

在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱

在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统中对 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行性能评估

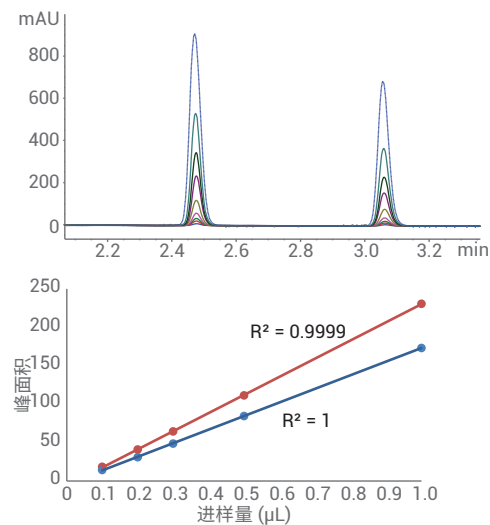
技术概述

作者

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

摘要

本技术概述展示了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理。在 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 中，在大气压条件下抽取样品，加压至系统压力，并通过超快速注射过程进样。数据表明，1260 Infinity II SFC Multisampler 能够在极高的精度下以灵活的样品体积进样，并在宽体积范围内具有优异的线性。



Agilent Technologies

前言

与经典 HPLC 仪器的可变样品引入（其中填充有流动相的进样流路可以不受影响地处于大气压下）相比，SFC 仪器必须避免在进样流路中使用环境压力下的流动相，以防止致密的 CO₂ 蒸发。进样流路中 CO₂ 的蒸发可能导致样品完全损失或进样不完全。因此，在 SFC 中首选固定定量环方法，该方法将之前填充的定量环切换至加压的 CO₂ 流中。虽然这种方法使满环进样获得了良好的峰面积精密度，但是它需要过量填充定量环，因此会浪费样品。当用于部分环填充时，需要复杂的操作，并且会牺牲精度性能。

本技术概述展示了 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的进样原理。1260 Infinity II SFC Multisampler 相比于广泛使用的固定定量环方法（其中过量填充定量环导致样品浪费，而部分定量环进样导致进样精度不佳），能够在极高的精度下以灵活的样品体积进样。在 1260 Infinity II SFC Multisampler 中，在大气压条件下抽取样品，加压至系统压力，然后通过超快速注射过程进样至分析流路中。

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity II SFC 系统，包括：

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II DAD (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)

仪器设置

1260 Infinity II SFC Multisampler 直接连接至 SFC 泵和下游色谱柱。通过工厂安装的管路完成所有必要的冲洗和清洗步骤。只需连接两种溶剂：一种溶剂用于冲洗和注入过程，另一种用于进样针清洗。

色谱柱

Agilent ZORBAX Rx-Sil,
4.6 × 150 mm, 5 μm

软件

Agilent OpenLAB CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.07 SR3

样品

咖啡因和可可碱溶液（各自浓度均为 250 mg/L 的甲醇溶液），咖啡因溶液（0.5 g/100 mL 的甲醇溶液）以及可可碱溶液（250 mg/L 的甲醇溶液）。

化学品

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

结果与讨论

固定定量环方法作为最先进的技术被用于 SFC 仪器的进样。该方法能够在高精度下以固定体积进样，但是通过部分环填充进样的体积存在精度不佳的问题。无法使用在 HPLC 仪器进样中广泛应用的可变定量环概念，因为液态 CO₂ 不能处于大气压下。否则将由于蒸发而导致样品部分或完全损失。为克服这一缺点，在用于 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统的 1260 Infinity II SFC Multisampler 中推出了灵活的进样原理。

安捷伦的注入进样技术可提供加压样品，该样品通过注射过程在色谱柱之前被注入 CO₂ 流中。在抽取样品前，通过注入溶剂冲洗，对连接的定量环、针头和针座进行清洗，同时将 SFC 泵连接至色谱柱。在抽取灵活的样品体积后，在定量环中将样品加压至系统压力。包含样品的加压定量环连接至来自分析型 SFC 泵并流向色谱柱的 CO₂ 流。在该位置处，可通过注射过程以可变的进样速度（注入速度）对样品进样。为了将全部样品冲洗出定量环，可指定过量填充体积（灌洗体积）。

SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO ₂
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
等度洗脱	12% B
停止时间	6 分钟
梯度洗脱	4 分钟内 B 从 5% 升至 35%
停止时间	6 分钟
后运行时间	2 分钟
大体积进样的梯度	0–1 min 时 B 为 1% 1.1 min 时 B 为 5% 4 min 时 B 为 35%
停止时间	6 分钟
后运行时间	2 分钟
反压调节器 (BPR) 温度	60 °C
BPR 压力	130 bar
柱温	40 °C
进样量	0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 和 10.0 µL
大体积进样	10、20、30、40、50、60、70 和 80 µL
注入溶剂	甲醇
灌洗体积	4 µL
注入速度	400 µL/min（最高进样量 10 µL），100 µL/min（用于 10 µL 以上的大体积进样）
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
检测	272 nm/带宽 4 nm；参比 360 nm/带宽 100 nm；标准高压 SFC 流通池；数据采集速率 10 Hz

由两个仪器参数控制进样：注入速度和灌洗体积。对于标准进样 (0.1–10 μL)，注入速度通常应高于 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ (默认 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，最高达 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$) 以避免峰展宽。可能使用较低的注入速度，将进样捕集到初始等度步骤中。由于可能发生样品损失，因此灌洗体积不应低于 2 μL (默认 4 μL)。可使用较高的值以冲洗出粘性化合物或包含复杂基质的样品。这些参数对色谱性能的影响在另一篇安捷伦技术概述中有更详细的讨论¹。

为确定 1260 Infinity II SFC Multisampler 的性能，在 0.1 μL 至 10.0 μL 的进样量范围内，在等度和梯度洗脱条件下对进样线性和峰面积精密度进行测定 (图 1、2 和 3)。在两组实验中，采用默认的灌洗体积和注入速度 (参见方法)。这样可确保样品快速进样至 CO_2 流中，并保证样品从进样定量环中完全冲洗出来。在等度条件下，两种化合物得到完全分离，并且在 0.1–10.0 μL 的所有进样量下均获得了优异的峰形 (图 1A)。计算不同进样

量范围内的进样线性：0.1–10.0 μL 、0.1–1.0 μL 和 1.0–10.0 μL 。在所有情况下，均获得了优异的进样线性，所分析的两种化合物的 $R^2 > 0.9995$ (图 1B 至 1D)。梯度分离的结果也表明，在 0.1 μL 至最高达 10.0 μL 的所有测试的进样量下均获得了优异的峰形 (图 2A)。在 0.1–10.0 μL 、0.1–1.0 μL 和 1.0–10.0 μL 的所有测试的进样量范围内，两种化合物的进样线性均非常优异， $R^2 > 0.9999$ (图 2B 至 2D)。

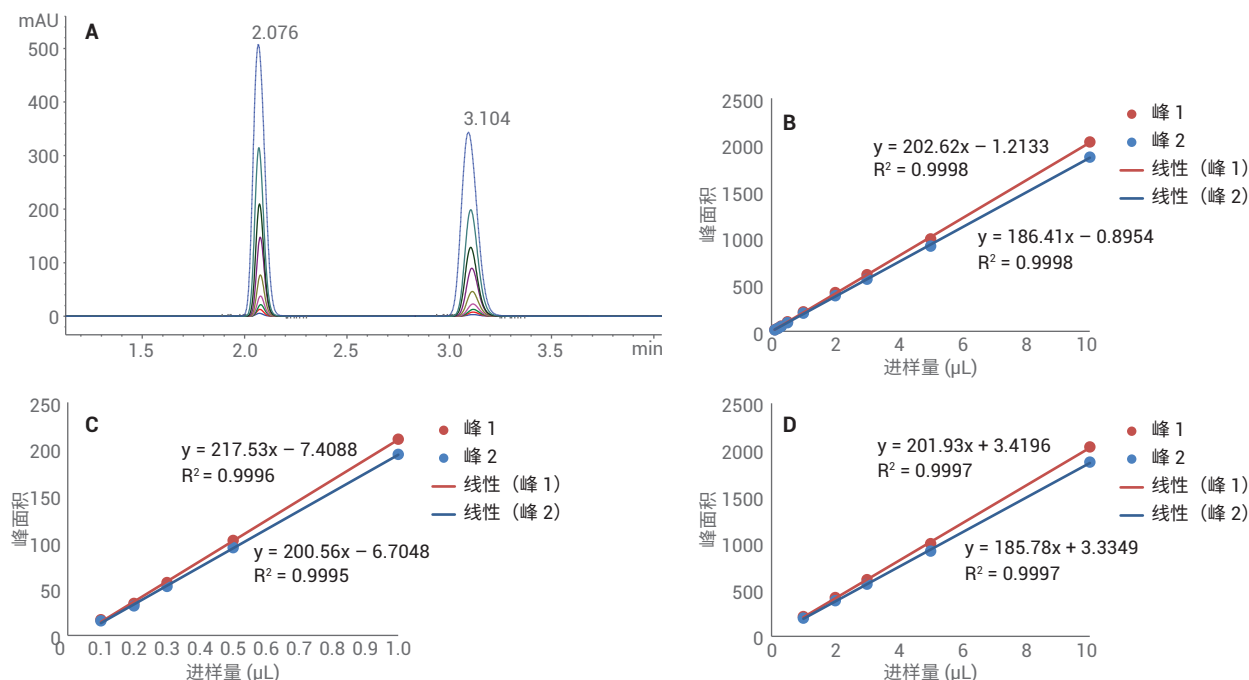


图 1. 在等度洗脱条件下得到的峰 1 和峰 2 的进样线性。A) 等度分离色谱图。峰 1：咖啡因，2.076 分钟。峰 2：可可碱，3.104 分钟。进样量：0.1–10.0 μL 。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的线性。C) 0.1–1.0 μL 进样量范围内的线性。D) 1.0–10 μL 进样量范围内的线性。 R^2 通常高于 0.9995

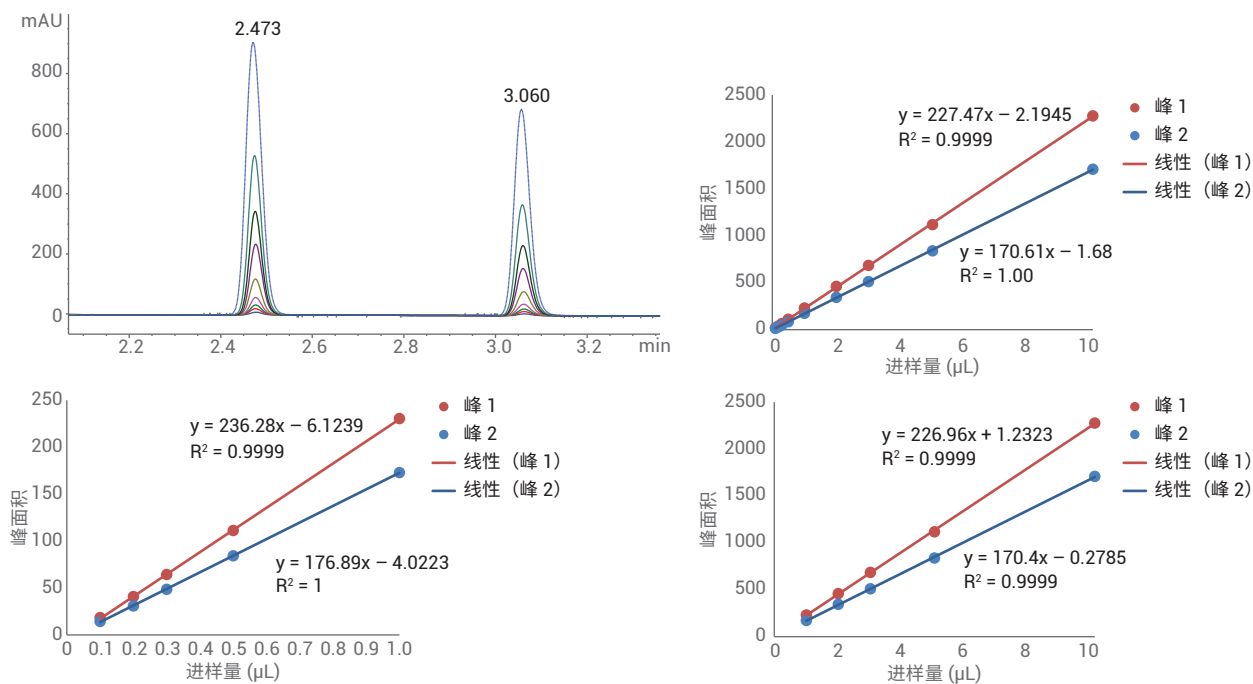


图 2. 在梯度洗脱条件下得到的峰 1 和峰 2 的进样线性。A) 梯度分离色谱图。峰 1：咖啡因，2.473 分钟。峰 2：可可碱，3.060 分钟。进样量 0.1–10.0 μL。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的线性。C) 0.1–1.0 μL 进样量范围内的线性。D) 1.0–10 μL 进样量范围内的线性。R² 通常高于 0.9999

在等度和梯度实验中，通过 10 次重复测定的结果来计算所有进样量下的峰面积 RSD 值（图 3）。对于两种化合物，等度分离的峰面积 RSD 从最低进样量 (0.1 μL) 的 3.0%–3.5% 开始（图 3A），而梯度分离的峰面积 RSD 从最低进样量 (0.1 μL) 的 2.0%–2.5% 开始（图 3B）。在两种情况下，当进样量增加至高于 0.5 μL 后，RSD 值均降至 0.3% 及更低。对于所有更高的进样量（最长达 10.0 μL），RSD 值保持在 0.3% 以下。

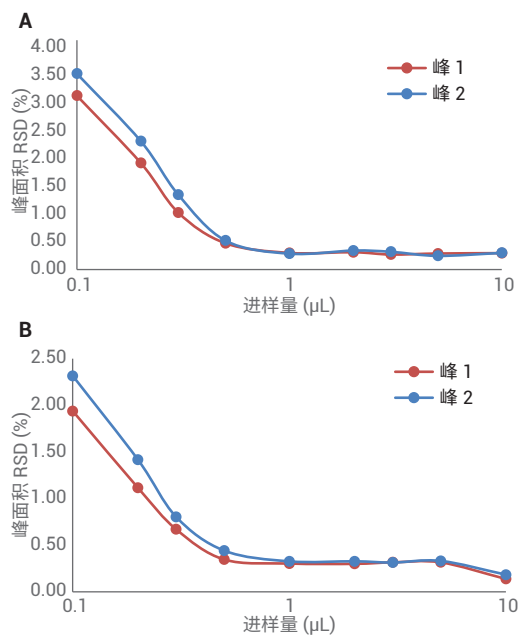


图 3. 在 A) 等度和 B) 梯度分离条件下，采用 0.1–10 μL 的进样量得到的峰 1 和峰 2 的峰面积 RSD

在最高达 10 μL 的进样范围之外，SFC Multisampler 还能支持更大的进样量。为此，它安装有 100 μL 样品定量环。从 100 μL 定量环体积中减去所使用的灌洗体积，即可计算出可进样的样品体积。为证明这一能力，将可可碱溶液（250 mg/L 的甲醇溶液）的进样量从 10 μL 提高至 80 μL 。将大体积甲醇溶液样品（它是一种

强洗脱溶剂）缓慢进样至 CO_2 流中（100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ）。完成注入过程后，将改性剂浓度从 1% 快速提高至 5%，并启动洗脱梯度。可可碱的峰高和峰宽随进样量的增加而增加（图 4）。采用较高的进样量时，峰高未大幅增加，但是随着峰宽的增加，峰面积呈线性增加（参见图 4 中的表格）。进样量与峰面积之间表现出优异的线性相关

性，相关系数高达 0.9999（图 4B）。半峰高处的峰宽从 10 μL 进样量下的 0.04 分钟增加至 80 μL 进样量下同样可接受的 0.1 分钟，表明在所有进样量下均获得了对称的峰形（参见图 4 中的表格）。根据所有进样量下的峰面积计算相对标准偏差，得到了优异的峰面积 RSD，其值通常为 0.3% 或更低（图 4C）。

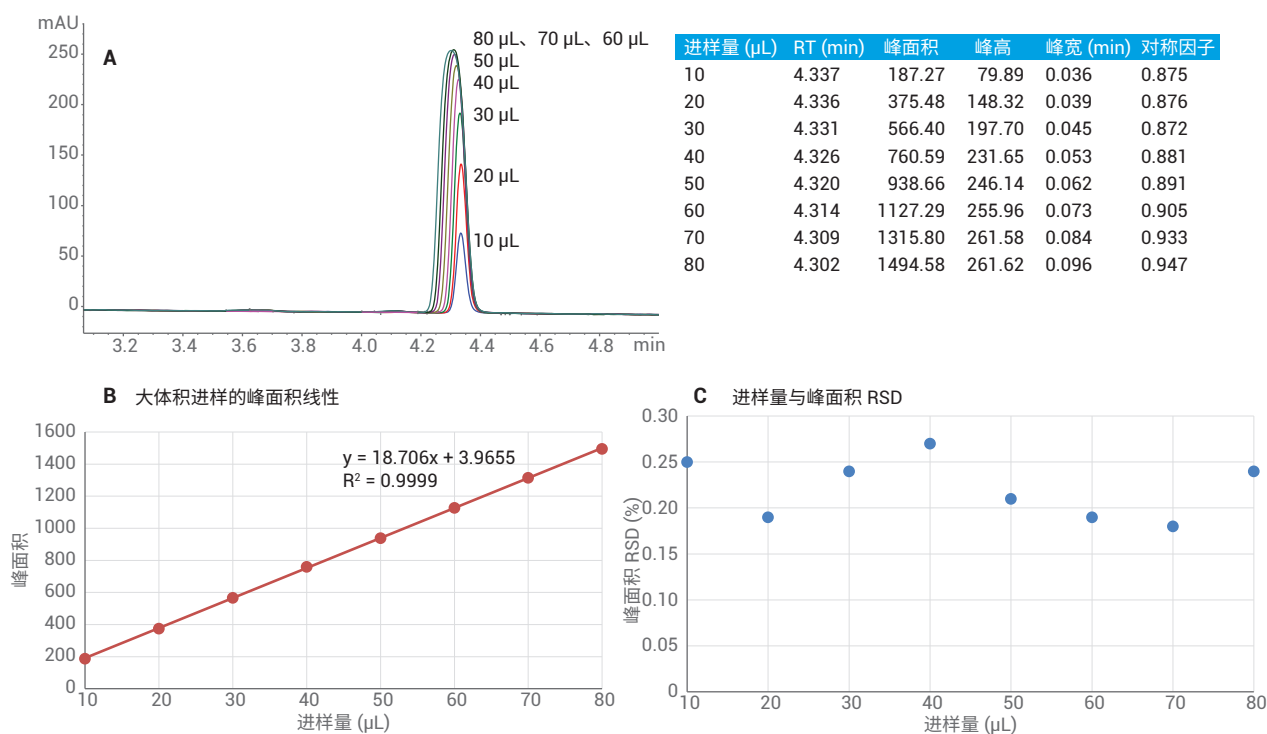


图 4. 大体积进样结果

- A) 在进样量为 10–80 μL 的条件下获得的样品的叠加色谱图
 - B) 采用大体积进样获得的峰面积线性， $R^2 = 0.9999$
 - C) 在每种大体积进样量下，由 10 次重复进样的结果计算出的峰面积 RSD (%)
- 表) 在大体积进样条件下测得的所有参数汇总

最后，考察了进样分析高浓度咖啡因样品（5 g/L 的甲醇溶液，进样量 5 μ L）所引起的 1260 Infinity II SFC Multisampler 的交叉污染行为。通过高浓度咖啡因样品进样后的首次空白进样来测定交叉污染。按照与高浓度咖啡因的峰面积相比的峰面积百分比计算得出的交叉污染为 0.0014%（14 ppm）。在高浓度咖啡因样品进样后的第二次空白进样中未检测到交叉污染（图 5）。

结论

本技术概述讨论了在极高精度下具有灵活进样量的 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的性能结果。在进样量 0.5 μ L 和 10 μ L 之间获得的峰面积 RSD 通常低于 0.3%。即使采用更低的进样量（低至 0.1 μ L），也获得了通常低于 2.5% 的峰面积 RSD。结果证明，进样线性通常优于 0.9995。即使对于高达 80 μ L 的进样量，也可获得低于 0.3% 的优异的峰面积 RSD 值。采用大体积进样所获得的峰面积线性也极其出色。灵活的样品引入仅表现出 14 ppm 的可忽略不计的交叉污染。这一性能与通常使用的满环模式下的固定定量环自动进样器的性能相当，但是具有可变量环自动进样器的高灵活性。

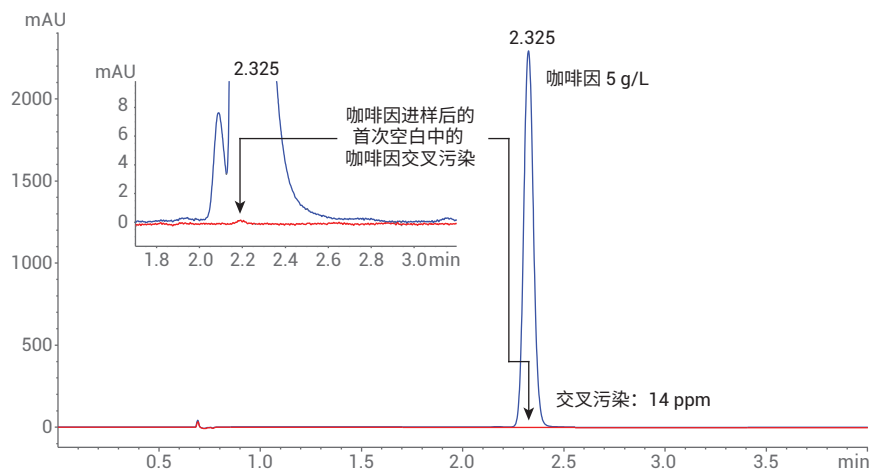


图 5. 通过进样高浓度咖啡因样品（5 g/L 的甲醇溶液，进样量 5 μ L）测定 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 的交叉污染。通过高浓度咖啡因样品进样后的首次空白进样来测定交叉污染。在高浓度咖啡因样品进样后的第二次空白进样中未检测到交叉污染。由于咖啡因的进样量达到检测器的非线性范围，因此通过从小体积进样的结果外推来计算 5 μ L 进样量下正确的峰面积

参考文献

1. Naegele, E. 注入速度和灌注体积 — SFC 的新进样参数, 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-7626ZHCN, 2017

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2017
2017 年 10 月 15 日, 中国出版
5991-7623ZHCN



Agilent Technologies