的有机改性剂。应该避免使用组分在溶剂之前出峰的方法。二醇柱明显改善了分离效果，三个分析物在不到 2 min 的时间内洗脱，两对之间的分离度大于 4 和 2.64，只需要 8.5% 的流动相（甲醇和醋酸），如图 8.1 中的下图所示。

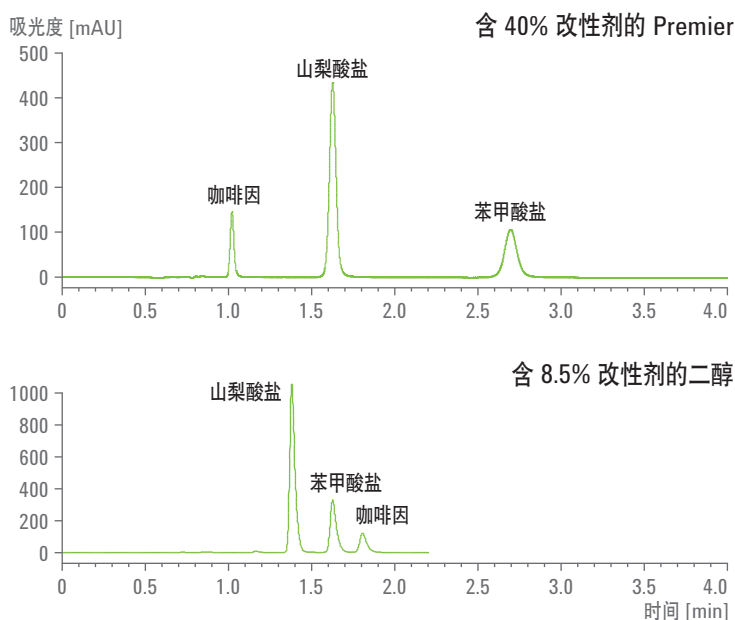


图 8.1 高浓度苯甲酸盐、咖啡因和山梨酸盐的分离。上图：分离采用 Premier 4.6 x 250 mm, 5 μ m SFC 柱，流速 3.5 mL/min，流动相为 40% MeOH CO₂（含 0.3% 醋酸），50 $^{\circ}$ C，出口压力 150 bar。下图：在 4.6 x 250 mm, 5 μ m 二醇柱上进行同样的分离操作，除 8.5% 改性剂外，其他条件相同。进样 5 μ L，235 nm，16 nm，狭缝滤波大于 0.03 min。二醇柱上的分离度大于 4 和 2.64

Premier 柱上的保留顺序与二醇柱上的顺序不同，在选择性上如此大的区别可以帮助确证没有干扰峰与溶质共洗脱，因为这两种方法是交叉互补的。组成、温度和压力改变时，所得值会略有升高或降低，说明保留时间和分离度稳定可重现。由于用 8.5% 改性剂得到的分离度大于 1.5，所以认为该方法可以用于主成分和微量组分的分析。

8.3 校正

为了对此方法进行验证，需要生成校正曲线。标准品浓度值、每个标准品的进样次数、每个标准品的分析精密度、校正曲线的线性 and 线性范围，都需要进行评估，并证明是足以满足要求。

8.3.1 设计符合分析要求的 校正曲线

校正曲线应包括至少在预期结果 $\pm 30\%$ 范围内的标准品，应准备有几个比预期结果浓度更高和更低的标准品。通过这些边界条件，试图为本示例中选择的分析物绘制适当的校正曲线是行得通的。

美国苯甲酸盐的法定限值为低于 1% 的 1/10，或低于 0.1%。这里，将水样按 3:1 稀释，避免出现水和流动相之间的不混溶问题，因而，样品中检出的上限应低于 0.25 mg/mL。制作校正曲线的最高浓度为 0.5 mg/mL，或预期最高值的两倍。实验还制备了 0.35, 0.25, 0.15, 0.075, 0.05 和 0.025 mg/mL 的标准品，以及浓度或高或低于预期值的几个标准品。

山梨酸盐没有法定限值，但一项国际协议规定最大允许量应小于 0.3% (3 mg/mL)。与苯甲酸盐相同，样品也按 3:1 稀释，因而校正曲线的上限应该是 0.75 mg/mL 的 1.3 到 1.5 倍。

有法规要求，加到许多饮料中的咖啡因量必须列在标签上，标签上通常会以包装罐中咖啡因总重量列出咖啡因的含量。对于要检测的样品，其列出的咖啡因含量值在 0.0529 到 0.336 mg/mL 之间，所以将 0.5 mg/mL 作为校正曲线的上限即可，但还需要将校正曲线范围扩展到较低值，因为饮料中所含的浓度范围很宽。

每种饮料和食品中都有 1、2 或 3 种分析物存在，意味着会经常缺少一种或多种分析物。因此，人们希望（但非必需）评估每个样品中每种分析物的检出限和定量限。大部分样品都既含有山梨酸盐又含有苯甲酸盐，但我们对明显低于法定或推荐限值的山梨酸盐或苯甲酸盐浓度不感兴趣。但是，据报道，有几种饮料中存在浓度范围较宽的咖啡因，因此校正曲线进行了扩展，覆盖到最低的预期浓度。

8.3.2 制作校正曲线

实验总共用了 7 个标准品和一个空白，覆盖了所检测的浓度。标准品中含等浓度的所有三种分析物。每种分析物都在其最大吸收波长下进行监测，标准品覆盖 0.025 到 0.500 mg/mL 之间 20 个浓度的动态范围。

8.3.2.1 精密度

每个浓度进样 6 次测定各标准品的分析精密度，计算保留时间和峰面积的 RSD。三个分析物保留时间的 RSD 平均为 0.048%，最大值 0.08%，如表 8.1 所示。

浓度	山梨酸盐			苯甲酸盐			咖啡因		
	平均值	SD	RSD [%]	平均值	SD	RSD [%]	平均值	SD	RSD [%]
0.5 mg/mL									
RT	1.3768	0.000373	0.03	1.6215	0.000548	0.03	1.7998	0.001169	0.06
峰面积	3337.0	4.3191	0.13	855.2	0.7183	0.08	707.3	0.9208	0.13
0.35 mg/mL									
RT	1.3767	0.00047	0.03	1.6222	0.00040	0.03	1.7982	0.00098	0.05
峰面积	2408.2	5.5694	0.23	605.27	2.0519	0.34	497.9	1.4125	0.28
0.25 mg/mL									
RT	1.3763	0.00047	0.03	1.623	0.00081	0.05	1.7955	0.00104	0.08
峰面积	1757.5	1.5302	0.09	439.23	0.5465	0.12	360.03	0.5316	0.15
0.15 mg/mL									
RT	1.376	0.00057	0.04	1.6234	0.00051	0.03	1.794	0.00063	0.04
峰面积	1051.13	0.69186	0.07	261.9	0.54406	0.21	213.73	0.41312	0.19
0.075 mg/mL									
RT	1.3752	0.00068	0.05	1.624	0.00063	0.04	1.7923	0.01033	0.06
峰面积	513.23	0.5750	0.11	128.12	0.2562	0.20	104.4	0.2280	0.22
0.05 mg/mL									
RT	1.3737	0.00094	0.07	1.6242	0.00075	0.05	1.7895	0.01049	0.06
峰面积	322.77	0.1505	0.05	80.38	0.3600	0.45	65.33	1.1032	0.16
0.025 mg/mL									
RT	1.3738	0.00098	0.07	1.6242	0.00098	0.06	1.7888	0.00098	0.05
峰面积	174.95	0.2429	0.14	43.75	308.22	0.07	35.67	0.1663	0.46
空白	全部 000								

表 8.1 在 0.025 到 0.5 mg/mL 浓度范围内制作校正曲线，山梨酸盐、苯甲酸盐和咖啡因标准品各 6 次进样获保留时间和峰面积的平均值、标准偏差及 RSD。由于分析时间短，包含 7 个标准品和 1 个空白、48 次分析的校正曲线大约用了 2.4 小时，一次等度分析时间为 3 分钟

峰面积的 RSD 均低于 1%，也如表 8.1 所示。正如预期，高浓度标准品的 RSD 值相对较低，一般低于 0.25%。在浓度范围的底端，RSD 变得较大，但仍低于 1%。结果证明，两套检测都可以用于预期范围内的分析物定量。

8.3.2.2 线性

对各分析物每个浓度的峰面积平均值作图，将数据进行线性回归。峰面积对浓度作图得到具有不同斜率的直线，如图 8.2 所示。线性回归显示所有三个示例中的线性相关系数均大于 0.999，如表 8.2 所示。线性相关系数大于 0.990 即为可以接受，截距相对较小。

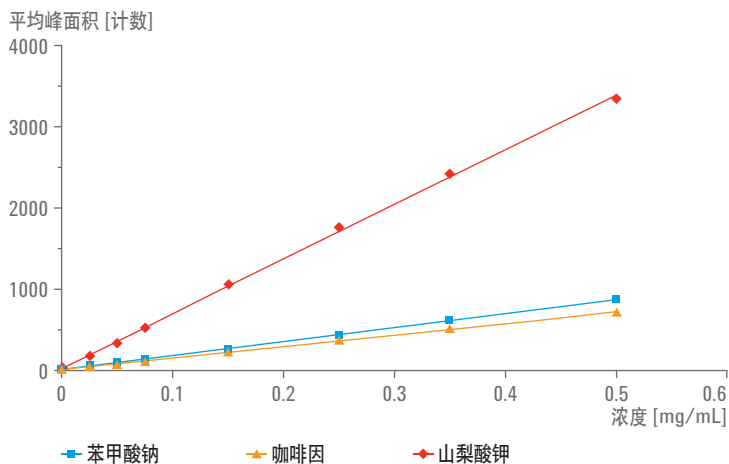


图 8.2 分别在 255、235 和 280 nm 波长下，得到的山梨酸钾、苯甲酸钠和咖啡因的校正曲线

二醇柱, 5 μm , 4.6 x 250 mm			
	山梨酸盐	苯甲酸盐	咖啡因
r^2	0.999574	0.999876	0.999925
斜率	6750.76	1721.29	1422.41
截距	14.23	0.51	-0.88

表 8.2 本分析所用苯甲酸盐、咖啡因和山梨酸盐三条校正曲线的线性相关系数、斜率和截距。线性良好，截距可接受。每个分析物的数据均在不同波长下采集，山梨酸盐 255 nm，苯甲酸盐 235 nm，咖啡因 280 nm

8.3.3

样品

8.3.3.1

饮料

我们对从当地市场上随意购得的 15 种市售瓶装饮料进行了分析。每个样品约取 20 mL，置于 40 mL 闪烁计数瓶中。碳酸饮料盖紧盖子剧烈振摇，但不搅拌，使其部分脱气。轻轻松开瓶盖，让气体溢出。然后重新拧紧瓶盖，再次振摇，总共进行三次。接着，对所有样品超声处理 12 min。

每个样品用 Eppendorf 移液器各取 1 mL，转移至 25 mL 塑料烧杯中，然后加入 3 mL 甲醇。用表面皿盖住烧杯，超声处理 12 min。每个样品约取 1.5 mL，转移到 2 mL 棕色自动进样样品瓶中，压紧带 PTFE 衬垫的钳口盖，进行分析。

8.3.3.2

食品

许多食品样品粘度较大（如，番茄酱）或含显着量固体物质（意大利沙拉酱）。对于这些样品，称取 1g，置于 40 mL 闪烁计数瓶内，加入 10 mL 酸化的甲醇。充分振摇样品 30 秒钟，超声处理 12 分钟。放置溶液待其沉淀，将上清液转移到 15 mL 带塞的离心管中。将样品离心管以 3200 rpm 的转速离心 10 min。取大约 1.5 mL 上清液转移到棕色样品瓶中，与其他样品同法处理。所有标准品和样品均在制备后的几个小时内进行分析。

8.3.4

样品的分析

与标准品相似，每个样品也进样 6 次，并测定 RSD。标准品和样品在一个序列中进行分析，每个样品一般以多种盐形式中的其中一种存在，准确的定量分析取决于标签上列出的是哪种盐，进行相应的校正。

8.3.4.1 饮料

图 8.3 为茶的典型色谱图，其中几乎没有咖啡因。滤波设置大于 0.03 min 时，噪音为 0.05 mAU 左右。检出的咖啡因浓度为 0.035 mg/mL。因此，用这种方法测定咖啡因的定量限（S/N 大于 10）应约为 0.0105 mg/mL。S/N 大于 3 的检出限应为 0.0032 mg/mL。

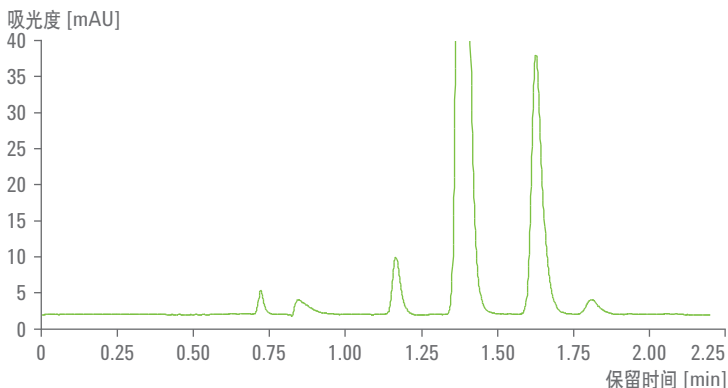


图 8.3 含山梨酸盐和苯甲酸盐以及低浓度咖啡因的茶检测色谱图。咖啡因约为 LOQ 0.0105 mg/mL (S/N 大于 10) 的 3.33 倍

饮料测定结果显示，与某些预制食品相比，这里可能存在着较大的监管疏漏。分析所涉及的 15 种饮料都具有正确标签，是否有哪一种防腐剂，见表 8.3 所示。而且，所有这些样品中的苯甲酸盐或山梨酸盐均未超出任何相关的法定或协议的限值。但可能由于存在基质效应，某些 RSD 高达 2.99%。虽然 RSD 较高，但就相对高浓度的防腐剂来说，这还是可以接受的。同样，就峰面积计算，高浓度样品的 RSD 较低。

	山梨酸盐			苯甲酸盐			咖啡因		
	浓度 [mg/mL]	RSD	标签上有标注	浓度 [mg/mL]	RSD	标签上有标注	浓度 [mg/mL]	RSD	标签上有标注
可乐	NF	NF		NF	NF		0.094	2.99	是
可乐食品	NF	NF		0.193	1.15	是	0.131	0.95	是
零度可乐	NF	NF		0.191	1.58	是	0.098	1.18	是
不含咖啡因	NF	NF		0.044	0.52	是	NF	NF	
不含咖啡因的零	NF	NF		0.056	0.59	是	NF	NF	
苏打水 #1	NF	NF		0.387	0.21	是	0.153	0.20	是
苏打水 #1 食品	NF	NF		0.456	0.13	是	0.161	0.11	是
补药	0.114	0.55	是	NF	NF		NF	NF	
滋补食品	NF	NF		0.384	0.09	是	NF	NF	
能量食品	NF	NF		NF	NF		0.324	0.20	是
宾治酒	0.355	0.18	是	NF	NF		NF	NF	
苹果	NF	NF		NF	NF		NF	NF	
茶类食品	0.267	0.14	是	NF	NF		0.049	0.45	是
茶 #1	0.303	0.08	是	0.212	0.48	是	0.035	0.64	
茶 #2	0.130	0.32	是	0.247	0.23	是	0.024	1.89	是

表 8.3 各种饮料中的山梨酸盐、苯甲酸盐和咖啡因。分析发现所有检测饮料中防腐剂的含量都与其标签一致，美国的苯甲酸盐限值为 1.0 mg/mL

而咖啡因，则存在着较大的浓度范围。对于这些样品，我们将检出的浓度与标签标称浓度进行了比较，结果列于表 8.4。所有样品中的咖啡因浓度都与标签的标称值相当接近，测得值范围为：标签值的 93.2% ($\Delta = -6.8\%$) 到标签值的 106.8% ($\Delta = +6.8\%$)。

产品	标签规格	测得的含量 [mg]	测得的含量 [%]
可乐	57 mg/20 oz	53.1 ±1.59	93.2 ±3.0
健怡可乐	76 mg/20 oz	74.0 ±0.70	97.4 ±0.09
零度可乐	57 mg/20 oz	55.7 ±0.66	97.7 ±0.12
苏打水	91 mg/20 oz	86.8 ±1.74	95.4 ±2.0
无糖饮料	91 mg/20 oz	91.2 ±0.10	100.2 ±0.11
无糖能量饮料	80 mg/8.4 oz	77.1 ±1.54	96.4 ±2.0
减肥茶	12 mg/8 oz	11.2 ±0.05	93.3 ±0.45
茶 #1	未提供	8.02 ±0.05	不适用
茶 #2	5 mg/8 oz	5.34 ±0.10	106.80 ±1.9

表 8.4 所分析的几种饮料中检出的咖啡因含量与标签浓度对比。测定所得平均值为所附规格的 97.6%

8.3.4.2

食品

我们还对几个半液态食品（如，沙拉酱和酱料）中的防腐剂含量进行了评估，仅一个样品中含有咖啡因，很可能并非故意添加，因为是巧克力糖浆，而巧克力中天然含有咖啡因。

与饮料不同的是，许多酱料的标签上关于存在有哪种防腐剂错误很多，如表 8.5 所示。存在错误最多的是酱油、鸭酱和中餐馆外卖的芥菜。所有标签都称所含苯甲酸钠低于 1% 的 1/10，这一点是正确的，因为它们都含有未能检出的痕量苯甲酸盐，但所有样品中都发现含有高浓度的山梨酸盐，而其标签上都没有列出。

	山梨酸盐			苯甲酸盐			咖啡因		
	浓度 [mg/g]	RSD	标签上有标注	浓度 [mg/g]	RSD	标签上有标注	浓度 [mg/g]	RSD	标签上有标注
酸橙汁	NF	NF	否	1.251	0.29	是	NF	NF	
巧克力糖浆	0.941	0.70	是	NF	NF	否	0.246	18.85	天然的
意大利食品	0.665	0.72	否	0.479	1.11	是	NF	NF	
意大利黑醋	0.841	0.92	否	0.910	1.46	是	NF	NF	
牧场	1.411	0.89	否	1.052	0.49	是	NF	NF	
番茄酱	NF	NF	否	0.387	0.21	否	NF	NF	
品牌酱油	NF	NF	否	0.456	0.13	是	NF	0.11	
酱油	0.837	1.15	否	NF	NF	是	NF	NF	
鸭酱	0.911	1.11	否	NF	NF	NF	NF	NF	
芥末	0.745	32.14	否	NF	NF	是	NF	NF	

表 8.5 各种食品中山梨酸盐、苯甲酸盐和咖啡因的浓度。结果报告了产品中检出的实际含量，山梨酸盐的协议限值低于 3 mg/g，苯甲酸盐的法定限值低于 1 mg/g，阴影部分为标签错误。红色显示的浓度说明其超出法定限值

同样，几种沙拉酱标签中列出存在有苯甲酸盐，分析发现确实存在，同时还发现有较高浓度的山梨酸盐，而这些在标签上并未列出。酸橙汁和沙拉酱的苯甲酸盐都略微超过了法定限值。

8.4 苯甲酸酯、山梨酸酯和咖啡因的定量分析结果总结

实验使用高于和低于预期值至少 $\pm 30\%$ 的 7 份标准品和 1 个空白制备了校正曲线。由于预期的浓度范围较宽，因此需要大量标准品。每个标准品共进样 6 次，得到保留时间和峰面积的 RSD 均小于 1%，线性相关系数大于 0.999，相应的截距较小。

8.5 手性分离

开发手性化合物作为潜在药物时，需要合成每个对映体，或纯化到其他每种对映异构体的含量均小于 0.1%，以便能够独立测试每个纯对映体的药效。最好是主对映体在 UV 检测器的线性动态范围内（一般低于 2000 mAU），同时也可以 S/N 大于 10 的灵敏度同时检测微量污染物（低于 0.1%）。如果主成分的最大吸收值为 1000 mAU (1 AU)，那么微量组分 (0.1%) 就应有 1 mAU 的最大吸收值，而噪音应低于 0.1 mAU（峰到峰）。

色谱分离度至少应为 1.5，但人们期望能够获得更大的数值，尤其是微量组分在主成分之后洗脱时。对于这种痕量分析，为了对微量组分进行定量，许多时候认为分离度有必要达到 3 到 6。

在外消旋体的手性分离中，第一个峰一般都比第二个峰明显地更高更尖，虽然其峰面积应该是一样的。主成分和微量组分需要建立独立的校正曲线，标样浓度至少应涵盖预期结果 $\pm 20\%$ （最好为 $\pm 50\%$ ）的范围。每条曲线应至少包含 5 份标样，每个标准品和样品都应至少进样 6 次。校正曲线的线性至少应为 0.99，当 S/N 大于 100 时，RSD 应接近或优于 1%。

在这个示例中，我们展示了差不多在 4 个数量级范围上对氟比洛芬对映异构体进行的分离和定量。将条件调节为 1 mg/mL 溶液生成 2 个峰，每个峰高约 1000 mAU。因此，代表 0.1% 另一对映体的微量组分应具有约为 1 mAU 的峰高。方法使用 4.6 x 250 mm 的 5 μ m ChiralPak ADH 填充柱，以 3 mL/min 的 20% 甲醇（40 °C 和 150 bar）分离氟比洛芬对映异构体。最终在不到 3 分钟内获得了良好分离，分离度大于 5.5，选择性大于 1.5。

检测器的信号束设置为 280 nm，带宽 16 nm，参比束设置为 360 nm，带宽 40 nm。狭缝宽度设置为 8 nm。滤波设置为 0.01 min (20 Hz) 或 0.025 min (10 Hz)。

逐步稀释标准溶液，为校正曲线配制其他标样。我们为高浓度端校正配制了 5 份标样（150, 125, 100, 75 和 50%）。为低浓度端校正配置了 5 份标样（0.015, 0.05, 0.1, 0.5 和 5%）和 1 个空白。每份标样进样 6 次。100, 0.05 和 0.015% 的 6 次叠加代表色谱图见图 8.4。

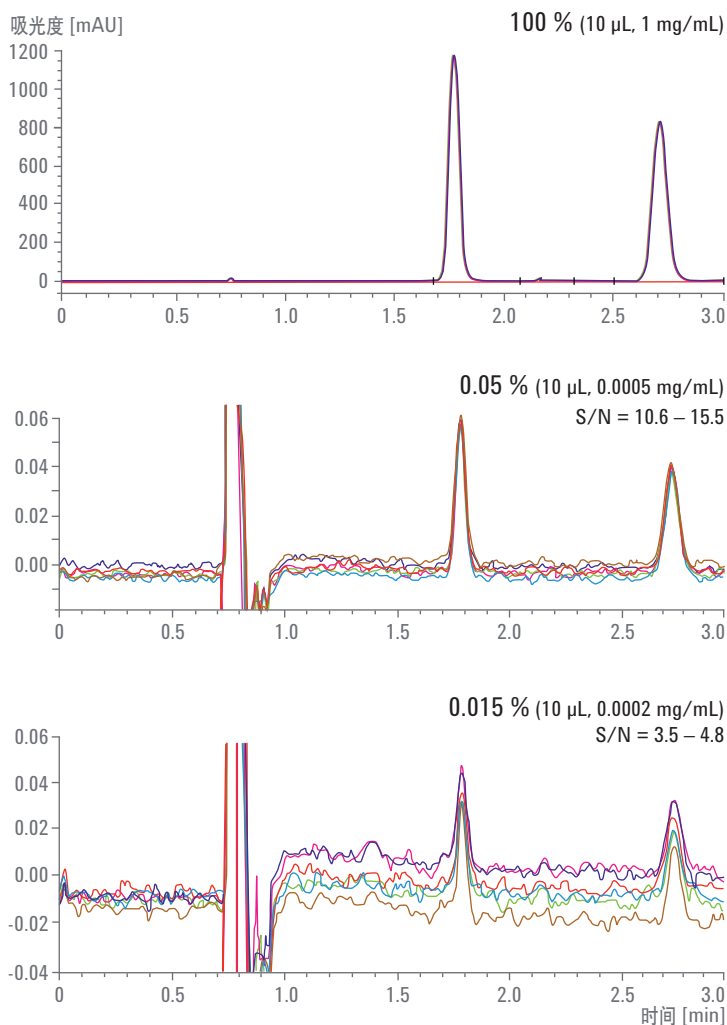


图 8.4 原始值为 100%、0.05% 和 0.015% 的外消旋氟比洛芬色谱图，分离采用 4.6 x 250 mm ChiraPak ADH 填充色谱柱，20% MeOH，40 °C，150 bar

在几千英里外的另一机构中，我们通过不同的仪器（现在用的是 Agilent HPLC 仪器和较早的 Agilent HPLC 仪器，均改装为 SFC 仪器）、不同的操作者、色谱柱和化学试剂，进行了同样的分离操作。明显的差别只有流速，选择的是 4 mL/min（而之前的是 3 mL/min）。但定量结果相似，如表 8.6 所示。

氟比洛芬						
	用户 1		用户 2		华法令	ICH
	峰 1	峰 2	峰 1	峰 2		
峰面积重现性						
100% 时峰面积的 RSD	–	–	0.9%	0.9%	0.27%	≤ 1.0%
0.1% 时峰面积的 RSD	–	–	–	–	2.07%	≤ 20%
0.05% 时峰面积的 RSD	3.36%	3.87%	4.6%	5.0%	–	无
0.015% 时峰面积的 RSD	–	–	6.5%	6.5%	–	无
0.01% 时峰面积的 RSD	–	–	–	–	14.2%	无
保留时间重现性						
100% 时 RT 的 RSD	–	–	0.1%	0.1%	0.46%	≤ 1.0%
0.05% 时 RT 的 RSD	–	–	0.1%	0.1%	–	–
0.01% 时 RT 的 RSD	–	–	–	–	0.027%	–
灵敏度						
0.05% 时的 S/N	17.7	18.2	15.9	10.6	57.6	> 10
0.015% 时的 S/N	–	–	4.7	3.5	–	无
0.01% 时的 S/N	–	–	–	–	7.9	无
LOQ (S/N = 10)	0.027%	0.029%	0.03%	0.047%	0.013%	≤ 0.05%
LOD (S/N = 3)	0.0084%	0.0073%	0.0095%	0.0128%	0.0038%	≤ 0.017%
0.05% 时的 S/N	17.7	18.2	15.9	10.6	57.6	> 10
线性						
80 到 120%	0.9990	0.9991	–	–	–	≤ 0.998
50 到 150%	–	–	0.9985	0.998	–	–
0.05 到 5%	1.0000	1.0000	0.9998	–	–	–
LOQ 120%	–	–	–	–	0.99999	≤ 0.99

表 8.6 氟比洛芬的手性分离, 4.6 x 250 mm, 5 μm ChiraPak ADH 柱, 3 mL/min, 20% MeOH, 40 °C, 150 bar。13 μL, 10 mm 流通池, 0.01 min 滤光; 10 μL 进样

检测发现，大致的定量限（定义为保持 S/N 等于 10 时的最小信号）和检出限（定义为 S/N 等于 3 时的最小信号）都在 0.015 和 0.005% 以下，如表 8.6 所示。两个用户得到的结果都在国际协调委员会指南 (ICH) 的要求范围内，包括峰面积和保留时间的 RSD、线性、S/N、检出限和定量限，也列于表 8.6。

表 8.6 中还列出了用 ChiraCell ODH 柱分离华法令对映异构体的类似结果，用含有二甲基乙胺的 30% 甲醇作为改性剂，条件为 30 °C，200 bar，结果显示出具有相似的定量性能。分析时间不到 4 min。分离度为 3.8，选择性因子 (α) 为 2.1。

9.1

泵

9.1.1

大多数 SFC 系统

在 SFC 中，CO₂ 通常由盛装有液化 CO₂ 的钢瓶（顶部空间为气态）供应。在接近室温的条件下，钢瓶压力通常为 55 到 85 bar。由于改性剂在常温常压下为普通液体，因此压力方面的差异要求使用不同的泵输送 CO₂ 和改性剂。所以，SFC 分离中通常使用二元泵系统。

HPLC 和 SFC 中使用的往复泵类型压缩比偏低，不能压缩低密度气体。要使用此类泵输送 CO₂，则必须将 CO₂ 液化。大多数 SFC 系统会使用钢瓶底部的液相，以最大限度减少能源消耗。钢瓶中的液体会接触气态的顶部空间。在标准 HPLC 泵再灌注的冲程中，任何程度的温度升高或压力降低都将导致部分液体蒸发，泵就会在液流中生成气态空腔。所以，CO₂ 和 CO₂ 泵头都要预先冷却到 4 或 5 °C。大部分 SFC 系统都会先用泵将钢瓶压力下的液体预压缩为柱头压力，然后再对 CO₂ 流量进行精确计量。

冷却泵头通常需要在泵的前面安装一个笨重的热交换器，维护起来非常繁琐。而且，常会使用循环冷却装置泵送冷冻乙二醇溶液通过泵头热交换器。连接冷却装置与泵头热交换器所用的管路需要完全隔离，防止实验室空气中的水凝结在冷表面上，削弱冷却装置的制冷能力。

某些泵的泵头上安装有帕尔帖元件，以及带风扇的大翅片式热交换器。风扇可吸走实验室空气使其通过热交换器，从而将热量带走。冷却侧和泵头需要进行隔离，以免实验室空气中的水气过度冷凝。

即使经过冷却和液化，CO₂ 也比一般液体的可压缩性要强得多。在钢瓶供应压力和典型的冷却装置温度下，绝热压缩性可以超过 1200×10^6 /bar，是普通液体压缩性的 8 到 27 倍。幸好随着压力升高，压缩性降低，在 400 bar 前，CO₂ 的压缩性就与某些普通液体相似。由于这种高压压缩性的存在，冲程长度中的很大一部分都只是用来压缩液体。因此对泵产生了大量要求，常常导致在压缩过程中出现明显的压力波动。

9.1.2

安捷伦分析型 SFC 系统

安捷伦的分析型 SFC 系统与其他 SFC 系统完全不同，如图 9.1 所示。组成 SFC 系统的所有组件都包含在一个独立的转换模块中，大体上未更改的 HPLC 构成了系统的其余部分。实际上，该硬件可以在几分钟内在 SFC 和正相或反相 HPLC 之间快速地来回转换，如后面章节所述。这里包含了对一个特定 SFC 系统相当详细的描述，下面的许多注释都与该系统相关，但通常也适用于大多数 SFC 系统。

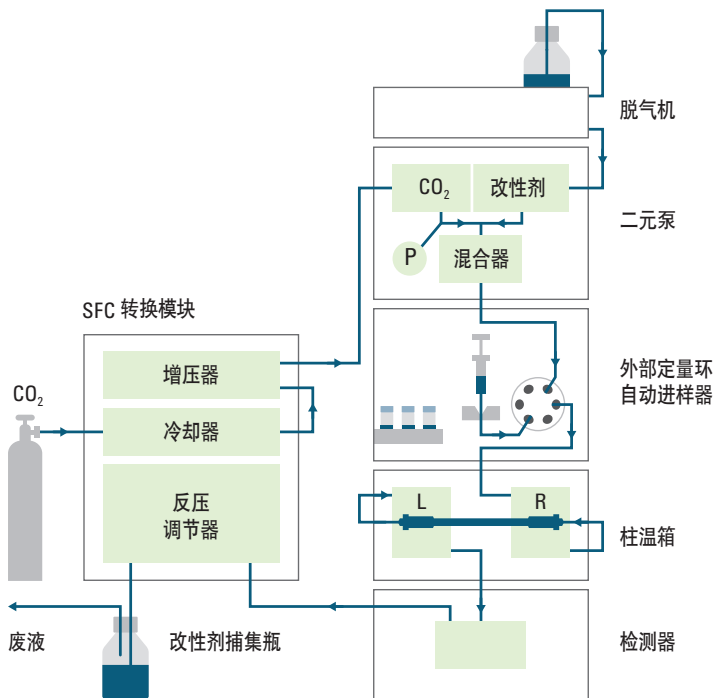


图 9.1 安捷伦分析型 SFC 系统示意图

蒸气相 CO₂ 在室温和约 55 bar 压力下由钢瓶提供。SFC 转换模块包含一个升压泵泵头和一个冷却装置，用于冷却进入的液体。升压泵会将 CO₂ 的压力升高至低于柱头压 8 bar。二元泵会进行计量，并用不同的泵将 CO₂ 和改性剂进行混合。自动进样器为外部定量环自动进样器，柱温箱含有两个热交换器。右侧的热交换器用于在流动相进入色谱柱前对其进行预加热，柱温箱为静态空气加热，效果很好。左侧的热交换器用于对流动相进行柱后平衡，使其温度接近检测器流通池的温度。检测器是配置高压流通池的二极管阵列检测器 (DAD)。通过 DAD 流通池后，流动相将回到 SFC 转换模块中的反压调节器，在这里降至大气压。压力下降后，流体会分为两相。液相被收集到一个捕集阱中，而气相则被排进通风橱内。

转换模块包含一个强大的帕尔帖冷却板，安装在后面并会冷却泵头。与其他 SFC 不同，CO₂ 钢瓶中的蒸气相将被排放，在使用之前会进行有效的蒸馏。因而可以使用低成本的工业级 CO₂，如饮料级。冷却装置功能非常强大，即使在 5 mL/min 的流速下，也可以使 CO₂ 液化，并将其冷却到 -10 °C。流入的液体在进入泵头之前，会先通过嵌入冷却板内的管路进行预冷却。泵和冷却板上的低温表面用密封的塑料盖遮蔽，隔绝实验室空气。采用一个小泵使乙二醇溶液循环通过帕尔帖装置散热一侧的热交换器，带走热量，而后通过仪器后面带风扇的散热器使此热量消散。因此，含乙二醇溶液的管路永远不会比实验室空气更冷，从而解决了凝结问题。

二元泵（不是升压泵）的 A 侧用于计量送至柱头的压缩 CO₂，二元泵的 B 侧用于输送改性剂。安装在 SFC 转换模块中的压力传感器通过三通和引导管连接到二元泵的出口，此传感器将监测二元泵的出口压力。该信号用于控制升压泵的出口压力，使其正好低于二元泵的出口压力。

二元泵的两侧都不需要冷却，HPLC 仪器中二元泵 A 侧的压缩性补偿设置为零，B 侧可设定在安捷伦为特定改性剂所推荐的值上。由于 A 侧不能压缩液体，所以其作用仅是精确地计量流量。两个泵分别连续进行压缩和计量的方式大大降低了压力噪音，转换模块中还包含一个低噪音的电子反压调节器。

9.2

UV 检测器优化

9.2.1

软件设置

对 DAD 进行低噪音优化相当简单。信号波长应设置为接近最大吸收波长。由于在常规分析中不常使用光谱图，所以可以打开带宽，让更多光线照射到光电二极管上。DAD 将对来自所用全部二极管的信号进行平均，使噪音显著降低。但如果某些二极管处于低吸收波长，则不建议将其包含在平均信号中，应改变波长，或使带宽变窄。

许多检测器还可以对进入单色器的狭缝宽度进行调节，狭缝通常设置为与信号光束带宽相同的值。但如果需要光谱图，则应重新将狭缝设置在 1 或 2 nm 的最低值，以免使光谱图中的精细结构模糊。

在可能的情况下，都应使用参比波长。某些噪音和漂移是由灯的波动所导致，这种波动在所有波长下都存在。使用信号与参比波长的比值，可以大大消除这些噪音。参比波长应尽可能接近信号波长，且此处样品无明显吸收。参比带宽通常会设置得相当宽，80 nm，但也可以使用更窄的值，例如 40 nm 或更低，用于最小化噪音的增加。

应避免信号带宽仅包含基本来自一个灯的采样光，而参比带宽则为来自另一个灯的采样光，这样可能会增加噪音。当样品在相对高的 UV 波长下有吸收，而参比设置为更高的波长时，则很可能出现这种情况。

205 或 210 nm 被认为可以实现通用检测，因为大多数有机化合物在该区域都至少能吸收一点光。CO₂ 在低于 190 nm 波长下完全透光。甲醇的 UV 截止波长大约为 205 nm，有利于以最小的噪音在低于 210 nm 的波长下操作。乙醇和异丙醇的截止 UV 波长略高，在 210 nm 左右。虽然很少推荐，乙腈的 UV 截止波长是 195 nm，可以实现 200 nm 的低波长检测。

添加剂通常为酸或碱，一般外延到 230 nm 左右有吸收，可能会限制带弱发色团化合物的检测能力。为了避免较高波长下发生吸收，一定要使用高纯度的改性剂。

9.2.2

数据采集速率

数据采集速率从 2.5 Hz 增加到 80 Hz，UV 噪音将增加 10 倍，如图 9.2 中上图所示。数据采集速率过低虽然可以减少噪音，但也使峰形变劣和分离度降低；数据采集速率过高则会导致噪音过大和灵敏度损失。显然，应设置滤波器恰好让任何特定色谱柱中最快的预期色谱峰通过。安捷伦色谱数据系统将以峰宽 (min)、响应时间 (s) 和频率 (Hz) 列出滤波器设置。积分仪会以 min 为单位报告峰宽。滤波器应设置在下一个更高的速度，您可以根据经验找到最佳的滤波器设置。采用最初的滤波器设置采集到色谱图后，将滤光设置减少一个单位（更少滤光），再重复获取色谱图。如果报告的峰宽不变，则原设置可能是正确的。如果报告的峰宽发生了改变，请进一步降低设置，再重复获取色谱图。持续降低滤波设置，直到报告的峰宽不变。

运行老方法，使用 5 μm 粒径的 4.6 x 250 mm 色谱柱时，滤波器设置为 2.5 Hz 较为恰当。使用 1.8 μm 粒径的 3 x 100 mm 色谱柱时，通常将滤波器设置为 40 Hz 即可。

测量的实际噪音是会发生变化的，取决于灯的使用寿命和流通池的性质，其他因素将在下列章节中讨论。在图 9.2 的下图中，对老式的 6 mm, 1.7 μL 圆柱形流通池和 3 mm, 2 μL 锥形流通池进行了比较，两者都使用的是新光源。噪音几乎与频率呈线性关系。3 mm 流通池 80 Hz 时的噪音比采用 2.5 Hz 滤波器的 Berger 仪器（1995 年）DAD 差不多低一个数量级。

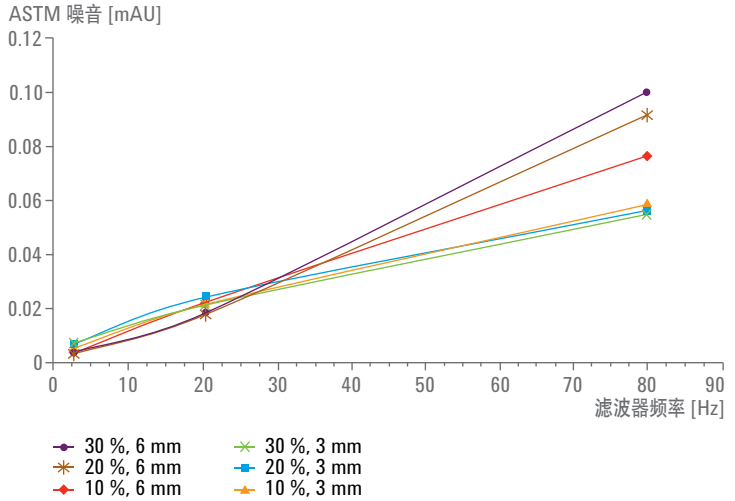
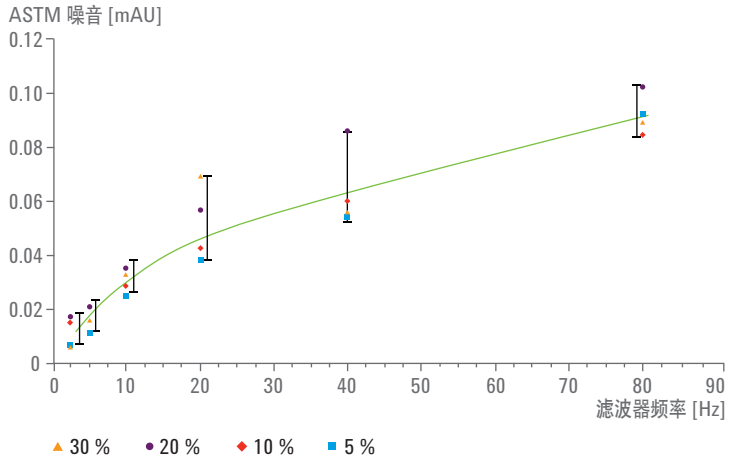


图 9.2 滤波器频率对优化后 ASTM 噪音的影响 (2.5 mL/min)。数据采集条件为 5 到 30% MeOH, 150 bar 出口压力, (上图) 3 mm, 2 μ L 流通池, 锥形流路, 旧灯; (下图), 采用 3 mm, 2 μ L 流通池和带圆柱形流路的 6 mm, 1.7 μ L 流通池 (均使用新灯)。3 mm 流通池的噪音几乎为旧灯的 2 倍

9.2.3 折射率

为 HPLC 设计的 UV 检测器，其光学组件的焦距一定程度上取决于通过流通池液体的折射率 (RI)。RI 与流体密度呈函数关系。25 °C 时水的 RI 为 1.333。大部分其他常用 HPLC 溶剂的 RI 在 1.328 到 1.375 之间，检测器设计者假设 RI 即在此一般范围之内。这些溶剂的密度和 RI 几乎不随压力而变化。

如前所述，图 2.1 和图 2.3 中，纯 CO₂ 和改性 CO₂ 的密度都会随温度和压力发生变化¹¹⁴⁻¹¹⁶。同样，纯 CO₂ 的 RI 是温度和压力的强函数如图 9.3 和图 9.4 中所示。纯 CO₂ 的最小 RI 值为 1.08，远远不同于 HPLC 中所用任何普通液体溶剂的 RI。计算所得 CO₂ 的最大 RI 约为 1.24。CO₂ 中添加改性剂很可能会增加混合物的 RI 值，接近于纯溶剂的值。例如，甲醇/CO₂ 混合物的密度通常高于相同温度下任何一种纯流体的密度。因此，温度、压力或组成变化引起的 RI 改变可能会导致基线出现大幅漂移，并且由于改变了流通池的焦距，因此很可能会增大噪音。

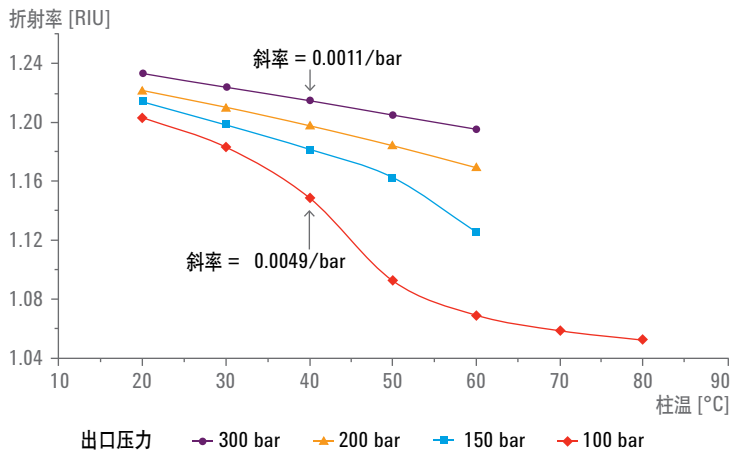


图 9.3 4 种不同压力下温度对纯 CO₂ 折射率的影响。100 bar 压力下同样小的温度变化引起的 RI 改变比 300 bar 下要大得多

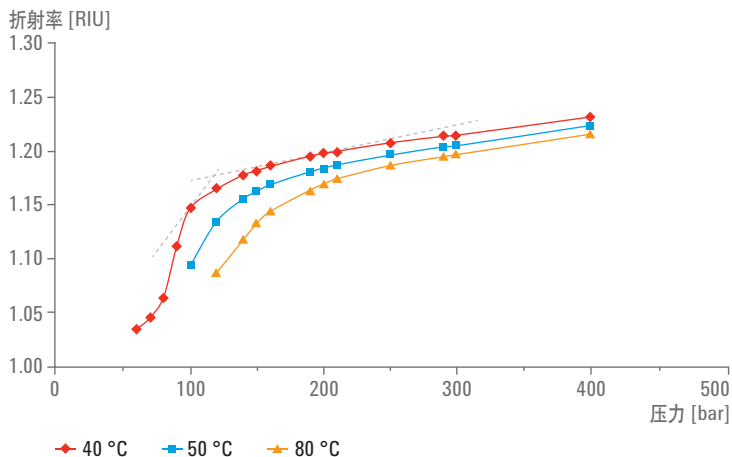


图 9.4 在以下三个温度下，纯 CO₂ 折射率为压力的函数：40 °C；50 °C；80 °C。虚线显示斜率的改变在 100 到 200 bar 之间。100 bar 压力下同样小的压力变化引起的 RI 改变，比 200 bar 下大得多

9.2.3.1 UV 流通池温度和噪音

SFC 通常是在与室温相差较大的温度下进行。离开色谱柱的流体可能比检测器流通池高或低许多度，此流通池可通过其内部电子元件进行加热。流体进入流通池时，温度必须平衡，否则很可能引起流通池内的 RI 发生大幅变化，这会导致光路系统的焦距发生变化。照射到流通池壁上的光可能会从狭缝中反射出去，使进入到单色器的光发生变化。这一影响会改变基线信号，即 UV 噪音。

柱温箱中的一个热交换器可以用于调节柱后流动相的温度，使其与流通池实际温度相匹配，从而消除了与热差异相关的大部分噪音。示意图见图 9.5。

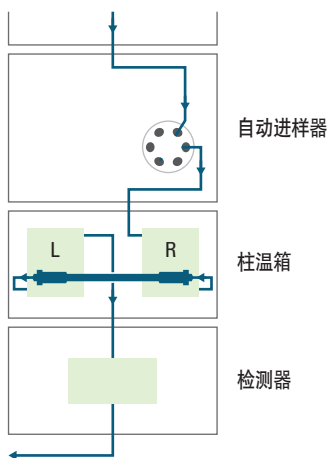


图 9.5 示意图展示了柱温箱的管路布置，右侧的热交换器会预平衡进入色谱柱之前的流动相温度，左侧的热交换器则会将柱后流动相温度调节到检测器流通池的温度

许多现代 UV 检测器流通池都具有一个让光通过的锥形孔。在 HPLC 中，已经证明这种形状对于最大限度减少因短期温度变化影响 RI 而带来的噪音而言，非常重要。但在 SFC 中，这个锥形孔可能并不那么重要。实际上即使一个带锥形流路的 10 mm 光程流通池在进入流通池的流体温度与流通池温度相差几度时，也会产生过度噪音，如图 9.6 上图曲线所示。该曲线的获取条件为：CO₂ 中含 5、10、20 和 30% 的甲醇，流速 2.5 mL/min，出口压力 150 bar。两个热交换器都可以在 20 到 70 °C 之间改变温度。但是，当右侧热交换器在 20 到 70 °C 之间改变温度，而左侧的热交换器则保持（优化）在流通池的温度时，几乎所有因热引起的噪音都消失了，如图 9.6 下面的曲线所示。

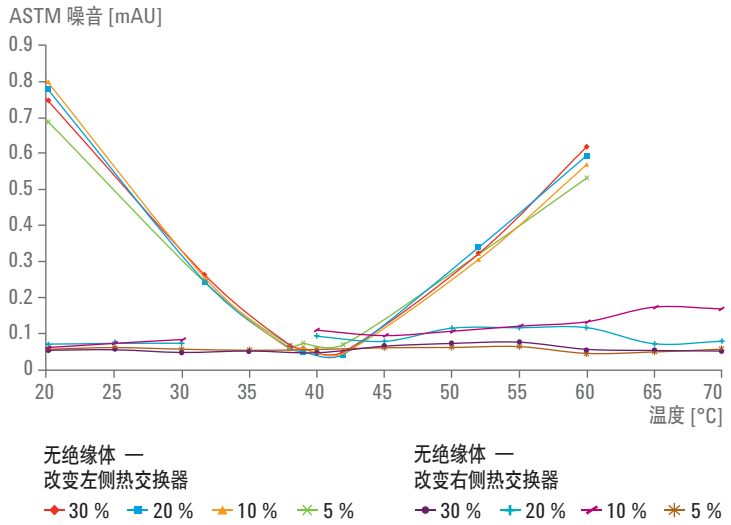


图 9.6 用带锥形流路，不带绝热器的 10 mm，13 μ L 旧流通池，在 4 种改性剂浓度下测定的 ASTM 噪音。在进入流通池之前，来自左侧热交换器洗脱液的温度在 20 到 80 $^{\circ}$ C 之间变化。温度不匹配引起的过度噪音如上图曲线所示。重复该实验，用右侧热交换器在 20 到 70 $^{\circ}$ C 之间改变色谱柱温度，而左侧热交换器温度恒定在 41 $^{\circ}$ C。实际上，所有温度导致的噪音都已消失，如图下方接近水平的曲线所示。

令人吃惊的是，采用几乎相同的带锥形流路的流通池，但在流通池和光具座之间加了一个陶瓷绝热器，几乎没有出现温度引起的噪音。使用隔热流通池的未优化噪音如图 9.7 中下方几乎水平的曲线所示。图中包含了使用未隔热流通池的未优化噪音曲线（图 9.6 中上方的曲线）用于比较。在这种情况下，隔热器似乎比锥形流路更加重要。仅几年前许多 SFC 系统均以不隔热的流通池为标准配置，改用新的隔热池后，噪音状况立刻得到了改善。

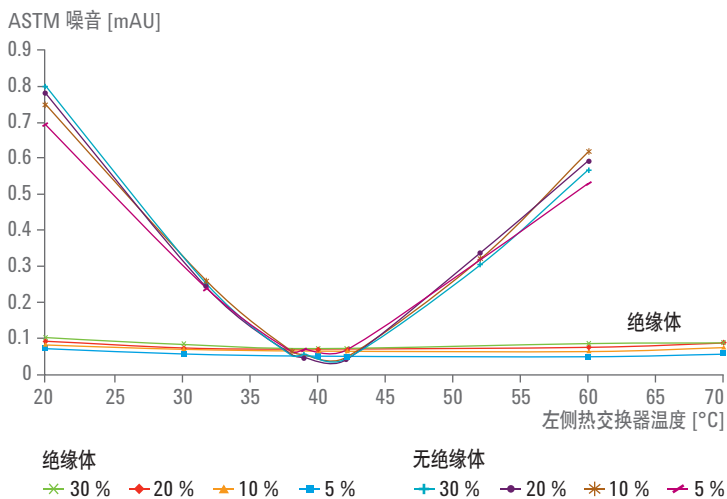


图 9.7 与图 9.6 基本相同的流通池，但用陶瓷隔热器隔绝了流通池与光具座，噪音明显降低，甚至当左侧热交换器在 20 到 70 °C 变化时，也可以得到下方几乎水平的曲线。图 9.6 上方的曲线用于比较

锥形流路并非噪音水平的决定性因素，可能是因为 CO₂ 和带改性剂的 CO₂ 混合物的 RI 远远低于 HPLC 中所用一般液体的 RI，因而更少弯曲光线。流通池最初设计用于 HPLC，在 HPLC 中，锥形流路明显更重要。

另一方面，带圆柱形流路的 6 mm，1.7 μL 流通池已使用了许多年，展示出与未隔热 10 mm 流通池相似但不完全一致的性能。无论使用哪种改性剂，性能表现均如此，如图 9.8 所示。使用此流通池采集的两种色谱图如图 9.9 所示。在上面的色谱图中，左侧热交换器设置为 30 °C，流通池温度为 41 °C。在下面的色谱图中，左侧热交换器进行了优化。请注意，在下面色谱图中可以区分出的小峰，是由于降低了噪音。

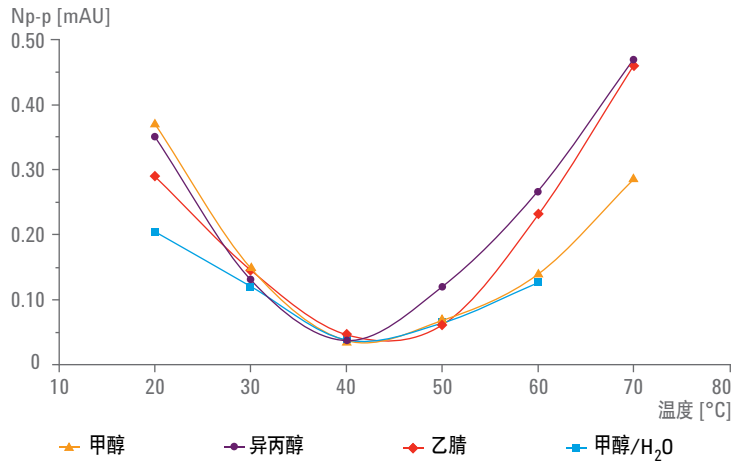


图 9.8 使用几种改性剂对另一种旧流通池进行类似评价，其光程为 6 mm，体积为 1.7 μ L，但采用的是圆柱形流路。无论使用何种改性剂，结果都相似。此流通池的噪音仅为 10 mm 未隔热池的一半，但比 10 mm 隔热池的噪音大。使用左侧热交换器优化性能得到的优化结果见图 9.2

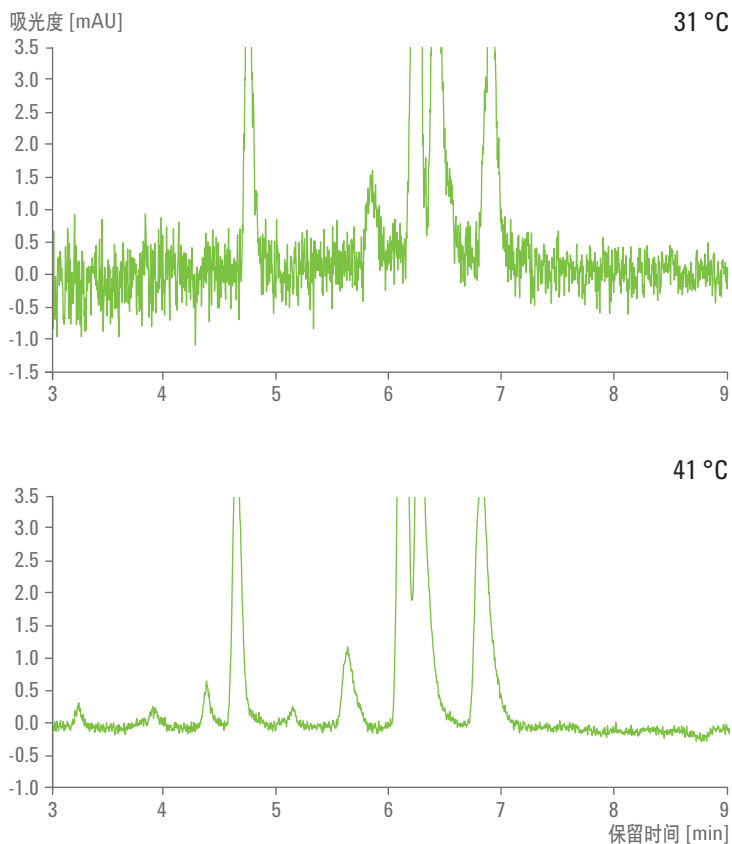


图 9.9 使用图 9.8 中 6 mm 流通池采集的色谱图。上方曲线为左侧热交换器设置在 30 °C 时采集而得，下方曲线则为优化左侧热交换器 41 °C，出口压力 100 bar 条件下采集而得

令人困惑的是，带锥形光路的未隔热 3 mm 光程流通池却对温度引起的 RI 效应并不敏感，与 10 mm 隔热流通池相似。但是，仍然有必要将左侧热交换器的温度调至流通池的温度，以获得最小噪音，40 Hz 条件下如图 9.10 所示。用陶瓷垫片隔热并没有进一步改善噪音。令人吃惊的是，这个 3 mm 流通池产生的噪音仅为更长、更大体积（13 μL vs 2 μL ）流通池噪音的 87%。

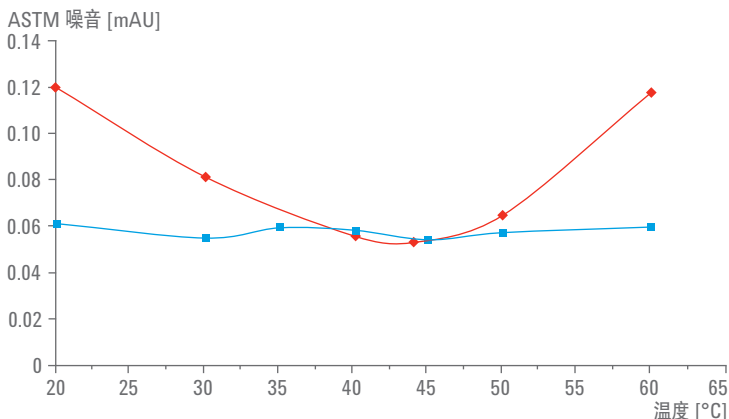


图 9.10 另一种流通池，3 mm 光程，2 μL 体积，未隔热，采用锥形流路，比图 9.8 中的流通池产生更少的噪音。用左侧热交换器进一步优化，消除噪音

9.2.3.2 色谱柱出口压力和噪音

所有电子反压调节器 (BPR) 会不断脉动设置点周围的控制电子元件，从而引起出口压力的轻微变化。如果不严格控制，这种抖动可能会引起明显的噪音。安捷伦分析型 SFC 系统包含最先进的 BPR，可使 SFC 在 150 bar 时的压力噪音降低至 ± 0.05 bar。这比以往 SFC 的电子 BPR 要好 10 倍。

如前所述， CO_2 的 RI 是其密度的强函数，依次取决于其温度、压力和组成。除了安捷伦分析型 SFC 系统的低压波动，在某些条件下还可以看到一些与压力相关的噪音。需注意，从 1990 前到 2008 年后，所有填充柱的 SFC 报告中，大约 80% 都用 40 $^{\circ}\text{C}$ 、100 bar 出口压力作为初始设置点。如图 9.4 所示，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、100 bar 的条件下， CO_2 的 RI 随压力的微小变化而发生急剧改变，这是流体的固有特性。在过去的几年中，这一点被大大忽略了，因为其他噪音源更大，掩盖了压力所致噪音的影响。

在压力大于约 120 bar 时，RI/压力的斜率迅速降低。UV 检测器噪音与出口压力的曲线关系如图 9.11 所示。在 40 °C 时，出口压力分几个阶段从 100 变化到 200 bar，在 100 bar 时，噪音约为 0.11 mAU，滤波器设置为 0.05 min (5Hz)。在 120 bar 时，噪音降低超过 50%，至 0.04 mAU 左右。在 140 bar，噪音再降低 50%，至 0.02 mAU 左右。在作者的实验室中，过去 4 到 5 年来，出口压力和温度的默认设置为 150 bar 和 50 °C。为了得到可能的最低噪音，建议出口压力设置为 200 bar。

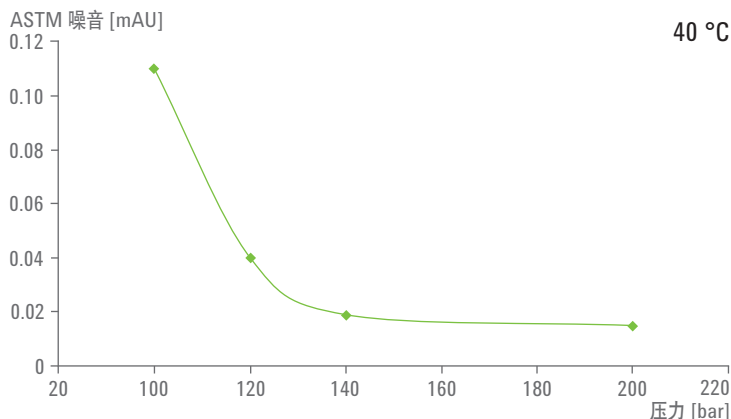


图 9.11 出口压力对噪音的影响。40 °C 时，较低的色谱柱出口压力（如 100 bar）条件下，折射率会随压力的微小变化发生较大的改变（相比于 200 bar 之类的高出口压力条件）。
条件：3 mL/min，4% MeOH，40 °C，滤波器设置大于 0.05 min。

使用改性的流动相（尤其是改性剂浓度大于 10%）时，压力将成为第二控制变量，对选择性或保留值影响很小。因为流体的粘度很低，最佳流速下的压降适中（即使使用亚 2 μm 颗粒填充柱），所以出口压力 200 bar 的设置点仅会有很小的影响。柱头压力应该很少超过 400 bar，虽然该系统可以在 600 bar 下操作。

有一些物质，如类似于非极性化合物的混合物，最好在低于 100 bar 的压力下分析，以使密切相关的化合物间获得最大分离度。升高温度可以使 RI 对压力的曲线趋于平坦，有助于分析。在这种情况下，要在灵敏度和分离度之间做出权衡，因为 RI 是流体的固有性质。

9.2.3.3

低改性剂浓度和噪音

在 SFC 中，改性剂的浓度很少超过 50%，除非是进行快速筛查。因为改性剂的浓度范围比 HPLC 小，所以常使用浓度低于 10% 的改性剂。但是，在低流速和低改性剂浓度条件下，改性剂泵可能无法每分钟循环一次，甚至更慢。使用 2 mL/min 和 5% 改性剂条件时，改性剂泵以 100 μ L/min 输送液体，安捷伦分析型 SFC 系统可以改变冲程长度。在该流速下，泵冲程约为 20 μ L。因此，该泵每分钟执行 5 个冲程。

当流体被压缩到工作压力时，第一个活塞中没有液流，同时第二个活塞正从流出液中吸取流体。B 泵和混合点之间的流出液单向阀可用于防止回流到达混合点。

压缩冲程后，改性剂泵会注入另一份改性剂，补足总体积差额。流量和组成都很准确，但基线还是有周期性的波动。混合器必须尝试平衡改性剂流中的这种缓慢波动，虽然这种波动可能只是每分钟一次，或更慢。

主混合器设计用于主流的 HPLC，流速至少为 1 mL/min，采用 5% 或更高的改性剂浓度。在低流速或低浓度改性剂条件下，标准混合器很难完全平复这种波动。因为改性剂与 CO₂ 相比具有不同的 RI，改性剂浓度的任何波动（特别是在低浓度下）都会在改性剂泵频率上产生另一个更低频率的噪音。

噪音与改性剂浓度的关系曲线如图 9.12 所示。在 2 mL/min，40 °C 和 200 bar 条件下，最严重的噪音出现在 1% 甲醇条件下，此时泵每分钟只执行一次冲程。任何需要使用如此低浓度改性剂的情况，都是因为对溶质使用了过强的改性剂。

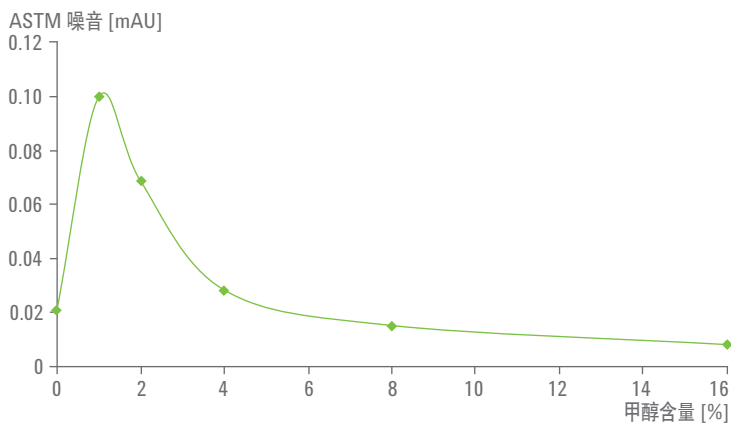


图 9.12 低改性剂浓度下改性剂泵导致的噪音。改性剂泵在低频率下操作，标准混合器不能完全平均此低频率下的组分波动。条件：2 mL/min，40 °C，200 bar。滤波器大于 0.1 min

有一些新型混合器可提供可变的通道长度，例如，Agilent Jet Weaver 混合器，具有更低的体积。

或者，还可以通过降低溶剂强度（即，改性剂的极性）来避免低改性剂浓度。使用弱改性剂时，化合物更容易保留，所以需要较高浓度。乙醇相对于甲醇来说，溶剂强度大大降低，如第 2 章“流动相”中所述，异丙醇的溶剂强度则进一步降低。许多其他有机溶剂也可以用做改性剂，进一步降低溶剂强度、增加保留值或改变选择性。但是，某些溶剂，如氯代溶剂对环境有负面影响，应避免使用。

9.3 双重梯度

经验法则进一步指出，改性剂浓度加倍，则保留值减半。最初加入一小份改性剂对保留值会产生不成比例的影响，但在较高的改性剂浓度下，小的变化产生最小的效果。但是，改性剂浓度通常会采用线性程序的方式进行添加。因此，在梯度开始时，峰会堆积在一起，到梯度结束时，峰就会展开。如果改性剂浓度开始只是逐渐变化，但在运行过程中变化率逐渐增加，则早洗脱组分会更好地分离，而后洗脱组分则会加快出峰。此类梯度在 20 多年前已提出，但显然没有获得广泛采纳。

色谱柱的滞留时间, t_0 (不保留峰的保留时间) 是便于在不同尺寸色谱柱之间进行方法转移的时间基准。如果从可行的改性剂最低百分比开始, 某些化合物可能在 t_0 后的头几个柱滞留时间处先被洗脱。使用选择得当的改性剂, 复杂混合物中的大多数溶质在初始条件下都能够轻松实现保留。在 1 个或更多个柱滞留时间下保持初始浓度, 可在最弱洗脱条件下得到最大分离度。在后续多个 t_0 中不断倍增改性剂浓度, 让所有峰都以大致相等的峰宽洗脱, 类似于 k 约等于 1 到 2 的等度峰。如果每次浓度倍增都会使保留值降低一倍, 那么从 2% 递增到 64% 会使保留值改变约 64%。然而, 此类型的梯度会快速降低分离度不低于 40% (相比最佳等度分离)。

9.4 自动进样器注意事项

9.4.1 可变样品环与固定样品环

现在许多自动进样器设计使用可变量环或流通设计理念, 但 SFC 与这种方法并不兼容。在可变量环自动进样器中, 针头通过一段充当样品环的柔性不锈钢管路连接到高压计量装置 (如, 注射器) 上。加载样品时, 将进样阀切换到旁路 (载样) 模式, 流动相会从泵直接转移到色谱柱。然后在大气压下, 样品将从样品瓶吸入针头和样品环中。吸取样品后, 针头被推入高压针座, 切换进样阀 (进样), 来自泵的流动相通过计量装置、样品环、针头和针座, 然后通过阀进入柱头。针头和样品环可保留在进样位置, 待流动相冲洗, 以最大限度减少残留。

在 HPLC 中, 这一方式有许多优势, 因为流动相基本上都是不可压缩的液体。将阀切换到旁路位置可将计量装置、样品环和针头与液流隔开, 并将针座连接至废液。在这个隔绝的部分中, 流体会最低限度地立刻扩散, 压力降至大气压。计量装置、样品环和针头仍会由液体流动相充满。

在 SFC 中, 流动相的行为像压缩气体。当阀切换到旁路位置时, 计量装置、连接管路 (样品环)、针头和针座中的流体全都膨胀为其压缩体积的 500 倍, 通过阀的废液出口迅速排放到大气中。在这次膨胀之后, 整个进样系统将被低密度气体充满。尝试吸取下一个样品, 将导致计量装置出现气泡, 无法进一步从样品容器中吸取样品。

可变样品环自动进样器需要改为固定样品环后，才能用于 SFC。一个外部固定体积样品环会连接在 2 位/6 通阀的相对端口之间。从样品瓶中吸取样品，然后用相同的高压计量装置推动其通过样品环。当进样阀转动时，只有样品环和转子会承受系统的高压。

使用进样器程序时，针头应留在针座中，只有在阀回到旁路位置后才开始吸液。如果针头在阀切换前过早地从针座吸液，计量装置中的流体（大约 200 μL ）、样品环和针头将快速排空，高度压缩的气体会进入样品室内部，潜在的有害流动相组分（如，某些添加剂）将污染所有表面。如果针头留在针座中，所有流体将排入废液管路。废液管路应始终与集液阱连接，蒸气相应导入通风橱。下次进样前，请使用安装在 SFC 模块上的冲洗泵采用新鲜的溶剂冲洗计量泵、样品环和针头。

9.4.2 残留

安捷伦分析型 SFC 系统中的 SFC 控制模块包括冲洗泵，可以在两次进样间隙彻底冲洗进样阀、注射器、连接管路和针头。这样能够实现非常低的残留。实例见图 9.13。分析高度浓缩的样品时，由于出现检测器饱和，在大于 2500 mAU 时报告的峰面积大于 17500，超出刻度。接下来的空白进样报告的峰面积为 0.88，按峰面积计算的残留约为 0.005%。

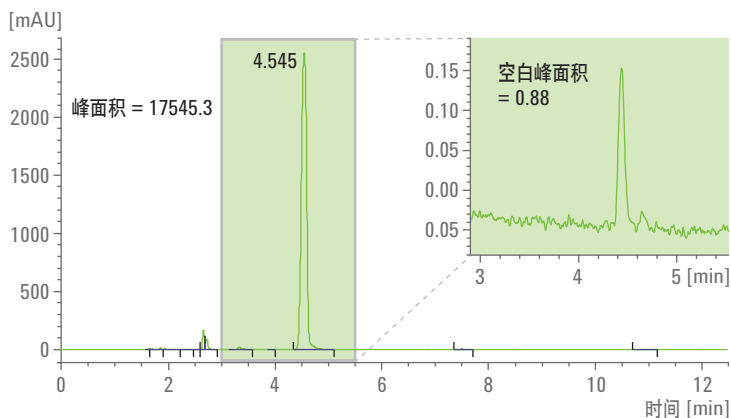


图 9.13 咖啡因的残留。高浓度样品进样后接着执行甲醇空白进样。进样之间，注射器、连接管路、针头、针座、阀和外部样品环用大约 0.5 mL 的甲醇冲洗。残留为 0.005%。条件：2 mL/min 含 5% 甲醇的 CO₂，40 °C，200 bar。色谱柱：4.6 x 250 mm，5 μm，RX-SiL。过滤器大于 0.05 min，15 μL 注入 5 μL 样品环，样品栓每侧各有 1.5 μL 的气泡

9.4.3 重现性

在监管环境下，当 S/N 大于或等于 100 时，保留时间和峰面积的重现性应优于 ±1% RSD。如果采用满足量环进样且样品环至少满溢几倍，则 SFC 可轻松实现此重现性水平。例如，使用 1.25 μL 的样品环，则进样体积应为 5-7 μL 才足够。这才能够加载样品，以致只有样品栓中间的未稀释部分位于外部样品环内。

现代 SFC 中的保留时间重现性通常优于 1%，但面积重现性还依赖于 S/N。如果 S/N 为 100，要获得小于 1% 的面积重现性，信号的不确定度基本上为 ±1%。然而对于噪音低至（例如）0.01 到 0.02 mAU 的系统，峰高只有 1 到 2 mAU 时就能获得 100 的 S/N。

这里列出了两套重现性测量值 (n = 10)。在第一套中，采用了高改性剂浓度和高压，得到了最好的重现性。表 9.1 所示的第一个示例显示了咖啡因、茶碱和可可碱的保留时间和峰面积重现性。保留时间重现性平均为 0.033% RSD。峰面积重现性，S/N 低于 300 到大约 1400，RSD 介于 0.1 到 0.29% 之间。

咖啡因		茶碱		可可碱	
RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积
1.420	1471.8	1.895	2305.2	2.198	273.9
1.419	1471.9	1.895	2309.8	2.197	275.7
1.420	1472.5	1.898	2307.9	2.198	275.8
1.419	1472.3	1.895	2308.7	2.197	273.3
1.420	1473.1	1.895	2308.8	2.197	274.5
1.419	1472.4	1.895	2308.5	2.198	274.2
1.420	1474.8	1.895	2307.0	2.198	274.0
1.420	1475.2	1.895	2312.8	2.198	273.9
1.420	1474.9	1.895	2309.0	2.195	274.3
1.420	1475.3	1.895	2312.9	2.195	274.1
平均值	1.4197 1473.4	1.8951 2308.8		2.1985 274.37	
SD	0.0005 1.4021	0.0003 2.3203		0.001 0.7524	
%RSD	0.04 0.10	0.02 0.10		0.05 0.27	

表 9.1 在高流速、高 % 改性剂和高压的等度条件下测得的咖啡因、茶碱和可可碱的重现性。
条件：40% 甲醇，200 bar，4 mL/min，40 °C。色谱柱：4.6 x 250 mm，5 μm，RX-SIL

第二组重现性的测定值采用每分钟 10% 的梯度分离布洛芬和氧杂蒽混合物而得。改性剂组成保持 2% 恒定 1 min，然后以每分钟 10% 增至 42%，流速 3 mL/min，30 °C 和 200 bar，使用 4.6 x 250 mm，5 μm 硅胶柱。保留时间平均 RSD 为 0.11。峰面积 RSD 平均 0.38，如表 9.2 所示。

布洛芬		咖啡因		茶碱		酮洛芬		可可碱		
RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	RT	峰面积	
2.850	507.02	3.372	440.32	4.497	1183.3	4.883	1875.0	5.777	383.57	
2.849	503.98	3.372	439.38	4.493	1173.9	4.879	1875.1	5.772	385.08	
2.848	502.80	3.372	438.88	4.491	1171.9	4.878	1873.4	5.789	384.98	
2.850	507.98	3.373	442.80	4.489	1174.7	4.874	1875.7	5.785	384.74	
2.851	507.98	3.375	441.18	4.487	1171.3	4.872	1873.8	5.782	384.87	
2.851	508.22	3.375	442.50	4.485	1175.7	4.870	1878.3	5.759	381.78	
2.853	508.48	3.377	444.01	4.485	1182.2	4.871	1890.0	5.758	385.89	
2.854	508.00	3.378	441.28	4.483	1170.0	4.888	1870.0	5.753	383.18	
2.852	507.81	3.377	442.82	4.481	1172.7	4.888	1877.2	5.752	382.11	
2.852	508.42	3.377	443.08	4.480	1178.3	4.884	1880.9	5.749	385.25	
平均值	2.851	507.08	3.3748	441.4	4.4871	1175.2	4.8723	1878.9	5.7814	384.12
SD	0.0018	2.0002	0.0024	2.109	0.0054	4.4259	0.0059	5.4424	0.0093	1.3978
%RSD	0.07	0.39	0.07	0.48	0.12	0.38	0.13	0.29	0.18	0.38

表 9.2 以每分钟 10% 梯度洗脱的重现性：3 mL/min 的 2% 甲醇持续 1 min，然后以每分钟 10% 增至 42%，并保持，40 °C，200 bar，采用 4.6 x 250 mm，5 μm，RX-SIL 色谱柱

9.4.3.1 未充满样品环进样

使用不充满定量环进样模式时，保留时间重现性与满定量环进样相似，但峰面积重现性有所降低，线性良好。在 5 μL 样品环上执行大于 1.5 μL 的进样时，峰面积 RSD 约为 2%。进样小于 1 μL 时，RSD 小于 10%。

9.4.4 进样体积与强样品溶剂效应

这是 SFC 被忽视的方面，需要多加关注。样品通常溶解在比较强的溶剂中，如甲醇。这可能会出现这个问题，这在 HPLC 中也存在。SFC 中的流动相可能极性相当弱，尤其是改性剂浓度较低时。将溶解在强（极性）溶剂中的样品进样到低浓度的相同溶剂（用作改性剂）中时，会出现样品栓中心的极性至少比大体积流动相更强的情况。这条谱带中心的溶质分子接触了比其它流动相更强的溶剂，因而会比该谱带边缘的溶质分子保留性更弱。从而导致峰变宽、拖尾，并与相邻保留峰之间的分离度降低。

增加进样体积通常会加重这一效应。以 4 种皮质类固醇的分离为例，样品溶解在甲醇中，使用 4.6 mm 内径色谱柱，以 8% 甲醇作为改性剂，如图 2.5 所示。作为样品溶剂的纯甲醇，比含 8% 甲醇的 CO₂ 极性得多 (更强极性的溶剂)。

如果没有强样品溶剂效应引起的峰展宽，可以认为标准品的进样体积和得到的色谱峰峰高之间应存在线性关系。但可以发现，溶质峰高与进样体积的线性函数关系仅维持到最高 6 到 7 μL 的进样体积，如图 9.14 所示。在更高的进样体积下，峰高却明显持平。同样，半峰宽曲线也在同样的进样体积附近呈现出折断，虽然这种折断不是很清晰，如图 9.15 所示。最后，峰面积对进样体积作图为线性，如图 9.16 所示，说明在进样量适当的条件下，随着进样体积增加，峰逐渐变宽。

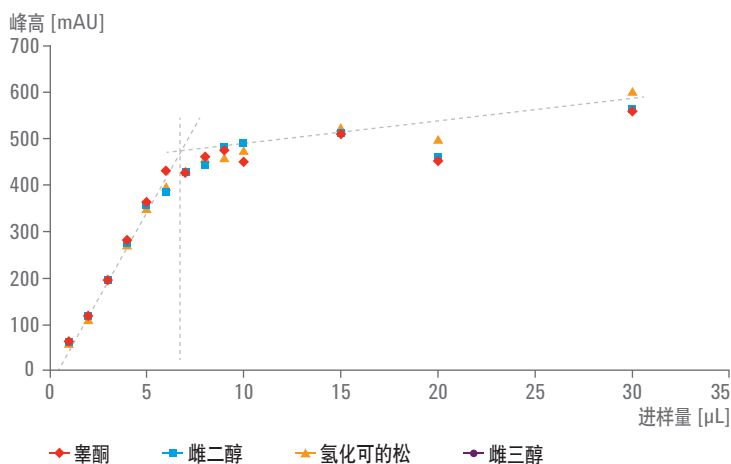


图 9.14 强样品溶剂的影响。进样体积对溶解在甲醇中的睾酮、雌二醇、氢化可的松和雌三醇峰高的影响，用含 8% 甲醇的 CO₂ 作为流动相，温度 40 $^{\circ}\text{C}$ ，出口压力 100 bar。色谱柱：4.6 x 150 mm，5 μm ，未键合硅胶。进样体积大于 8 μL 时峰高下降

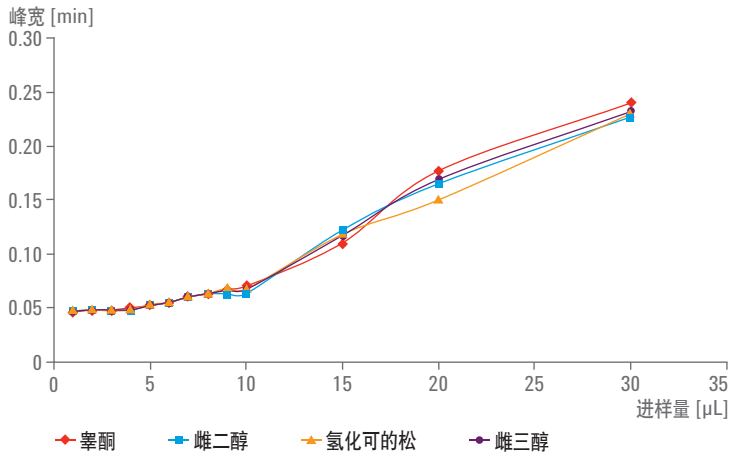


图 9.15 进样体积对溶解在甲醇中的辜酮、雌二醇、氢化可的松和雌三醇峰宽的影响，用含 8% 甲醇的 CO₂ 作为流动相，温度 40 °C，出口压力 100 bar。色谱柱：4.6 x 150 mm，5 μm，未键合硅胶。从进样体积 6 μL 开始峰变宽

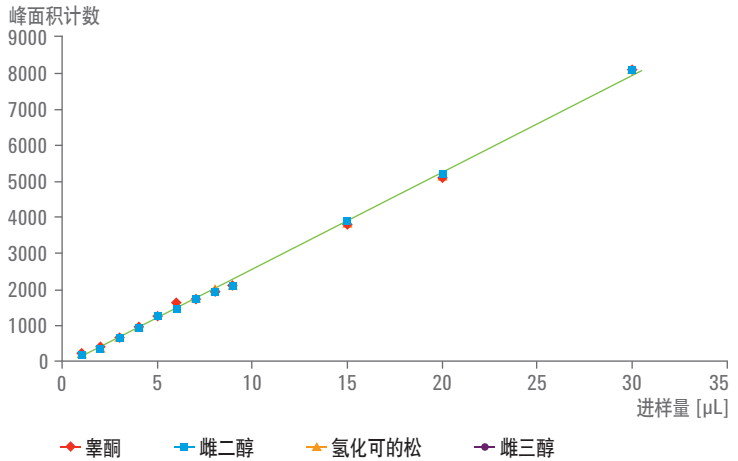


图 9.16 进样体积对溶解在甲醇中的辜酮、雌二醇、氢化可的松和雌三醇峰面积的影响，用含 8% 甲醇的 CO₂ 作为流动相，温度 40 °C，出口压力 100 bar。色谱柱：4.6 x 150 mm，5 μm，未键合硅胶。峰面积与进样量呈线性函数关系

不可将样品溶解在比所用改性剂极性更强的溶剂中。例如，如果改性剂是乙醇或异丙醇，决不能使用甲醇作为样品溶剂。如果样品溶解在与所用改性剂相同的溶剂中，用户必须果断考虑将样品溶剂换成强度弱一些（极性更弱）的溶剂，尤其是在进样过程中初始改性剂浓度较低时（低于10% 改性剂）。对于分析来说，这种向更弱极性溶剂的转换，不太可能造成样品在该溶剂中的溶解度问题。大多数用户都低估了多数较小的药物类分子或天然产物类大分子在这种弱极性溶剂中的溶解度。

图 9.14、图 9.15 和图 9.16 中的结果均采用 4.6 x 150 mm, 5 μm 粒径色谱柱获得。如果确定了在 4.6 mm 内径色谱柱上不使谱带展宽的最大进样体积，要将该方法转移到更小内径和/或粒径的色谱柱，进样体积应按色谱柱截面积和粒径以正比例减少。如果在 4.6 mm, 5 μm 粒径色谱柱上的最大进样量为 10 μL ，则进样到相同粒径 3 mm 内径柱上的样品体积应不超过 4.2 μL 。如果在将粒径减小到 1.8 μm 的同时又要保持总柱效相同（减少柱长），则需要进样体积不超过 1.5 μL 。显然，使用填充亚 2 μm 填料的小内径色谱柱，可能需要小样品环，可能市场上没有现成的。1.25 μL 样品环可以用一根 10 cm 长的 125 μm (0.005 英寸) 管路制得。用安捷伦带 1/16 英寸末端的 1/32 英寸外径管路可进行简便而快速的安装。另一种方法是用未充满的样品环进样，大样品环，但 RSD 可能会不足。

在高改性剂浓度下，这种强样品溶剂效应明显要小得多。实际上，以 40% 甲醇为改性剂，将溶解在甲醇中的 90 μL 华法令标准品，进样到填充 Regispack 固定相的 4.6 x 250 mm 柱中，进行分析型半制备分离，只出现不太大的谱带展宽。

进样前，安捷伦分析型 SFC 系统中的冲洗泵将使用用户选择的冲洗溶剂充满样品环。如果冲洗溶剂是一种过强的溶剂，就需要用几个样品环体积溶解有实际样品的弱溶剂对其进行置换（满溢固定样品环）。

最坏的情况是：将一小段样品塞插入充满强溶剂的固定样品环（但不置换样品中大部分的强溶剂）进行局部样品环进样。接下来的进样再将大体积高极性（强）溶剂进样到带（弱）样品栓的色谱柱上，大部分样品保留很弱被洗脱出色谱柱，但部分样品因强溶剂被稀释而保留较强。而后，尤其是尾部被大的拖尾造成严重展宽。

如果您要建立自己的进样程序因样品栓两端的气泡将而产生样品分段，使样品和冲洗溶剂的混合减到最小，但可以用来置换多余的冲洗溶剂。应避免使用大样品环。对于方法开发来说，为灵敏度牺牲分离度之前，应该从小体积浓缩样品开始尝试最大限度地减少峰宽，加大分离度。

9.5 其他注意事项

现代 HPLC 仪器中强制使用的渗漏检测器无法检测或定位 SFC 中的渗漏，除非是脱气机或二元泵 B 侧发生的渗漏，因为这些都是输送普通液体的模块。系统的其他部分，泄漏的是气体，不会滴液体。这种类型的渗漏不会触发液体渗漏检测器。

9.5.1 渗漏

如果不时有干冰颗粒溅射的可见渗漏，即表示出现较大的渗漏，通常说明出现问题的接头并非是靠手拧的。出现这种渗漏时，在用户采取补救措施之前，软件可能关闭系统。

许多小渗漏肉眼不可见的，但可能会间歇性地冻结，再融化，造成压力不稳定。这种情况可能会使升压泵和/或 BPR 试图重新稳定压力。系统可能一直无法进入就绪状态，最终将会停机。这种渗漏可能会使发生渗漏的接头的触感比其余部分略冷，但也非必然。这种情况仍应视为大渗漏事故。

内置软件渗漏检测，如安捷伦分析型 SFC 控制模块可以帮助自动检测渗漏，但这需要安装某些硬件并运行诊断软件，可能需要几个小时。但是，这种功能不能检测到任何渗漏的实际位置。

还有一种根据气相色谱大量经验总结出来的更简便、快速而有效的方法。将一两滴肥皂水滴在每处接头上，如果该接头有渗漏，几乎立刻就可以检测到，大气泡表明有大渗漏，几个小气泡，表明是无关紧要的小渗漏。市场上有为进行此项工作而设计的各种商品，也可以稀释家用洗涤剂来完成同样的工作。但有些市售产品上有方便的 1/16 英寸内径的洒注管，可以方便地将一两滴肥皂水滴涂在每个接头上。

色谱系统每次变动后（例如，更换色谱柱），每个松开又再拧紧接头都应该在加压后立刻用肥皂水进行检测，以确定是否有细小的渗漏。滴涂一两滴溶液后，接头处会立刻冒出小于或远小于 1 mm 的微小气泡。但如果继续观察接头，没有发现进一步出现气泡，则表明接头是拧紧的。这应该是整个系统中每个接头的标准。

9.5.2

密封垫圈

HPLC 接头的设计不一定要考虑到处理低粘度流体，如，SFC 中使用的流动相。因此，经常会将接头拧得过紧以防渗漏。经过几次松开再连接的两片不锈钢密封垫圈可能会变形，逐渐变得难以密封。最终密封垫圈可能在接头中被压碎，建议在变形开始后就更换管路。

单片不锈钢密封垫圈在反复拧紧过程中不会变形，但在接近管路末端的任何轻微弯曲，都可以挤压接头中的密封垫圈，使其几乎无法从管上取下来。

聚酰亚胺密封垫圈不会变形，至少在不锈钢管路上很容易防漏，但也可能会在接头中被压碎。所幸此密封垫圈通常可以很容易地取出，因为它们相对较软。不建议在不锈钢管路上使用 PEEK 垫圈，因为这种密封垫圈可能无法对抗管路所承受的高压，可能损坏，使管路从接头上弹出，造成系统漏气。对于 PEEK 管路，作者一直使用的是不锈钢密封垫圈，技巧是可以切入管路，永久成型。

最常反复操作的位置和关注的连接点是色谱柱端接头。将一个接头插入色谱柱，通常意味着无法使接头密封，潜在地影响了该色谱柱的进一步使用。过去，作者曾用一根 10 cm 的管路连接到新色谱柱的两端，使用的是新管路、螺母和垫圈，一直没有从色谱柱上取下来。这就避免了将易受损坏的接头用于色谱柱和管路的另一端。如果接头损坏，管路总还能从色谱柱上取下来进行更换。

购自不同制造商的色谱柱可能具有不同的导孔深度（需伸过密封垫圈的管路长度）。深度的差异从 1.5 到（至少）4 mm 不等，这意味着，更换色谱柱时，为了避免形成混合腔或扩散腔，导致谱带过度展宽，连接管路也需要更换。

最近，安捷伦推出了几种新型接头，很大程度上解决了这些问题。有一种类型的接头，将聚酰亚胺密封垫圈附在了螺母上。螺母可以旋入接头，直到用手拧紧为止。将穿入密封垫圈的管子推入直到其接触接头座。然后用一个杠杆锁定位置，用松紧适当的弹簧将密封垫圈垫圈牢牢地压入座中，实现手拧密封。这种密封非常适合具有不同导孔深度的色谱柱，因为这个深度是可以调节的。这种接头保证能够进行 200 多次拧紧-松开连接，特别推荐用于色谱柱端接头。

9.6 SFC 的超高性能

在编撰本文时，还没有出现为配置真正的超高效超临界流体色谱仪的标准商用 SFC 仪器。在本文中，超高效 SFC 是指使用内径小于 4.6 mm 的亚 2 μm 粒径色谱柱。

仅仅使用这种填料和色谱柱，并不代表真正的性能。至少，仪器特性应该是在 k 大于或等于 2 时，至少应达到色谱柱理论柱效的 90%。

SFC 使用亚 2 μm 粒径色谱柱时通常不需要超高压仪器，因为 CO_2 型流动相的粘度很低，因而压降也很低。即使在相对较高的改性剂浓度条件下（例如 50 到 60%），填充 1.8 μm 填料 100 mm 色谱柱的压降几乎不会超过 250 bar。但使用更长的色谱柱或在小粒径填料条件下超过最佳流速时，可以得到需要的高压系统。虽然没必要使用超泵压，但其他方面的仪器设计却决定了有效使用亚 2 μm 色谱柱的能力。

9.6.1 流通池体积

看来大多数色谱仪都是针对特定色谱柱而设计的，规定了所有部件的尺寸，特别是所用的 UV 流通池。作为一个经验法则，任何 UV 检测器流通池的体积都不能超过该系统预计产生最快色谱峰时所含流动相体积的五分之一。大流通池将导致柱外谱带展宽，损失柱效和相邻峰之间的分离度。对于理想的填充 5 μm 填料的 4.6 x 150 mm 色谱柱来说， k 等于 1 的峰体积约为 (4σ) 150 μL 。可以使用的流通池约为 30 μL 。对于填充 3.5 μm 填料的 4.6 x 150 mm 色谱柱，峰体积 (k 等于 1) 约为 80 μL ，需要流通池体积小于或等于 18 μL ，才能避免早期洗脱峰的展宽。

1.8 μm 粒径 4.6 mm 内径柱的最佳流速是 5 mL/min，这是安捷伦分析型 SFC 系统的最高流速。将柱内径减小到 3 mm，最佳流速降为 1.7 到 2.0 mL/min，这取决于改性剂浓度。使用小内径色谱柱时，流通池体积必须要小得多。对于填充 1.8 μm 填料 3 x 100 mm 的色谱柱， k 等于 1 的峰体积约为 15.5 μL ，流通池体积需要小于 3 μL 。对于填充 1.7 μm 填料的 2.1 x 100 mm 柱来说， k 等于 1 的峰体积理论上为 7.3 μL ，要求流通池体积小于 1.5 μL 。

最近，市面推出了一款 3 mm，2 μL 流通池，具有锥形通孔，对热导致的噪音很不敏感。使用亚 2 μL 填料柱时，强烈推荐这种流通池。

9.6.2 管路

连接进样阀到色谱柱和色谱柱到 UV 检测器的管路也能对柱外谱带展宽有很大贡献。目前尚没有任何一款 SFC 系统的管径和长度是为真正的超高效 SFC 系统而设计的。

连接管内的扩散引起的峰畸变是直接与管路长度和半径的四次方成正比。安捷伦分析型 SFC 系统中的标准 175 μm 内径管路对于使用填充亚 2 μm 填料的色谱柱来说，内径过大，过长。因此，为了得到最佳性能，需要对使用亚 2 μm 柱的仪器稍加改造。

对于较小的 3 mm 检测器流通池，大多数管路换成 125 μm 内径管路，安捷伦分析型 SFC 系统可以为填充 1.8 μm 填料的 3 x 100 mm 色谱柱提供约 90% 的柱效， k 低至 2.5。这种色谱柱与填充 3.5 μm 填料的 4.6 x 150 mm 柱相比，可以在不到三分之一的时间内提供高出 20% 的柱效。

9.7 在 SFC 与 HPLC 之间切换的 混合型系统

安捷伦分析型 SFC/UHPLC 混合系统可以配置为混合型系统¹¹⁷，可在 SFC 和正相或反相 HPLC 操作之间来回快速切换，甚至是在一个分析序列内。这实在令人惊讶，因为在不超过百分之零点几的范围内，水可与 CO_2 混溶。但是，一旦有极性改性剂，那么很容易在几种技术切换之间清洗系统。一个附加泵（一般为四元泵）将与 2 位/10 通阀一起配置。普通的 SFC 二元泵只用于 SFC 模式。附加泵只用于输送 HPLC 溶剂混合物，通常是水性溶剂。两套系统将共用脱气机、自动进样器、柱温箱和检测器。以 SFC 模式操作的系统示意图见图 9.17。图 9.18 显示了 HPLC 模式的系统操作。反相和极性柱都安装在一个柱温箱中的 2 位/6 通色谱柱选择阀上，或使用方法开发设置对多根色谱柱进行自动筛选¹¹⁷。

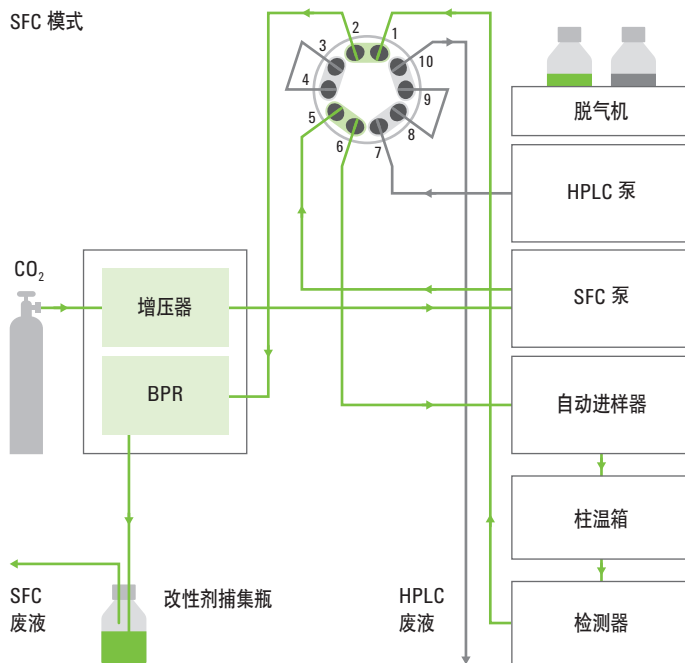


图 9.17 安捷伦分析型 SFC/UHPLC 混合系统 SFC 操作的配置示意图

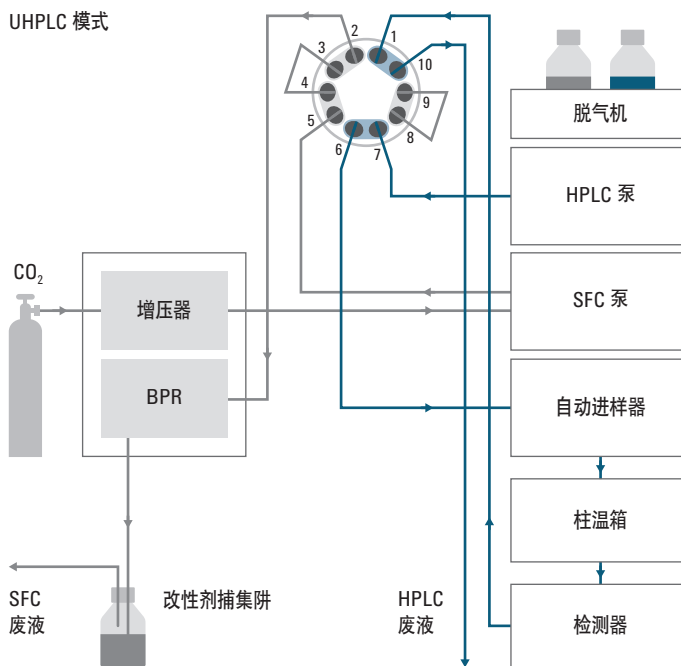


图 9.18 安捷伦分析型 SFC/UHPLC 混合系统 UHPLC 操作的配置示意图

切换阀更换技术时，来自其他技术的少量流动相可能会进入另一根色谱柱，但很快会得到重新平衡。切换用不了几分钟。

在同一仪器上，用 SFC 和 UHPLC 对三种不同溶质系列的 8 种化合物混合物（咖啡因、茶碱、可的松、强的松、氢化可的松、强的松龙、磺胺甲基嘧啶和磺胺嘧啶）进行了分离¹¹⁸。6 次 SFC 分析后接着执行两次冲洗和一个空白进样，清除系统中的 SFC 流动相。6 次 UHPLC 进样后接着执行一次 SFC 冲洗和一个空白进样。再运行 4 次 SFC 分析，然后接着执行两次冲洗和一个空白进样，以及 4 个 UHPLC 分析，再冲洗，最后两次额外的 SFC 分析。所有运行都包含在一个自动化序列中进行控制。所有 12 次 SFC 分析的结果叠加，见图 9.19 的上图。作者报告，等度分离的保留时间 RSD 介于 0.04 到 0.08% 之间，而梯度分析的 RSD 介于 0.02 到 0.04% 之间。

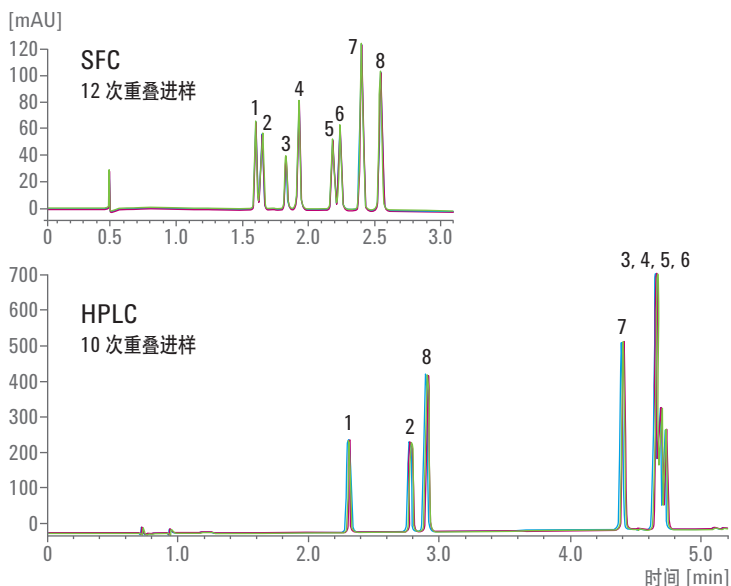


图 9.19 序列分析结果：6 次 SFC 分析，接着 6 次 UHPLC 分析，4 次 SFC 分析，4 次 UHPLC 分析，最后是 2 次 SFC 分析。在方法切换之间，用几个梯度冲洗空白样冲洗系统。所有 12 次 SFC 分析的叠加结果见上图。同样，所有反相 HPLC 分析的叠加结果见下图

实验还叠加了 10 个 UHPLC 色谱图（图 9.19 中的下图），显示保留时间重现性 RSD 约为 0.2%。对两种方法的结果进行对比，再一次展示了两种技术的正交性，因为两组数据的洗脱顺序明显不同。选择性存在如此大的差别，在需要使用两种正交方法时，此性能会很受欢迎。例如，为了确保主峰下没有隐藏痕量污染物时。在这个特殊的对比中，UHPLC 方法使用的是 2.7 μm 填料，SFC 使用的是 5 μm 填料。

9.8 质谱仪接口

从 25 年多以前开始，几乎每种质谱仪都配有与 SFC 系统连接的接口。随着质谱仪设计的进步，接口也变得更为简单。实际上，现在将 BPR 出口与 MS 离子源入口直接连接是可行的，只需使用一根 125 到 250 μm 的不锈钢管路，虽然这会稍稍导致峰变宽，见图 9.20。大部分的压降将发生在 BPR 上，但这主要是管路引起的反压。然而，流体达到离子源时，大部分流动相都会蒸发，变成不良溶剂。辅助泵将输送低流量的改性剂，通常为甲醇，以确保不让溶质附着在传输管路壁上。组分改变时，改变分流比例不会出现问题。

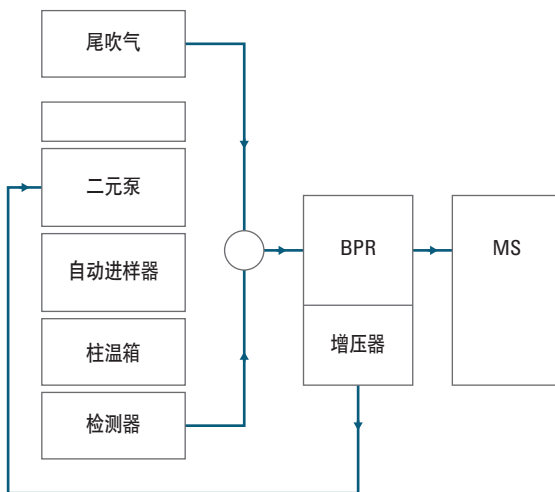


图 9.20 SFC 到 MS 的简单接口。流经 BPR 的所有液体都将进入 MS 离子源。辅助泵会在 BPR 之前加入小流量的极性改性剂和添加剂

另一种接口由几个三通和 1 米长的 50 μm 内径不锈钢管路组成，示意图见图 9.21。在 UV 检测器之后，流体将由三通进行分流。典型的分流比为 5:1，少部分流体进入 MS，而大部分则通过 BPR。辅助泵也适用于这一配置。辅助液流通过另一个三通在分流前或分流后加入。限流器安装在第二个三通的下游，直接连接至 APCI 或 ESI 源上。辅助流可确保有足够的液体进入 MS 进行离子化，也用于将组成和粘度改变所引起的分流比变化降至最低。

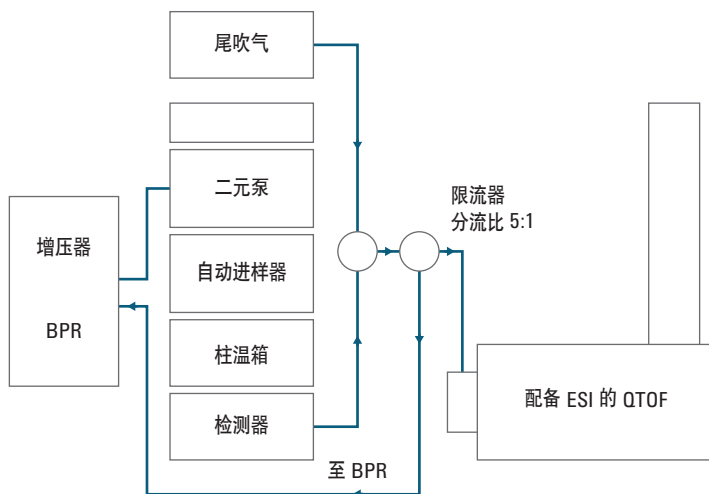


图 9.21 另一种接口示意图，其中检测器后连有两个三通，用于添加来自辅助泵的改性剂以及对流体进行分流。本示例使用了 1 m 长的 50 μm 不锈钢管路，提供大约 1:5 的分流比，少量部分进入 MS

使用质谱仪作为附加检测器时，混合型系统是最通用的。在 SFC/MS 和 HPLC/MS 间快速切换是一项非常强大的功能，特别适用于需要正交方法的痕量分析。将正相 SFC 和反相 HPLC 方法结合使用，性能大大优于采用两个反相 HPLC 方法。

9.9

其他检测器

质谱仪中使用的同类分流接口适用于 HPLC 中常用的许多检测器，这些检测器都可在大气压下操作。

9.9.1

蒸发光散射检测器

HPLC 中最通用的可在大气压下操作的是蒸发光散射 (ELS) 检测器¹¹⁹⁻¹²¹。蒸发光散射检测器与 SFC 系统联用已有 25 年多的历史。ELS 检测器几乎是一款通用检测器，因此样品不需要拥有 UV 发色团，使用的分流比与第 9.8 节“质谱接口”中所描述的相同。

9.9.2

气相色谱检测器

过去，SFC 系统通常会配置气相色谱仪作为柱温箱。从而使其便于与大多数 GC 检测器连接，大多数 GC 检测器都已与填充柱 SFC 连接。包括火焰离子化检测器 (FID)、电子捕获检测器 (ECD)、氮磷检测器 (NPD) 和硫化学发光检测器 (SCD)。

大多数 GC 检测器均使用大分流比，只有总液流的一小部分会进入检测器（取决于检测器类型），而其余部分则通过 BPR 排放。这些检测器几乎都使用 100% 的 CO₂，需要不同形式的限流器（相比目前为止的讨论）。限流器由一根 25 到 30 cm 的 50 μm 内径熔融石英管路构成，在最后的 1 到 2 mm 处拉出几微米长的尖部。压降差不多就在这最后的短节上，将溶质保持在溶液中直到最后一刻。大号限流器可以与质谱仪和 ELS 检测器一起使用，但容易堵塞，且比较难处理。

9.9.2.1

火焰离子化检测器

火焰离子化检测广泛用于毛细管和填充柱 SFC，主要是以纯 CO₂ 为流动相，虽然也用过几种其他纯流体。在几个示例中，CO₂ 中加入少量的水可以洗脱极性较大的溶质，如游离脂肪酸。

有几种 ASTM SFC 方法仍广泛用于分析柴油中的芳香烃和汽油中的烯烃，这些方法全都使用的是 CO₂ 和 FID。和大多数在高温下采用压力或密度程序的老方法不同，这两个石油应用方法都用的是恒定出口压力和接近室温的温度，因而可以与安捷伦分析型 SFC 系统兼容。最近，市场推出了一款基于安捷伦硬件的独立型 FID，可以与安捷伦色谱数据系统连接。

FID 只允许使用相对低流速的 CO_2 。传统上，石油方法是在 4.6 mm 内径色谱柱或微填充柱上进行的。到目前为止，速度最快、分离度最高、重现性最好的结果都采用较大的色谱柱（而不是微填充柱）获得。使用 4.6 mm（或 3 甚至 2.1 mm）色谱柱，需要较大的分流比，部分原因是样品很洁净。限流器的设计是关键因素。分析中未使用尾气气流，因为 FID 近似于通用检测器，当改性剂存在时会有一个较大的基线位移。进入到 FID 的 CO_2 气体流速（大气压下）通常约为 10 到 40 mL/min。通过 4.6 mm 内径柱的流速，在大气压下测量约为 1000 mL/min。所以，需要使用 25:1 到 100:1 的分流比。需要使用整体式限流器（直径 1 到 2 μm 的针孔）或小于 25 μm 长的线性限流器。这种要求与大多数其他 GC 检测器相似，如氮磷检测器、电子捕获检测器和许多其他检测器，但许多这些检测器都可以使用改性流体。

9.9.3 手性检测器

已广泛用于 HPLC 的几款手性检测器（可以区分左旋右旋手性对映异构体）已被用到 SFC 中。圆二色检测器和激光旋光计也已得到使用，这些检测器都可以处理高压条件下通过色谱柱的全部流体，不需要使用分流器。这些检测器可帮助您确定对映异构体的洗脱顺序，使用各种色谱柱进行筛分一般会涉及外消旋混合物，因此很容易就能确定哪种对映体先洗脱。理想情况下，在进行对映体过量检测时，较低浓度的对映体应该先洗脱，以避免高浓度对映体拖尾，从而可以进行更准确的定量。但是，如果没有手性检测器，如果不收集色谱峰并进行离线分析，就无法快速确定先洗脱的是哪个对映体。

9.9.4 不适用的检测器

最明显不适用的检测器是荧光检测器。所有现有的市售 HPLC 荧光检测器都不能兼容所需的高出口压力，现有检测器的机械设计使其无法安装高压流通池。

HPLC 中最广泛应用的检测器之一是示差折光 (RI) 检测器。从前面的讨论来看，很显然，在使用常用改性剂进行 CO₂ 梯度洗脱的过程中，RI 会发生很大的变化。

参考文献

1. Giddings, J.C., Myers, M.N., McLaren, L.M., Keller, R.A., High Pressure Gas Chromatography of Nonvolatile Species, *Science*, **1968**, *162*, 67–73
2. Dorsey, J.G., Solvatochromic Investigations of Chromatographic Retention Mechanisms, *Chromatography*, **1987**, *2*, 37–41
3. Graham, J.A., Rogers, L.B., Effect of Column Length, Particle Size, Flow Rate and Pressure Programming Rate on Resolution in Pressure programmed Supercritical Fluid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, **1980**, *18*, 75–84
4. Novotny, M., Bertsch, W., Zladkis, A., Temperature and Pressure Effects in Supercritical Fluid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **1971**, *61*, 17–28
5. Schoenmakers, P.J., Open Columns or Packed Columns for Supercritical Fluid Chromatography: a comparison, in Supercritical Fluid Chromatography, Smith, R.M., ed., *Royal Society of Chemistry*, London, **1988**, Chapter 4
6. White, C., Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool. Part I. Fast chiral screening and purification, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 163–173
7. Maftouh, M., Granier-Loyaux, C., Chavana, E., Marini, J., Pradines, A., Vander Heyden, Y., Picard, C., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1088*, 67–81
8. Weast, R.C., ed., Handbook of Chemistry and Physics, 69th Ed, *CDC Press*, Boca Raton FL, Section F-48, **1988**
9. Kong, C.Y., Fanazukuri, T., Kagei, S., Binary diffusion coefficients and retention factors for polar compounds in supercritical carbon dioxide by chromatographic impulse response method, *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, *37*, 359

10. Pizarro, C., Suárez-Iglesias, O., Medina, I., Bueno, J.L., Binary diffusion coefficients for 2,3-dimethylaniline, 2,6-dimethylaniline, 2-methylanisole, 4-methylanisole and 3-nitrotoluene in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, **2009**, *48*, 1–8
11. Smith, S.A., Shenai, V., Matthews, M.A., Diffusion in Supercritical Mixtures: CO₂ + Cosolvent + Solute, *J. Supercrit. Fluids*, **1990**, *3*, 175–179
12. Mantell, C., Rodriguez, M., Martinez de la Ossa, E., Measurement of the diffusion coefficient of a model food dye (malvidin 3,5-diglucoside) in a high pressure CO₂ + methanol system by the chromatographic peak-broadening technique, *J Supercrit. Fluids*, **2003**, *25*, 57–68
13. Walsh, J.M., Ikonomou, G.D., Donohue, M.D., Supercritical Phase Behavior: The entrainer effect, *Fluid Phase Equil.*, **1987**, *33*, 295–314
14. Gonzales, B., Calvar, N., Gomez, E., Domingues, A., Density, dynamic viscosity, and derived properties of binary mixtures of methanol or ethanol with water, ethyl acetate, and methyl acetate at T = (293.15, 298.15, and 303.15) K, *J. Chem. Thermodynamics*, **2007**, *39*, 1578–1588
15. Euerby, M., Fever, M., James, M., Pipe, C., Schad, G., Bayly, K., Exploration of Chromatograph Selectivity difference between SFC and reversed phased UHPLC using the Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC-DAD/MS, poster presented at SFC, **2012** (available online)
16. Berger, T.A., Wilson, W.H., Packed Column SFC with 220,000 Plates, *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 1451
17. Kot, A., Sandra, P., Venema, A., Subcritical and supercritical fluid chromatography on packed-columns- a versatile tool for the enantioselective separation of basic and acidic drugs, *J. Chromatogr. Sci.*, **1994**, *32*, 439–448
18. Berger, T.A., Packed Column SFC, *Royal Society of Chemistry*, London, **1995**
19. Taylor, L.T., (review), Packed column supercritical fluid chromatography of hydrophilic analytes via water-rich modifiers, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1250*, 196–204

20. Bola, B., Greig, M., Ventura, M., Farrell, W., Aurigemma, C.M., Li, H., Quenzer, T.L., Tivel, K., Bylund, J.M.R., Tan, P., Pham, C., Phillipson, D., SFC/MS in drug discovery at Pfizer, La Jolla, *Intl. J. Mass Spectrom.*, **2004**, *238*, 85–97
21. Zheng, J., Pinkston, J.D., Zoutendam, P.H., Taylor, L.T., Feasibility of supercritical fluid chromatography/mass spectrometry of polypeptides with up to 40-Mers, *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 1535–45
22. Liu, J., Regalado, E.L., Mergelsberg, I., Welch, C.J., Extending the range of supercritical fluid chromatography by use of water-rich modifiers, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 4925–4929
23. Patel, M.A., Riley, F., Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L.T., Supercritical fluid chromatographic resolution of water soluble isomeric carboxyl/amine terminated peptides facilitated via mobile phase water and ion pair formation, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1233*, 85–90
24. Patel, M.A., Riley, F., Wang, J., Lovdahl, M., Taylor, L.T., Packed column supercritical fluid chromatography of isomeric polypeptide pairs, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 2593–2597
25. Mourier, P.A., Eliot, E., Caude, M., Rosset, R., Tambute, A., Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers, *Anal. Chem.*, **1985**, *57*, 2819–2823
26. Pescher, P., Caude, M., Rosset, R., Tambute, A., Enantiomeric separation of tertiary phosphine oxides on Pirkles's chiral stationary phase: mobile phase and temperature optimization, *J. Chromatography*, **1986**, *37*, 159–175
27. Steuer, W., Schindler, M., Schill, G., Erni, F., Supercritical fluid chromatography with ion-pairing modifiers: separation of enantiomeric 1,2-aminoalcohols as diastomeric ion pairs, *J. Chromatogr.*, **1988**, *441*, 287–296
28. Berger, T.A., Wilson, W.H., Separation of Anilines, Benzamides, Benzylamines, and Phenylethylamines by Packed Column SFC, *J. Chromatogr. Sci.*, **1993**, *31*, 127
29. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, March **2001**, *46*, 3–26, doi:10.1016/S0169-409X(00)00129-0. PMID 11259830

30. Klesper, E., Corwin, A.H., Turner, D.A., High Pressure Gas Chromatography above Critical Temperatures, *J. Org. Chem.*, **1960**, 27, 700
31. Giddings, J.C., Manwaring, W.A., Myers, M.N., Turbulent Gas Chromatography, *Science*, **1966**, 154, 146–148
32. Myers, M.N., Giddings, J.C., Ultrahigh pressure gas chromatography in microcolumns to 2000 atmospheres, *Sep. Sci.*, **1966**, 1, 761–776
33. Giddings, J.C., Myers, M.N., King, J.W., Dense gas chromatography at pressures to 2000 atmospheres, *J. Chromatogr. Sci.*, **1969**, 7, 276–283
34. Sie, S.T., Rijnders, G.W.A., High pressure gas chromatography and chromatography with supercritical fluids, II, Permeability and efficiency of packed columns with high pressure fluids as mobile fluids under conditions of insipient turbulence, *Sep. Sci.*, **1967**, 2, 729–753
35. Mourier, P.A., Eliot, E., Caude, M.H., Rosset, R.H., Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of the phosphine oxide enantiomers, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2819–2823
36. Cui, Y., Olesik, S.V., High-performance liquid chromatography using mobile phases with enhanced fluidity, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1812–1819
37. Berger, T.A., Packed Column SFC, *RSC Chromatography Monographs Series*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **1995**
38. Peadar, P.A., Feldstedt, J.C., Lee, M., Springston, R., Novotny, M., Instrumental aspects of supercritical fluid chromatography, *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1090–1093
39. Goldfarb, D.L., Fernández, D.P., Corti, H.R., Dielectric and volumetric properties of supercritical carbon dioxide-methanol mixtures at 323.15 K, *Fluid Phase Equilibria*, **1999**, 158(1), 1011–1019
40. Berger, T.A., Density of Methanol-Carbon Dioxide Mixtures at Three temperatures: Comparison with Vapor Liquid Equilibria Measurements and Results obtained from Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1991**, 14, 312–316
41. Snyder, L.R., Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *J. Chromatogr.*, **1974**, 92, 223–230

42. Snyder, L.R., Classification of the Solvent Properties of Common Liquids, *J. Chromatogr. Sci.*, **1978**, *16*, 223–234
43. Snyder, L.R., *Principles of Adsorption Chromatography*, Dekker, New York, **1976**, Chapter 8
44. Kraml, C., private communication, **2005**
45. Deye, J.F., Berger, T.A., Anderson, A.G., Nile Red as a Solvatochromic Dye for Measuring Solvent Strength in Normal Liquids and Mixtures of Normal Liquids with Supercritical and Near Critical Fluids, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 615
46. Berger, T.A., Deye, J.F., Use of Solvatochromic Dyes to Correlate Mobile Phase Solvent Strength to Chromatographic Retention in SFC, *Supercritical Fluid Technology*, Bright, F.V. and McNally, M.E.P, eds., ACS Symposium Series 488, American Chemical Society, Washington, D.C., **1992**
47. Smith, S.A., Shenai, V., Matthews, M.A., Diffusion in Supercritical Mixtures: CO₂ + Cosolvent + Solute, *J. Supercritical Fluids*, **1990**, *3*, 175–179
48. Strubringer, J.R., Song, H., Parcher, J.F., High pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 2. Binary isotherms of carbon dioxide and methanol, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 104–108
49. Strubringer, J.R., Song, H., Parcher, J.F., High pressure phase distribution isotherms for supercritical fluid chromatographic systems. 1. Pure carbon dioxide, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 98–103
50. Luo, Z., Xiong, Y., Parcher, J.F., Chromatography with Dynamically Created Liquid “Stationary” Phases: Methanol and Carbon Dioxide, *Anal. Chem.*, **2003**, *75(14)*, 3557–3562
51. Ashraf-Korassani, M., Fessahaie, M.G., Taylor, L.T., Berger, T.A., Deye, J.F., Rapid and Efficient Separation of PTH-Amino Acids Employing Supercritical CO₂ and an Ion Pairing Agent, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1988**, *11*, 352
52. Berger, T.A., Deye, J.F., Ashraf-Korassani, M., Taylor, L.T., Gradient Separation of PTH-Amino Acids employing Supercritical CO₂ and Modifiers, *J. Chromatogr. Sci.*, **1989**, *27*, 105–110

53. Stringham, R.W., Chiral separation of amines in subcritical fluid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1070*, 163–170
54. Berger, T.A., Deye, J.F., Role of additives in packed column supercritical fluid chromatography: suppression of solute ionization, *J. Chromatogr.*, **1991**, *547*, 317–392
55. Berger, T.A., Deye, J.F., Separation of Phenols by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, **1990**, *29*, 54–59
56. Philibert, G.S., Olesik, S.V., Characterization of enhanced-fluidity liquid hydrophilic interaction chromatography for the separation of nucleosides and nucleotides, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 8222–8230
57. West, C., Lesellier, E., Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1203*, 105–113
58. Berger, T.A., Demonstration of High Speeds with Low Pressure Drops Using 1.8 μm Particles in SFC, *Chromatographia*, **2010**, *72*, 597–602
59. Halasz, I., Endeke, R., Asshauer, J., Ultimate Limits in High-Pressure Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **1975**, *112*, 37–60
60. Lin, H.-J., Horvath, S., Band spreading in liquid chromatography. General plate height equation and a method for the evaluation of the individual plate height contributions, *Chem. Eng. Sci.*, **1981**, *36*, 47
61. Poppe, H.H., Kraak, J.C., Influence of thermal conditions on the efficiency of high-performance liquid chromatographic columns, *J. Chromatogr.*, **1983**, *282*, 399–412
62. de Villiers, A., Lauer, H., Szucs, R., Goodall, S., Sandra, P., Influence of frictional heating on temperature gradients in ultra-high-pressure liquid chromatography on 2.1mm I.D. columns, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1113*, 84–91
63. Kaczmarek, K., Poe, D.P., Tarafder, A., Guiochon, G., Pressure, temperature and density drops along supercritical fluid chromatography columns. II. Theoretical simulation for neat carbon dioxide and columns packed with 3- μm particles, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1250*, 115–123

- 64.** Zauner, J., Lusk, R., Koski, S., Poe, D.P., Effect of the thermal environment on the efficiency of packed columns in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1266*, 149–157
- 65.** Poe, D.P., Veit, D., Ranger, M., Kaczmarek, K., Tarafder, A., Guiochon, G., Pressure and density drops along supercritical fluid chromatography columns. I. Experimental results for neat carbon dioxide and columns packed with 3- and 5-micron particles, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1250*, 105–114
- 66.** Berger, T.A., Characterization of a 2.6 μm Kinetex porous shell hydrophilic interaction liquid chromatography column in supercritical fluid chromatography with a comparison to 3 μm totally porous silica, *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*, 4559–4568
- 67.** Lesellier, E., Latos, A., Lopes deOliveira, A., Ultra high efficiency/low pressure supercritical fluid chromatography with superficially porous particles for triglyceride separation, *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1327*, 141–148
- 68.** Lesellier, E., Efficiency in supercritical fluid chromatography with different superficially porous and fully porous particles ODS bonded phases, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1228*, 89–98
- 69.** Berger, T.A., Deye, J.F., Effect of Column and Mobile Phase Polarity using Steroids as Probes in Packed Column Supercritical Fluid Chromatography, *J. Chromatogr. Sci.*, **1991**, *29*, 280–286
- 70.** Berger, T.A., Wilson, W.H., Separation of Drugs by Packed Column SFC: 2. Antidepressants, *J. Pharm. Sci.*, **1994**, *83*, 287–290
- 71.** Berger, T.A., Deye, J.F., Density of Methanol-Carbon Dioxide Mixtures at Three Temperatures, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1991**, *14*, 312–316
- 72.** Berger, T.A., Wilson, W.H., Separation of Drugs by Packed Column SFC: 1. Phenothiazine Antipsychotics, *J. Pharm. Sci.*, **1994**, *83(3)*, 281–286
- 73.** Berger, T.A., Wilson, W.H., Separation of Drugs by Packed Column SFC: 3. Stimulants, *J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 489–492
- 74.** Berger, T.A., Separation of Phenylurea Herbicides by Packed Column SFC, *J. Chromatogr. Sci.*, **1994**, *32*, 25

- 75.** Lemmon, E.W., Huber, M.L., McLinder, M.O., NIST Reference Database 23: Reference Fluid Thermodynamic and Transport Properties-REFPROP, Version 9.1, *National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program*, Gaithersburg, **2013**
- 76.** Span, R., Wagner, W.J., A New Equation of State for Carbon Dioxide Covering the Fluid Range from the Triple Point Temperature to 1100 K at Pressures up to 800 MPA, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1966**, *25*(6), 1509–1596
- 77.** de Reuck, K.M., Craven, R.J.B., Methanol International Thermodynamic Tables of the Fluid State- 12, *IUPAC, Blackwell Scientific Publications*, London, **1993**
- 78.** Berger, T.A., Berger, B.K., Separation of Natural Food Pigments in Saponified and un-Saponified Paprika Oleoresin by Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UPSFC), *Chromatographia*, **2013**, *76*, 591–601
- 79.** Berger, T.A., Berger, B.K., Separation of 9 Sulfonamide Drugs in about 4 minutes by Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography (UPSFC): with a Feasibility Study for Detection in Milk, *Chromatographia*, **2013**, *76*, 1631–1639
- 80.** White, C., Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool. Part I. Fast chiral screening and purification, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1074*, 163–173
- 81.** Maftouh, M., Granier-Loyaux, C., Chavana, E., Marini, J., Pradines, A., Vander Heyden, Y., Picard, C., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery, *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1088*, 67–81
- 82.** daSilva, J.O., Coes, B., Frey, L., Mergelsberg, I., McClain, R., Nogle, L., Welch, C.J., Evaluation on non-conventional polar modifiers on immobilized chiral stationary phases for improved resolution of enantiomers by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr.*, **2014**, *1328*, 98–103
- 83.** Franco, P., Zhang, T., Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases, *J. Chromatogr. B*, **2008**, *875*, 48–56

- 84.** Miller, L., Evaluation of non-traditional modifiers for analytical and preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1256*, 261–266
- 85.** Byrne, N., Hayes-Larson, E., Liao, W., Kraml, C.M., Analysis and purification of alcohol-sensitive chiral compounds using 2,2,2-trifluoroethanol as a modifier in supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **2008**, *875*, 237–242
- 86.** Gasparini, F., Misity, D., Villani, C., Direct resolution in sub- and supercritical fluid chromatography on packed columns containing trans-1,2-diaminocyclohexane derivatives as selectors, *Trends Anal. Chem.*, **1993**, *12*, 137–144
- 87.** Welch, C.J., Biba, M., Gouker, J.R., Kath, G., Augustine, P., Hosek, P., Solving multicomponent chiral separation challenges using a new SFC tandem column screening tool, *Chirality*, **2007**, *19*, 184
- 88.** Hamman, C., Wong, M., Hayes, M., Gibbons, P., A high throughput approach to purifying chiral molecules using 3 μm analytical chiral stationary phases via supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **2011**, *1218*, 3529–3536
- 89.** Medvedovici, A., Sandra, P., Toribio, L., David, F., Chiral packed column subcritical fluid chromatography on polysaccharide and macrocyclic antibiotic chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A*, **1977**, *785*, 159–171
- 90.** Pirzada, Z., Personick, M., Biba, M., Gong, X., Zhou, L., Schafer, W., Roussel, C., Welch, C.J., Systematic evaluation of new chiral stationary phases for supercritical fluid chromatography using a standard racemate library, *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 1134–1138
- 91.** Zhao, Y., Woo, G., Thomas, S., Semin, D., Sandra, P., Rapid method development for chiral separation in drug discovery using sample pooling and supercritical fluid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2003**, *1003*, 157–166
- 92.** Garzotti, M., Hamdan, M., Supercritical fluid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry: a powerful tool for the analysis of chiral mixtures, *J Chromatogr B*, **2002**, *770*, 53–61

93. Garcia, I., Cruz Ortiz, M., Sarabia, L., Vilches, C., Gredilla, E., Advances in methodology for the validation of methods according to the International Organization for Standardization Application to the determination of benzoic and sorbic acids in soft drinks by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2003**, *992*, 11–27
94. Tfouni, S.A.V., Toledo, M.C.F., Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food, *Food Control*, **2002**, *13*, 117–123
95. Ping, Q., Hong, H., Xiaoyan, L., Donghao, L., Assessment of benzoic acid levels in milk in China, *Food Control*, **2009**, *20*, 414–418
96. Lino, C.M., Pena, A., Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment, *Food Chemistry*, **2010**, *121*, 503–508
97. Cressey, P., Jones, S., Levels of preservatives (sulfite, sorbate and benzoate) in New Zealand foods and estimated dietary exposure, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, **2009**, *26*, 604–13
98. Zygmunt, L.C., Gas-liquid chromatographic determination of sorbic acid and sodium benzoate in table syrup, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1979**, *62*, 939–42
99. Dong, C., Mei, Y., Chen, L., Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1117*, 109–14
100. Hui, L.I., Hu, Y-D., Sun, X-Y., Simultaneous determination of sodium benzoate and potassium sorbate by ultraviolet spectrophotometry with nonlinear iterative optimization, *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, **2006**, *10*
101. Costa, A.C., Perfeito, L.S., Tavares, M.F., Micke, G.A., Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis-Optimization of the method with inspection of ionic mobilities, *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1204*, 123–7
102. Chen, Q-C., Wang, J., Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography, *J Chromatogr. A*, **2001**, *937*, 57–64

- 103.** Liu, Q-R., Chu, S-M., Yang, W-C., Zhang, L., Peng, Q-L., Eng, H.G-X., Shi, Q-Z., High-performance Ion Chromatographic Determination of Benzoic Acid in Paprika Oleoresin, *Food Science*, **2009**, 12
- 104.** Mihyar, G.F., Yousif, A.K., Yamani, M.I., Determination of Benzoic and Sorbic Acids in Labaneh by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Food Composit. Anal.*, **1999**, 12, 53–61
- 105.** Pylypiw, H.M., Jr., Grether, M.T., Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 883, 299–304
- 106.** Fernando Mota, J.M., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Cunha, S.C., Beatriz, M., Oliveira, P.P, Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs, *Food Chemistry*, **2003**, 82, 469–473
- 107.** G Arli, G., Lafci, Y., A novel RP-HPLC method for simultaneous determination of potassium sorbate and sodium benzoate in soft drinks using C(18)-bonded monolithic silica column, *Can. J. Sep. Sci.*, **2011**, May 19, doi: 10.1002/jssc.201100172, Epub ahead of print
- 108.** Berger, T.A., Deye, J.F., Separation of Hydroxybenzoic Acids by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography using Modified Fluids with Very Polar Additives, *J. Chromatogr. Sci.*, **1991**, 29, 26–30
- 109.** Berger, T.A., Deye, J.F., Separation of Benzene Polycarboxylic Acids by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography using Methanol-Carbon Dioxide Mixtures with Very Polar Additives, *J. Chromatogr. Sci.*, **1991**, 29, 141–146
- 110.** Kritsunankula, O., Jakmunee, J., Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography, *Talanta*, **2012**, 84, 1342–1349
- 111.** Smyly, D.S., Woodward, B.B., Conrad, E.C., Determination of saccharin, sodium benzoate, and caffeine in beverages by reverse phase high-pressure liquid chromatography, *J Assoc. Off Anal Chem.*, **1976**, 59, 14–9.
- 112.** Yong-gang, L., Zhao-xu, L., Jun-ping, Z., Yan-hui, Z., Feng, G., Determination Method of Benzoic Acid, Sorbic Acid and Saccharin Sodium Content in Milk and Dairy Produce, *Food Science*, **2007**, 06

113. Kreuz, D.M., Howard, A.L., Ip, D., Determination of indinavir, potassium sorbate, methylparaben, and propylparaben in aqueous pediatric suspensions, *J Pharm Biomed Anal.*, **1999**, *19*, 725–735
114. Sun, Y., Shekunov, B.Y., York, P., Refractive index of supercritical CO₂-ethanol solvents, *Chem. Eng. Commun.*, **2003**, *190*, 1–14
115. Tang, H., Gulari, E., Rothe, E.W., Large mirage effect in supercritical CO₂, *J. Supercrit. Fluids*, **2000**, *18*, 193
116. Jain, J.P., Rothe, E.W., Superior mirage effect in supercritical CO₂: Experiment and model, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, *35*, 280
117. Vollmer, M., Becker, M., Agilent 1260 Infinity Hybrid SFC/UHPLC System, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5990-9514EN, **2012**
118. Euerby, M., Fever, M., James, M., Pipe, C., Schad, G., Bayly, K., Exploration of Chromatograph Selectivity difference between SFC and reversed phased UHPLC using the Agilent 1290 Infinity Hybrid SFC/UHPLC-DAD/MS, poster presented at SFC 2012 (available online)
119. Nizery, D., Thiebaut, D., Caude, M., Rosset, R., Improved Evaporative Light-Scattering Detection for Supercritical Fluid Chromatography with Carbon Dioxide-Methanol Mobile Phases, *J. Chromatogr.*, **1989**, *487*, 49–80
120. LaFosse, M., Herbreteau, B., Carbohydrate Analysis by LC and SFC using Evaporative Light Scattering Detection, *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis*, Ziad El Rassi (Editor), Elsevier Science B.V., Journal of Chromatography Library, **2002**, *Vol. 88*, Chapter 30
121. Rambla-Alegre, M., Dunkle, M.N., David, F., Sandra, P., Vollmer, M., Coupling the Agilent 1290 Infinity Analytical SFC System to an Agilent 1290 Infinity Evaporative Light Scattering Detector, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-0988EN, **2012**

更多信息

www.agilent.com.cn

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

安捷伦客户服务中心:

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/chem/sfc

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2015

2015 年 7 月 1 日, 中国印制

5991-5509CHCN



Agilent Technologies