



# 使用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统进行 正交色谱分离

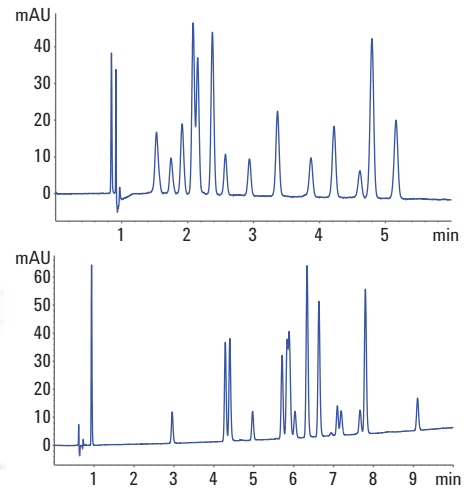
## 技术概述

### 作者

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

### 摘要

本技术概述详细介绍了如何设置带有或不带质谱系统的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。文中将展示性能数据并讨论两种操作模式。作为应用示例，将展示 SFC 模式和 UHPLC 模式下的农药混合物分离，并将讨论分离的正交性。



**Agilent Technologies**

## 前言

对给定的复杂样品同时进行基于 SFC 的分离和基于 UHPLC 的分离，将能获得有关样品成分的互补信息。这两种分离技术采用不同的分离机制（基于分析物在完全不同的流体介质和固定相中的相互作用），是真正意义上的正交技术。反相分离通常使用疏水性固定相和有机-水性液相，而 SFC 通常使用与正相分离类似的极性固定相和 CO<sub>2</sub>/有机液相。

为避免单独购买 SFC 和 UHPLC 仪器的负担，Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在一台仪器中同时提供了 SFC 和 UHPLC 功能。这两种技术共享自动进样器、柱温箱和检测器等常见的模块化部件。此类仪器的设置非常简单，只需通过一个阀即可在两种技术之间进行切换。这使得 SFC 和 UHPLC 均具有高可靠性和稳定性。此外，可添加质谱系统以改善所采集的数据的质量。SFC 模式中，该质谱系统在分流条件下与辅助泵配合使用，而在 UHPLC 模式中则采用全流条件。

本技术概述通过展示保留时间、峰面积精度和线性数据，证明了 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统在 SFC 和 LC 模式下的性能。作为两种技术正交性的示例，将展示并讨论在 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统上利用两种分离技术进行的复杂农药混合物的分离。

## 实验部分

### 用于农药分离的 SFC 方法

参数	值
溶剂 A	CO <sub>2</sub>
改性剂 B	甲醇
SFC 流速	2.5 mL/min
梯度	6 分钟内 B 从 5% 升至 25% 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	140 bar
柱温	40 °C
进样量	1.0 µL
注入溶剂	甲醇
灌注体积	4 µL
注入速度	400 µL/min
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
DAD	254 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	20 Hz

### 用于农药分离的 LC 方法

参数	值
溶剂 A	水 + 0.1% 甲酸
溶剂 B	乙腈 + 0.1% 甲酸
流速	2.5 mL/min
梯度	6 分钟内 B 从 15% 升至 70% 停止时间：6 分钟 后运行时间：3 分钟
柱温	40 °C
进样量	1.0 µL
进样针清洗	使用甲醇清洗 3 s
DAD	254 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	20 Hz

## 仪器

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

- Agilent 1260 Infinity II SFC 控制模块 (G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC 二元泵 (G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler (G4767A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)，配备高压 SFC 流通池
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (MCT) (G7116A)，配备 Agilent InfinityLab Quick Change 快速更换 4 位/10 通四色谱柱选择阀 (部件号 5067-4287)
- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 2 位/10 通阀 (G4232B)
- Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B) 和 SFC/MS 分流器套装 (G4309-68715)
- 采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6150 单四极杆液质联用系统

## 仪器设置

为了将 SFC 系统转换为 SFC/UHPLC 混合型系统，添加了一台四元或二元 UHPLC 泵并通过 2 位/10 通阀连接，能够在 SFC 和 LC 模式之间直接切换 (图 1 和 2)。大容量柱温箱 (MCT) 配备用于色谱柱切换的 4 位/10 通四色谱柱选择阀，例如从典型的 SFC 色

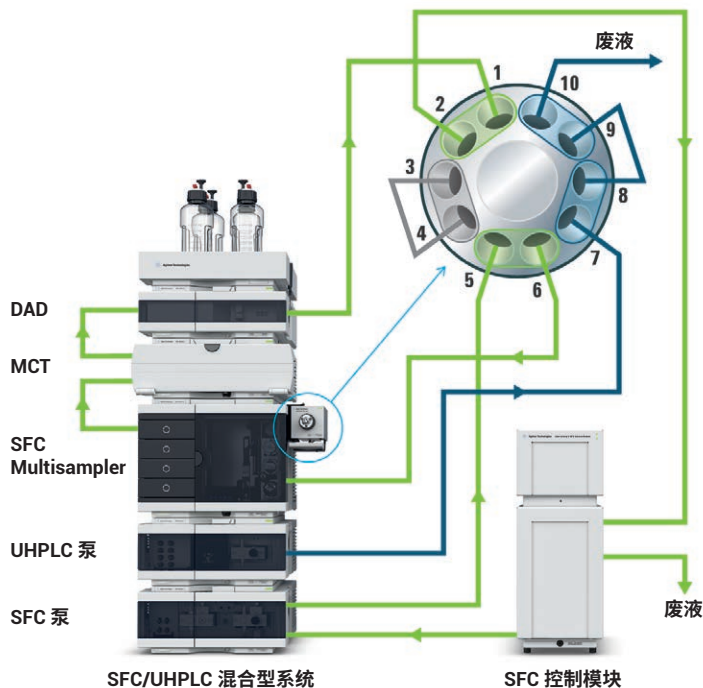


图 1. 处于 SFC 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。SFC 控制模块连接至 SFC 泵和共享模块 (绿色管线)。UHPLC 泵连接至废液位置 (蓝色管线)

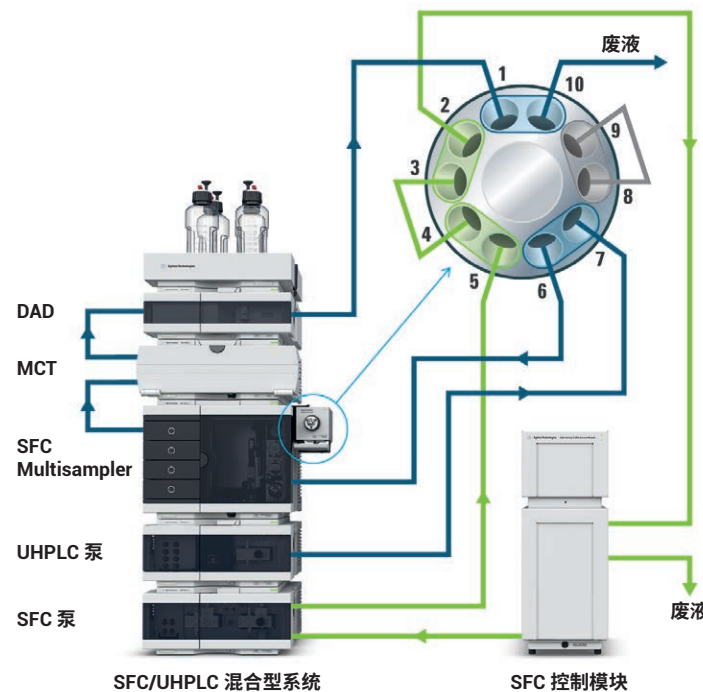


图 2. 处于 UHPLC 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统。UHPLC 泵连接至共享模块 (蓝色管线)。SFC 泵直接连接至环路 (绿色管线) 中的 SFC 控制模块

谱柱切换为典型的分析型 UHPLC 色谱柱（在图 1 和 2 中未示出）。图 1 和 2 中圈出的是 2 位/10 通阀处的管路。图 1 所示的阀位置将 SFC 泵和 SFC 控制模块连接至仪器的共享模块。在流过自动进样器、容纳 SFC 色谱柱的柱温箱以及检测器后，CO<sub>2</sub> 流重新连接至用于反压调节的 SFC 控制模块。在此位置处，四元 UHPLC 泵连接至废液。

将 2 位/10 通阀切换至 UHPLC 位置后，四元泵将连接至共享模块（图 2）。为维持反压，将 SFC 泵直接连接至 SFC 控制模块。

SFC/UHPLC 混合型仪器与质谱仪的额外连接不会增加复杂性。只需在 2 位/10 通阀处对管路进行重新连接，将 SFC 辅助泵接入系统中并使液流能分流至 MS，同时使 UHPLC 的液流能全部进入 MS 即可（图 3 和 4）。在此情况下，在 SFC 模式中，CO<sub>2</sub> 流连接至第一个分流器，以便在通过共享模块后引入补偿流。第二个分流器在 SFC 控制模块的反压调节器和 MS 之间进行液流分流（图 3）。在 UHPLC 模式中，四元泵连接至共享模块，并直接连接至 MS 以实现全流运行（图 4）。为了在 UHPLC 模式中使用分流方法，端口 1-2 处的桥接毛细管可替换为分流器并用于 UHPLC 模式中。

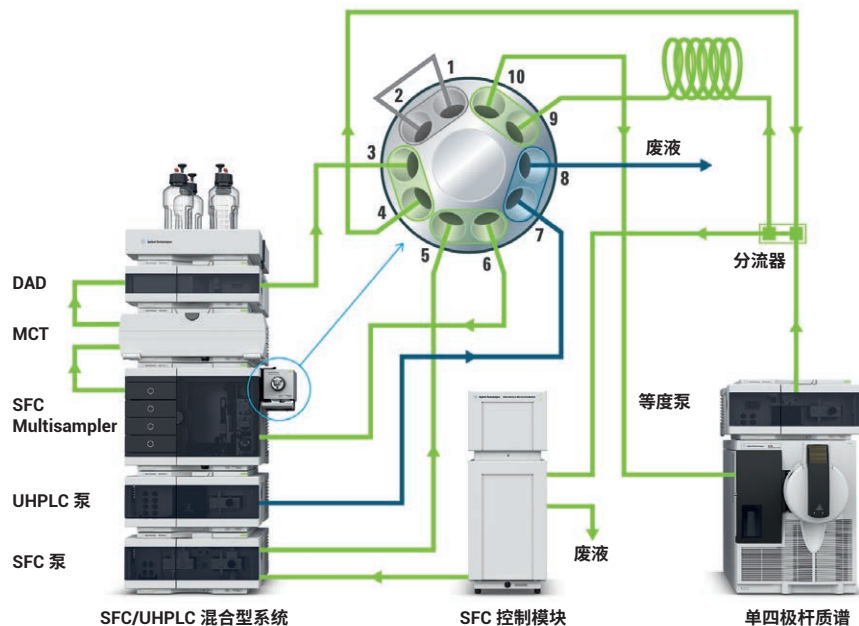


图 3. 处于 SFC/MS 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC/MS 混合型系统。SFC 控制模块连接至 SFC 泵和共享模块（绿色管线）。UHPLC 泵连接至废液位置（蓝色管线）。CO<sub>2</sub> 流连接至第一个分流器，以便在通过共享模块后引入补偿流。第二个分流器在 SFC 控制模块的反压调节器和 MS 之间进行液流分流（绿色毛细管盘管：50 μm，100 cm，产生限制以防止减压）

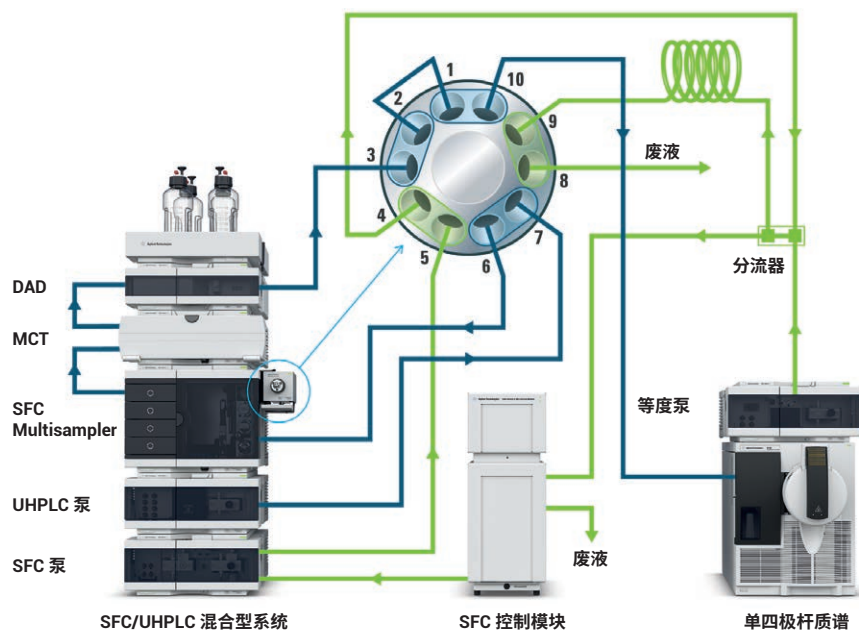


图 4. 处于 UHPLC/MS 模式下的 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC/MS 混合型系统。UHPLC 泵连接至共享模块（蓝色管线）并直接流至 MS。SFC 泵直接连接至环路（绿色管线）中的 SFC 控制模块，该环路中包括分流器（绿色毛细管盘管：50 μm，100 cm，产生限制以防止减压）

## 色谱柱

- **SFC 模式:**  
Agilent ZORBAX RX-SIL,  
4.6 × 150 mm, 5 μm  
(部件号 883975-901)
- **SFC 模式:**  
Agilent ZORBAX NH<sub>2</sub>,  
4.6 × 150 mm, 5 μm  
(部件号 883952-708)
- **LC 模式:**  
Agilent ZORBAX SB C18,  
4.6 × 150 mm, 3.5 μm  
(部件号 883975-902)

## 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

- 咖啡因溶液 (0.5 g/100 mL 的甲醇溶液)
- SFC 校验混标 (茶碱、咖啡因、胸腺嘧啶、可可碱; 溶于甲醇中, 各自浓度为 250 mg/L)
- 农药溶液, 1 mg/mL (甲醇溶液), 具有同等体积的混合物 (表 1)

## 化学品

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

## 质谱条件

参数	值
采用安捷伦喷射流离子源进行电喷雾电离	
电离模式	正离子
毛细管电压	2500 V
喷嘴电压	2000 V
气体流速	8 L/min
气体温度	220 °C
鞘气流速	12 L/min
鞘气温度	380 °C
雾化器压力	35 psi
补偿流流速	0.3 mL/min, 甲醇 + 3% 水 + 0.1% 甲酸
单四极杆的 MS 参数	
ESI 极性	正离子
扫描	180–450 m/z
驻留时间	200 ms
碎裂电压	70 V
增益	1.0

表 1. 复杂测试样品中的 15 种农药, 用于证明 SFC 模式和 UHPLC 模式的正交分离性能。各化合物的保留时间表明, 化合物在所用条件下发生了漂移。使用单四极杆 MS 完成各个化合物的鉴定 (参见实验部分以及图 3 和图 4)

编号	名称	化学式	m/z [M+H] <sup>+</sup>	SFC RT (min)	LC RT (min)
1	扑草净	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S	242.10	1.528	5.880
2	另丁津	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	230.11	1.748	7.190
3	特丁津	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	230.11	1.917	7.664
4	莠去津	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>	216.10	2.084	6.035
5	溴谷隆	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	259.00	2.153	6.632
6	噻唑隆	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> OS	222.06	2.153	5.710
7	利谷隆	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	249.02	2.375	7.798
8	脱乙基特丁津	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	202.08	2.572	4.971
9	脱乙基莠去津	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub>	188.06	2.939	2.954
10	环嗪酮	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	253.16	3.362	4.400
11	尼莫地平	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	419.18	3.870	9.107
12	绿麦隆	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	213.08	4.220	5.838
13	硝苯地平	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	347.10	4.613	7.095
14	敌草隆	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	233.02	4.795	6.333
15	甲氧隆	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	229.07	5.161	4.286

## 结果与讨论

在 SFC/UHPLC 混合型系统中，两种分离原理通过专用模块和共享模块得以组合。对于该系统的概念验证，仪器在两种模式下都必须具有优异的性能并且与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器具有相同的性能水平。为证明这一性能，测定了峰面积和保留时间的相对标准偏差以及进样线性。

### SFC 模式下的性能

在测定峰面积 RSD、保留时间 RSD 和进样线性数据时，SFC/UHPLC 仪器根据图 1 所示的配置和阀位置在 SFC 模式下运行。将实验部分所述的咖啡因样品作为测试标样，使用 Agilent ZORBAX Rx-SIL 色谱柱进行色谱分析，采用甲醇作为 CO<sub>2</sub> 的改性剂并使用等度条件（12% 甲醇，其他相关条件请参见实验部分的方法参数）。为评估分析范围，所用的进样量为 0.1–10 μL (n = 10)。进样量为 0.1 μL 时，计算得出的峰面积 RSD 约为 1.2%；进样量高于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 降低至 0.3% 以下，进样量高达 10 μL 时，峰面积 RSD 保持在 0.2% 左右（图 5A）。在整个进样量范围内得到的峰面积表现出优异的线性，R<sup>2</sup> = 0.9999（图 5B）。计算得出的平均保留时间 RSD 值为 0.08%。这些值与通过 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统测得的相应值一致<sup>1</sup>。利用 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行的注入进样（已引入此系统）能够实现灵活的进样量。为优化注入进样过程，引入了两个新的进样参数：注入速度和灌洗体积<sup>2</sup>。通过 SFC

Multisampler，能够实现超过 10 μL 且最高大于 90 μL（100 μL 减去灌洗体积）的大体积进样，同时可保持同样出色的性能<sup>1</sup>。

### UHPLC 模式下的性能

为通过实验测定 UHPLC 条件下的峰面积 RSD、保留时间 RSD 和进样线性，采用图 2 中所示的设置和阀位

置。在 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱上采用等度条件（14% 乙腈，有关其他条件，请参见实验部分的方法参数）对咖啡因样品（与 SFC 条件下使用的样品相同）进行色谱分析。不同的是，将 1260 Infinity II SFC Multisampler 切换至 UHPLC 模式，将注入进样模式切换为标准流通式进样模式。

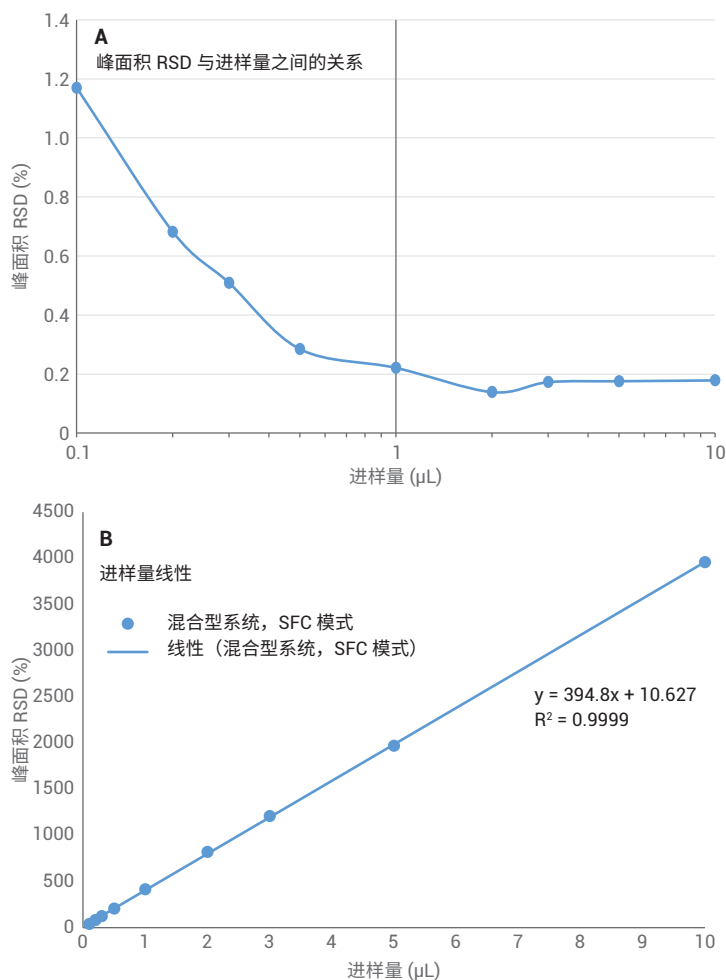


图 5. SFC 模式下的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量 (0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5 和 10 μL) 之间的关系。进样量大于 0.5 μL 时，峰面积 RSD 通常低于 0.3%。B) 0.1–10 μL 进样量范围内的峰面积线性，R<sup>2</sup> = 0.9999

在进样量为 0.1–10  $\mu\text{L}$  的分析范围内得到的结果表明，在高于 0.5  $\mu\text{L}$  的所有进样量下得到的 RSD 为 0.2% 或更低（图 6A）。该范围内的进样量线性通常为  $R^2 > 0.9999$ （图 6B）。为评估 UHPLC 条件下大体积进样的影响，用水按 1:10 的比例稀释咖啡因样品，并在 10–100  $\mu\text{L}$  的进样量范围内进样。测得的峰面积 RSD 通常低于 0.12%，并且进样量线性优于  $R^2 > 0.9999$ （图 7）。分析范围内所有进样的平均保留时间 RSD 值通常为 0.08%，并且在进样量范围内该值保持不变。这些结果与之前通过单独的 UHPLC 系统得到的结果一致<sup>3</sup>。

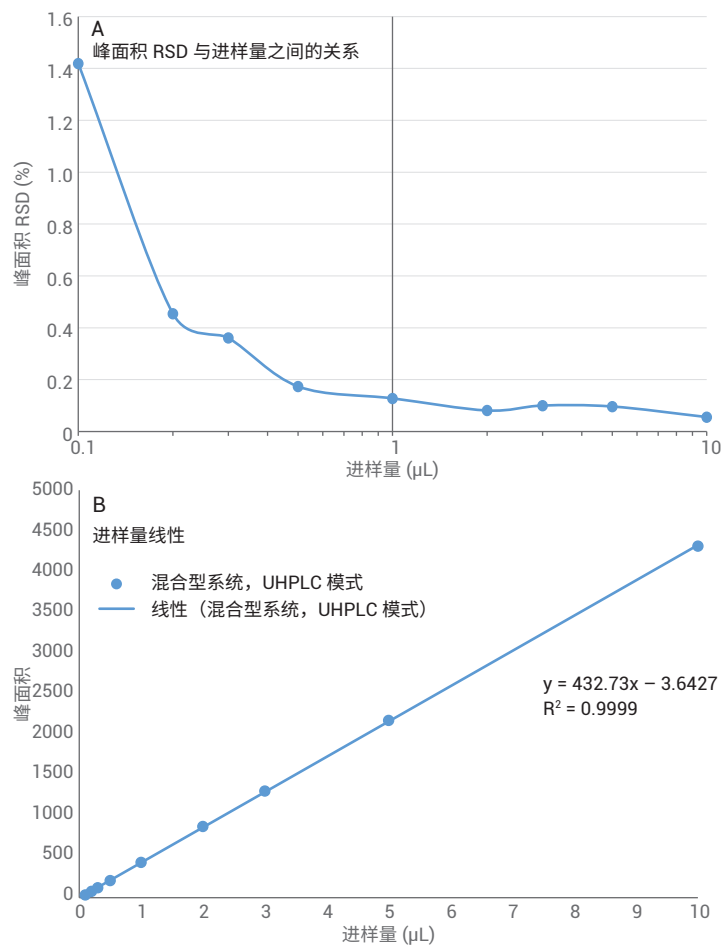


图 6. UHPLC 模式下的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量 (0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、2.0、3.0、5 和 10  $\mu\text{L}$ ) 之间的关系。进样量大于 0.5  $\mu\text{L}$  时，峰面积 RSD 通常低于 0.2%。B) 0.1–10  $\mu\text{L}$  进样量范围内的峰面积线性， $R^2 = 0.9999$

## SFC 和 UHPLC 模式的快速切换

SFC/UHPLC 混合型系统具有能在两种模式下运行样品的优势，并通过单独的 SFC 和 UHPLC 方法来实现，该系统包括通过 2 位/10 通阀切换 SFC 控制模块、1260 Infinity II SFC Multisampler、泵和完整液流的所有必要配置，如图 1 和 2 所示。

在 UHPLC 和 SFC 的切换过程中因结冰引起的系统堵塞这一典型问题是使用反相 HPLC 后残留的水栓引起的。由 UHPLC 切换为 SFC 之前，可使用有机溶剂（如甲醇）冲洗仪器来避免这一问题。对于 1260 Infinity II SFC Multisampler，如果方法设置中的模式从 UHPLC 更改为 SFC，则这一过程可通过特殊的自动冲洗程序自动完成。这样省去了单独的冲洗方法，并清除了共用的 Multisampler 中的水性溶剂，该溶剂可能是最大系统死体积（即 100  $\mu\text{L}$  流通式样品定量环）中的残留物。建议在两种模式下均使用单独的专用色谱柱。根据所选的 SFC 方法或 UHPLC 方法，通过位于 MCT 中的色谱柱选择阀来切换色谱柱。为证明 SFC 和 UHPLC 之间的切换效果，在一个序列内设置重复运行 SFC 和 UHPLC（图 8）。整个序列在运行过程中没有任何问题，并获得了具有高重现性的峰面积和保留时间，如图 8 所示。

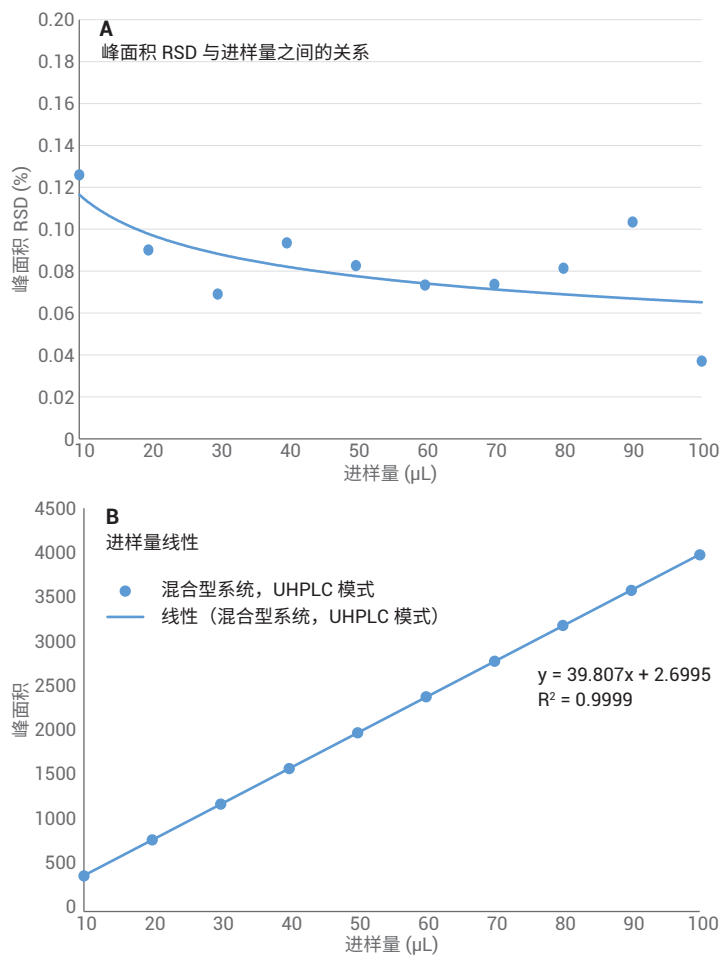


图 7. 在 UHPLC 模式下进行大体积进样的性能。A) 峰面积 RSD 与进样量 (10–100  $\mu\text{L}$ , 以 10  $\mu\text{L}$  递增) 之间的关系。峰面积 RSD 通常低于 0.12%。B) 10–100  $\mu\text{L}$  进样量范围内的峰面积线性,  $R^2 = 0.9999$

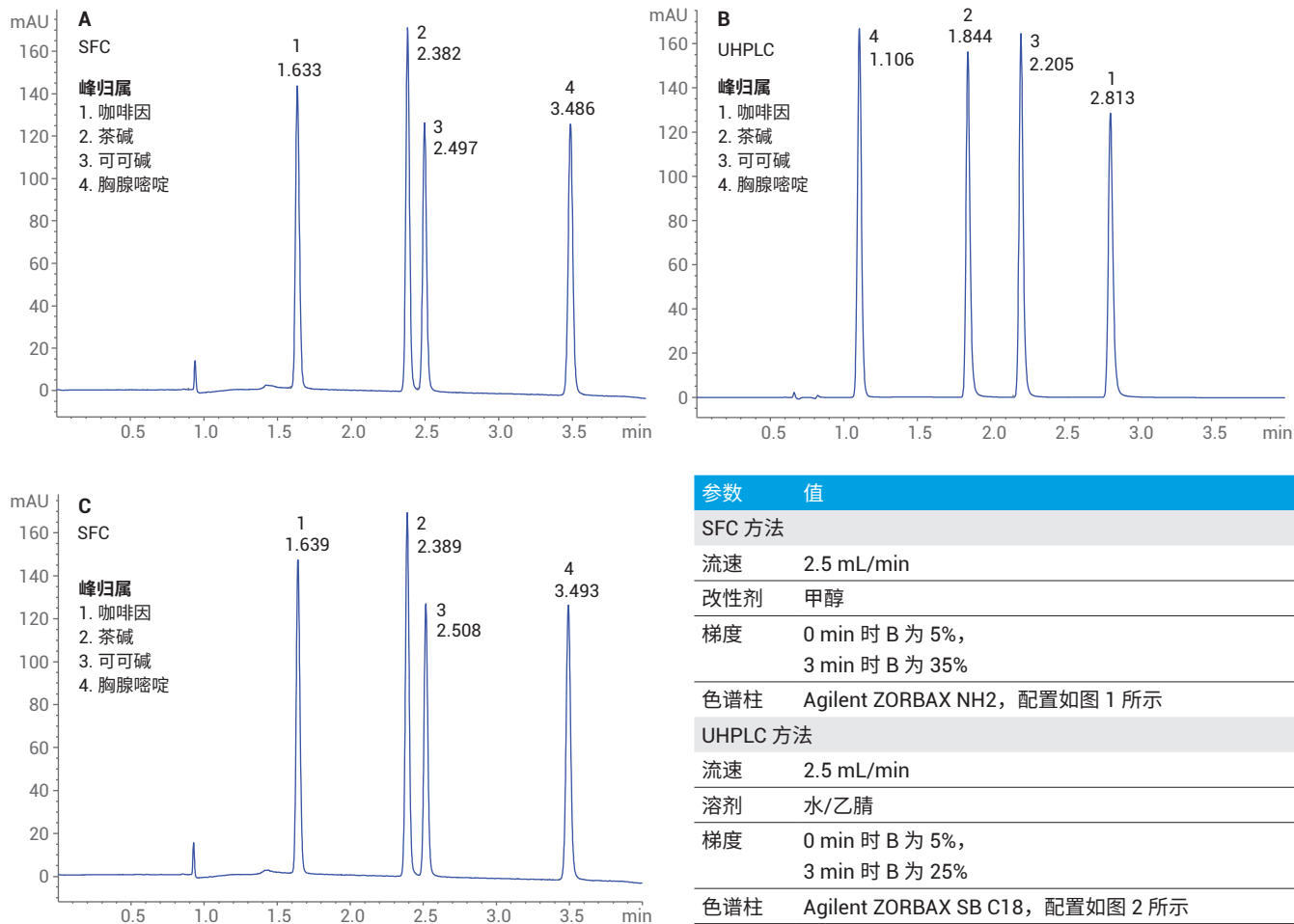


图 8. 在 SFC/UHPLC 混合型系统上进行多次 SFC 和 UHPLC 运行的序列。该序列从重复的 SFC 运行开始 (A)，然后将方法切换为所述的 UHPLC 方法设置，继续执行重复的 UHPLC 运行 (B)。最后，在序列结束时切换回 SFC 模式方法，完成多次 SFC 运行 (C)。为平衡各自的色谱柱，在序列中每个 SFC 模式或 UHPLC 模式开始时执行空白运行。其他参数与实验部分中列出的方法相同。利用 4 位/10 通四色谱柱选择阀在不同方法中切换色谱柱。根据 SFC 或 UHPLC 方法选择 SFC 控制模块模式和 Multisampler 模式的配置

### SFC 和 UHPLC 模式的正交分离

在一套混合型系统中组合使用 SFC 和 UHPLC 的优势之一，是能够使用一套系统以经济有效的方式利用正交分离技术测量给定的样品。由于采用了正交分离技术，能够分离出那些在使用单一色谱分离技术时由于共洗脱而被隐藏的化合物。作为示例，在 SFC 和 UHPLC 条件下对包含 15 种农药（表 1）的复杂样品进行测定。在 SFC

条件下，使用氨基相并以甲醇作为改性剂完成测定；在 UHPLC 模式中，在 C18 固定相和水/乙腈的反相条件下完成测定（图 9 和图 10）。在 SFC 条件下，化合物能够在 6 分钟的运行中得到分离（图 9）。在所选的分离条件下，化合物 5 和 6 发生完全共洗脱，并且还和化合物 4 发生部分共洗脱。所有其他化合物均实现了基线分离。在反相条件下对同一样品进行

分离，结果表现出完全不同的选择性（图 10）。从图中可以看出，在 SFC 条件下共洗脱的化合物 4、5 和 6 现在得到了分离。但是，在这些条件下，化合物 12 和 1 几乎为完全共洗脱。此外，比较两幅色谱图可以看出选择性完全不同。例如，在 SFC 条件下最后洗脱的化合物 15 在反相 UHPLC 条件下第二个洗脱出来。

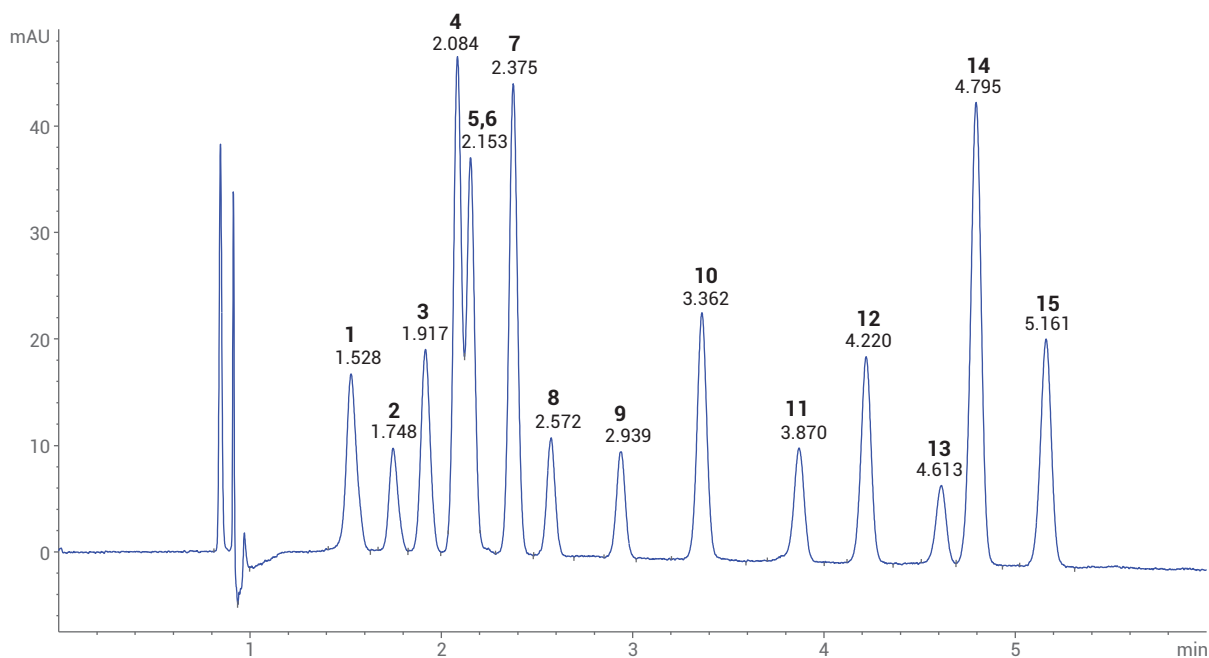


图 9. 在 SFC 模式下，在氨基固定相色谱柱上采用甲醇作为改性剂（参见实验部分）分离包含 15 种农药的复杂样品

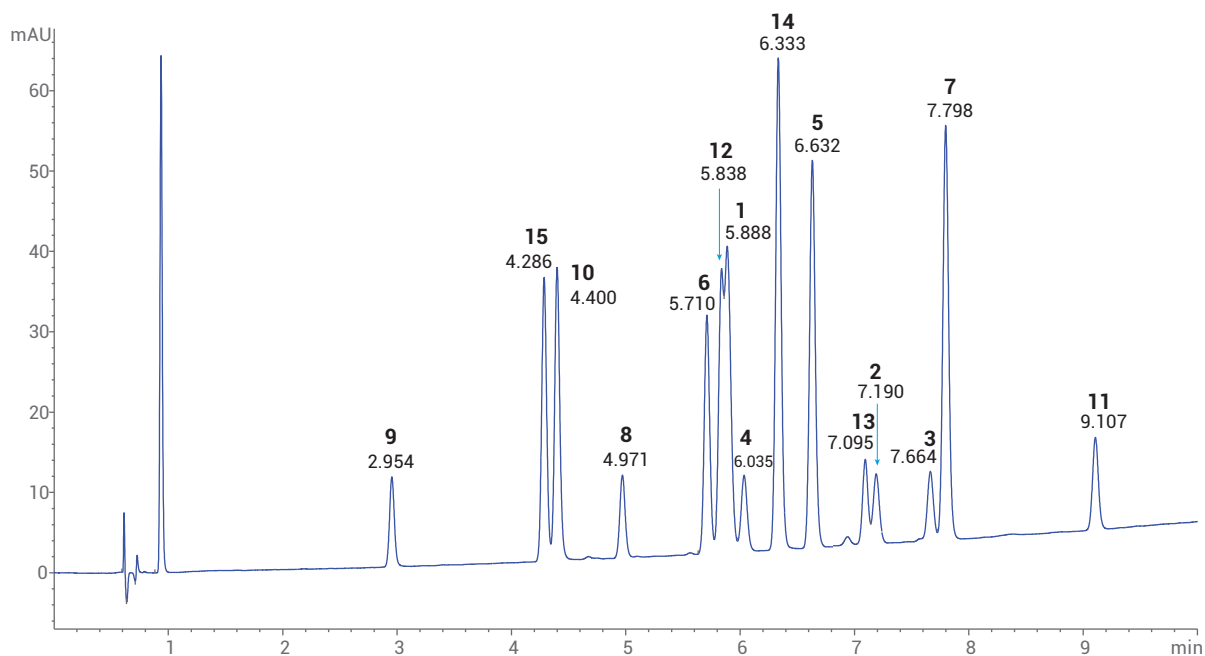


图 10. 在 UHPLC 模式下，在 C18 固定相色谱柱上采用水/乙腈作为溶剂（参见实验部分）分离包含 15 种农药的复杂样品

## 结论

本技术概述证明了 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统的 SFC 模式和 UHPLC 模式可提供与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器相同的性能。利用 Agilent 1260 Infinity II SFC/UHPLC 混合型系统测得的峰面积 RSD、保留时间 RSD 和线性值与单独的 SFC 和 UHPLC 仪器测得的值处于同一水平。证明了能够在 SFC 和 UHPLC 模式之间进行切换（甚至可在一个序列内切换），并提供了正交分离复杂样品的示例。

## 参考文献

1. Naegele, E. 在极高精度下具有灵活进样量的超临界流体色谱 — 在 Agilent 1260 Infinity II SFC 系统中对 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler 进行性能评估, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7623ZHCN, **2017**
2. Naegele, E. 注入速度和灌洗体积 — SFC 的新进样参数, *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-7626ZHCN, **2017**
3. Huesgen, A. G.; Schneider, S. Performance Characteristics of the Agilent 1290 Infinity II Multisampler (Agilent 1290 Infinity II Multisampler 的性能特点), *安捷伦科技公司技术概述*, 出版号 5991-5348EN, **2014**

查找当地的安捷伦客户中心:  
[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:  
[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://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  
5991-8276ZHCN



**Agilent Technologies**