

Journal of chromatography library — volume 38

PREPARATIVE LIQUID
CHROMATOGRAPHY

edited by
Brian A. Bidlingmeyer

Elsevier
Amsterdam — Oxford — New York — Tokyo 1987

ПРЕПАРАТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Редактор
Б.БИДЛИНГМЕЙЕР

Перевод с английского
д-ра хим. наук, профессора
О. Г. Ларионова



МОСКВА «МИР»
1990

ББК 24.4
П72
УДК 543.544

Авторы: Б. Бидлингмейер, Б. Фрайд, Г. Хегнауер, Б. Хемпер, У. Хэнкок, П. Макдональд, У. Пиркл, Р. Престидж, Й. Шерма, Ф. Ванкат, А. Верли, Дж. Уайтселл

Препаративная жидкостная хроматография: Пер. с П72 англ. — М.: Мир, 1990. — 360 с., ил.

ISBN 5-03-001187-0

Книга авторов из США, Швейцарии и Новой Зеландии из серии изданий, посвященных теории и практике хроматографических и электрофоретических методов. Первая в мировой литературе монография по препаративной жидкостной хроматографии — методу, который позволяет совершенно по-новому решать задачи биотехнологии, геной инженерии, малой химии и т. п., т. е. отраслей, определяющих научно-технический прогресс.

Для химиков, биологов, медиков, фармацевтов.

П 1707000000-311 73—90
041(01)-90

ББК 24.4

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001187-0 (русск.)
ISBN 0-444-42832-1 (англ.)
ISBN 0-444-41616-1 (англ.)

© Elsevier Science Publishers B. V., 1987
© перевод на русский язык, Ларионов О. Г., 1990

От переводчика

По образному выражению проф. А. А. Жуховицкого, «открытие хроматографии можно сравнить с созданием микроскопа. Благодаря ей открылся новый, неведомый ранее мир многих компонентов, примесей и микропримесей». В настоящее время она заняла ведущее место среди методов анализа сложных смесей, и трудно найти область естественных наук, в которой бы не использовались достижения хроматографии. При этом часто забывают, что хроматография — это прежде всего мощный метод разделения, реализующий малейшие различия в физико-химических свойствах компонентов системы благодаря многократному повторению процессов распределения веществ при их движении по колонке.

Быстрое развитие современной аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволило решить многие проблемы новейших областей знаний. С самого начала развития ВЭЖХ стало ясно, что она обладает рядом уникальных свойств, определяющих возможности ее использования для препаративных и технологических целей: простое масштабирование без потери эффективности, слабая зависимость эффективности от скорости потока, позволяющая получать производительности, сопоставимые с нуждами технологии, легкая перенастраиваемость, дающая возможность по-новому подходить к организации технологических процессов разделения, и т. д. — все это привело к тому, что в последние годы началось бурное развитие препаративной жидкостной хроматографии, по своим разделительным возможностям мало уступающей аналитической ВЭЖХ.

Предлагаемая читателю книга является первой монографией, посвященной препаративной жидкостной хроматографии. Книга написана коллективом авторов, являющихся специалистами в соответствующих областях препаративной хроматографии.

Наиболее систематизированные и полные сведения о принципах препаративной хроматографии, практических шагах по ее использованию для решения стоящих перед исследователем задач приведены в гл. 1—3. Последующие главы посвящены вопросам использования жидкостной препаративной хроматографии в фармацевтической промышленности, органической химии, биохимии, при разделении энантиомеров, полимеров.

Книга не содержит глубоких теоретических сведений о процессах хроматографического разделения, но дает ясное качественное понимание основных взаимосвязей между величинами, влияющими на процессы разделения.

Большое внимание в книге уделено экономическим вопросам, приобретающим важное значение в крупномасштабной препаративной хроматографии.

Думаю, что книга будет хорошим пособием для всех, кто интересуется препаративными разделениями. Она дает возможность заинтересованному читателю познакомиться с основами и принципами осуществления наиболее тонких разделений с помощью препаративной жидкостной хроматографии.

О. Г. Ларионов

Предисловие

Широкое использование современной жидкостной хроматографии (ЖХ) началось после того, как в 1969 г. на Питсбургской конференции был представлен первый жидкостной хроматограф. Созданные на базе приборов для аминокислотного анализа и гель-проникающей хроматографии конца 1950-х — начала 1960-х гг., представленные приборы для жидкостной хроматографии открыли новые экспериментальные возможности для ученых, нуждающихся в проведении предварительного разделения перед окончательным анализом. Хорошо известно произошедшее в последующие годы феноменальное развитие жидкостной хроматографии.

Для прогресса в химии всегда были необходимы как анализ, так и выделение индивидуальных веществ из смеси, поэтому неудивительно, что успехи в использовании жидкостной хроматографии для анализа всегда сопровождались развитием препаративной ЖХ для выделения и очистки. В начале 1960-х гг. один из основных сторонников препаративной жидкостной хроматографии лауреат Нобелевской премии д-р Р. Б. Вудвард из Гарвардского университета в статье, описывающей синтез витамина В₁₂, написал: «Возможности метода ЖХ высокого давления с трудом может себе представить химик, который не имел опыта его использования...» (см. разд. 1.1). Эти слова напоминают более раннее высказывание М. С. Цвета, признанного многими отцом хроматографии. В начале XX столетия Цвет писал: «Существенным условием плодотворного исследования является обладание пригодной методикой». В настоящее время препаративная ЖХ стала этим необходимым методом эксперимента; и по мере роста возможности управлять химическим составом будет возрастать роль хроматографии в развитии науки.

Как редактор я считаю, что развитие метода разделения основывается главным образом на опыте и метод развивается наиболее эффективно в тех случаях, когда он имеет целью практическое применение. Практическая цель наряду с пониманием стратегии метода разделения и связи между входом и выходом используемого оборудования позволяет наиболее успешно решать проблемы выделения и очистки. Это — философская концепция данной книги.

В гл. 1 и 2 обсуждаются главные принципы разделения с использованием примеров, которые иллюстрируют эти положения. В гл. 3—8 внимание сконцентрировано на собственно разделениях. Я надеюсь, что исследователь найдет эту книгу полез-

ной и она поможет ему быстрее решить наиболее трудные проблемы очистки.

Б. Бидлингмейер

Авторы:

Б. Бидлингмейер (Dr. Brian A. Bidlingmeyer, Waters Chromatography Division of Millipore, 34 Maple Street, Milford, MA 01757, USA); *Б. Фрайд* (Dr. Bernard Fried, Department of Biology, Lafayette College, Easton, PA, 18042, USA); *Г. Хегнауер* (Dr. Gary L. Hagnauer, Polymer Research Division, U S Army Materials Technology Laboratory, Watertown, MA 02172 USA); *Б. Хемпер* (Dr. Bruce C. Hamper, The Roger Adams Laboratory, School of Chemical Sciences, University of Illinois, Urbana, IL, 61801, USA); *У. Хэнкок* (Dr. Williams S. Hancock, Department of Chemistry, Biochemistry and Biophysics, Massey University, Palmerston North, New Zealand); *П. Макдональд* (Dr. Patrick D. McDonald, Waters Chromatography Division of Millipore, 34 Maple Street, Milford, MA 01757, USA); *У. Пиркл* (Dr. William H. Pirkle, The Roger Adams Laboratory, School of Chemical Sciences, University of Illinois, Urbana, IL, 61801, USA); *Р. Престидж* (Dr. Ross L. Prestidge, Department of Pathology, Auckland University School of Medicine, Auckland, New Zealand); *И. Шерма* (Dr. Joseph Sherma, Department of Chemistry, Lafayette College, Easton, PA, 18042, USA); *Ф. Ванкат* (Dr. Phillip C. Wankat, School of Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA); *А. Верли* (Dr. A. Wehrli, Sandoz Ltd, Pharmaceutical Division, Pre-Clinical Research, 4002 Basle, Switzerland); *Дж. Уайтселл* (Dr. James K. Whitesell, Department of Chemistry, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712 USA).

1

Принципы препаративной жидкостной хроматографии

П. Макдональд, Б. Бидлингмейер

1.1. Введение

Мемориальное издание [1] и выставка, посвященная 100-летию Американского химического общества (1876—1976), назывались «Разделение и синтез». Таким же образом может быть определена и химия в целом, поскольку разделение и синтез являются основой нашего прогресса в понимании мира химии внутри и вокруг нас.

Возникновение новых методов разделения и их применение для решения важных проблем каждый раз способствовали развитию химической науки. Так произошло в начале 1970-х гг., когда профессор Роберт Б. Вудвард из Гарвардского университета впервые использовал новый в то время метод современной жидкостной хроматографии (ЖХ) в работах по синтезу витамина B₁₂ [2]. В то время даже наиболее опытные химики-синтетики столкнулись с необходимостью решения проблемы разделения. Профессор Вудвард так описывал сложившееся положение: «...в настоящее время перед нами возникла опасность потерять стереохимические особенности наших веществ в упомянутых трех центрах. И это ставит перед нами сложную задачу разделения... Если на стадии гептаметилбисноркобиринов оставить неопределенной стереохимию трех упомянутых центров, то затем все равно возникнет проблема стереохимии, и конечно, связанная с ней проблема разделения очень близких по свойствам молекул» [3]. Решение возникших проблем разделения стало возможным при использовании ЖХ. Прочитав опять слова Вудварда: «Здесь я должен сказать, что решающую роль во всей нашей дальнейшей работе имело использование жидкостной хроматографии высокого давления для очень трудных разделений, с которыми мы столкнулись, начиная с этого момента. Возможности метода жидкостной хроматографии высокого давления с трудом может оценить химик, который не использовал этот метод; этот метод является относительно простым, и, я уверен, он станет необходимым в каждой лаборатории органической химии в очень недалеком будущем» [4]. Очень скоро метод ЖХ стал основным в исследованиях профессора Вудварда. Степень его использования как стандартного метода видна из следующего высказывания: «Данная кобириновая кислота была

кристаллической, идентичной во всех отношениях, особенно по жидкохроматографическому поведению, кобириновой кислоте, полученной из натурального источника» [5].

Коллега профессора Вудварда и его сотрудник, продолжатель этих исследований профессор Альберт Эшенмозер из Технической высшей школы в Цюрихе (Швейцария) дал следующую оценку возможностям препаративной ЖХ на основе ее использования в работах по синтезу витамина В₁₂: «...Существующие трудности имели не принципиальный, а скорее экспериментальный характер. Эти трудности были успешно преодолены с помощью жидкостной хроматографии высокого давления, которая появилась как раз в нужный момент и продемонстрировала, вероятно впервые, эффективность этого нового метода разделения в органическом синтезе» [6]. Действительно, вслед за первыми сообщениями Вудварда и Эшенмозера об успешном использовании современной техники препаративной ЖХ многие исследователи стали применять этот мощный метод быстрого выделения очищенных материалов для их получения и различного дальнейшего использования. В современной литературе имеется ряд обзоров по теории, материалам и методам ЖХ [7—38]. В этой главе мы обсудим пути эффективного использования ЖХ для выделения, обогащения и очистки компонентов интересующих образцов.

1.2. Планирование разделения

1.2.1. Постановка проблемы

1.2.1.1. Препаративное или аналитическое разделение?

Прежде чем приступить к любому разделению, следует тщательно спланировать работу с целью получения наилучшего возможного результата. Обычно целью разделения является анализ или препаративное выделение. Аналитическое и препаративное разделения существенно отличаются по своим целям даже в том случае, когда они выполняются в одном и том же масштабе. Рассматриваемой задаче должны соответствовать не только выбор методологии и приборов, но и позиции хроматографиста. Имеется много ошибочных взглядов на препаративную хроматографию (рис. 1.1). В этой главе их следует пересмотреть.

Обычно *аналитическую ЖХ* используют для получения качественной или количественной информации о данном образце: например, получают характерный профиль элюирования (фингерпринт, или «отпечаток пальцев»); определяют количество

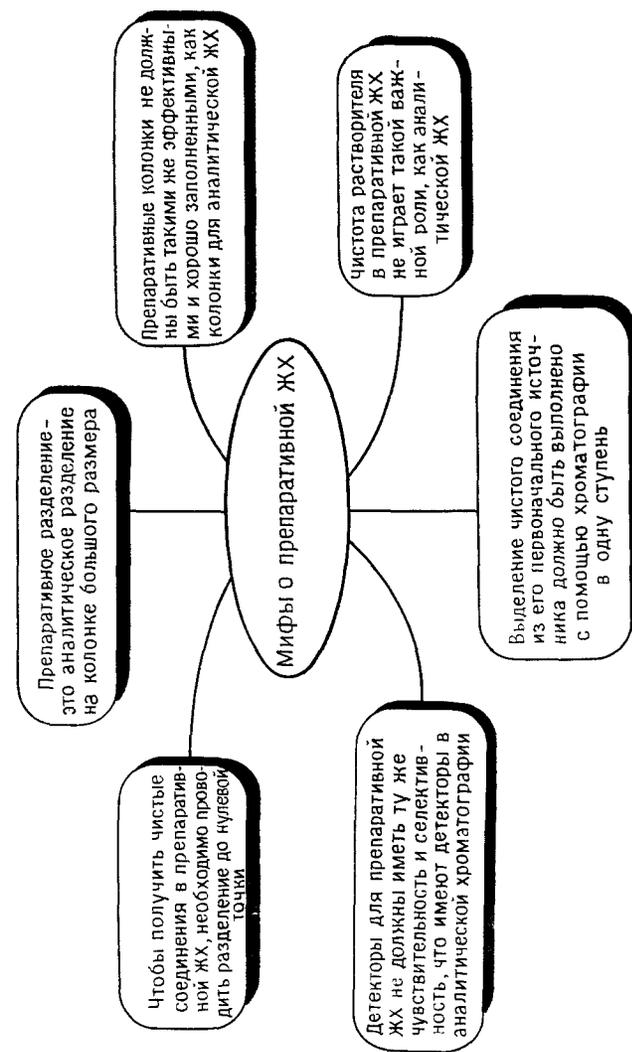


Рис. 1.1. Обычные неправильные представления о препаративной ЖХ.

Таблица 1.1. Сравнение аналитической и препаративной ЖХ

Основа сравнения	Аналитическая ЖХ	Препаративная ЖХ
Цель	Получение качественной или количественной информации об образце	Выделение, обогащение или очистка компонентов образца
Практическое назначение	Максимальная пиковая емкость (число компонентов, разделенных или измеренных в единицу времени)	Максимальный выход (количество материала, очищенного в единицу времени)
Типичный размер образца	До 10 мг	Микропрепаративная: ≤ 100 мг Препаративная: 0,1—100 г Макропрепаративная: ≥ 0,1 кг
Нагрузка на колонку	Как можно меньшая, обычно 10^{-10} — 10^{-3} г образца на 1 г насадки	Как можно большая, обычно 0,001—0,1 г образца на 1 г насадки
Степень разделения	Соответствует возможностям техники детектирования. Обычно разделение до нулевой линии	Соответствует требованиям уровня чистоты и степени извлечения. Часто вполне достаточно умеренного разрешения
Детектор	Необходим. Высокая чувствительность и широкий динамический диапазон	Желателен. Для анализа фракций «он-лайн» или «офф-лайн», необходим дополнительный диапазон измерения при низкой чувствительности
Мазначение образца	Обычно образец сбрасывают вместе с подвижной фазой	Фракции образца собирают. Подвижная фаза может быть возвращена в процесс

присутствующих компонентов; получают сведения о присутствии или отсутствии какого-либо компонента, о его количестве, об относительных концентрациях интересующих компонентов (табл. 1.1). При использовании различных мощных детекторов и доступных в настоящее время устройств обработки данных аналитическая хроматография может быть использована также для установления или подтверждения идентичности представляющих интерес компонентов. В настоящее время доступны сложные селективные схемы детектирования, в основе которых лежат уникальные системы и сенсоры, химическая модификация образцов компонентов или методы развертки, поэтому информация может быть получена и без полного разделения важных компонентов образца. Некоторые формы детектирования могут допускать деструкцию образца. После разделения компоненты образца обычно уничтожаются.

В противоположность этому препаративная ЖХ ориентирована на то, чтобы выделить, обогатить или очистить один или большее число компонентов данного образца, которые собирают для дальнейшего использования, например для продолжения синтеза, применения в качестве стандартных образцов, образцов для анализа или для испытания с помощью физических, химических или биологических методов, в качестве коммерческих продуктов для продажи (табл. 1.1).

При помощи детекторов в этом случае, следя за процессом разделения, делают заключение о том, как фракционировать поток элюента или собирать интересные компоненты в отдельные фракции. Часто в крупномасштабных разделениях детектирование осуществляется на небольшой части образца, который отбирается от основного потока (он-лайн) или берется для контроля из различных фракций (офф-лайн). Очевидно, что разделение должно быть адекватно целям выделения, т. е. получению материалов с желаемой степенью чистоты.

В этой главе термин «препаративная ЖХ» будет использован в общем смысле. Как указано в табл. 1.1, наиболее часто при препаративных ЖХ-разделениях в лаборатории имеют дело с образцами от 0,1 до 100 г. При препаративных разделениях, выполняемых в меньших или больших масштабах, будут использованы термины «микропрепаративная ЖХ» и «макропрепаративная ЖХ» (табл. 1.1).

1.2.1.2. Природа образца

После того как установлена необходимость препаративного разделения, следует рассмотреть характеристики образца для того, чтобы поставить соответствующие цели и наметить план процесса разделения:

состав (известен или неизвестен состав образца);

вид образца (физическая или химическая природа образца);

сложность образца (является ли образец относительно простой смесью нескольких компонентов, например, синтетический продукт, или сложной смесью многих компонентов, например природный продукт);

свойства образца (являются ли компоненты образца близкими или сильно различающимися по химическому составу, растворимости и другим свойствам);

фазовый состав образца (является ли образец жидкостью, твердым телом или смесью растворимых и нерастворимых материалов);

концентрация (уровень концентрации исследуемых компонентов в матрице образца, например микропримесей, одного доминирующего компонента или нескольких главных компонентов).

1.2.1.3. Практические соображения

Для оценки целесообразности разделения необходимо учесть следующие факторы:

количество (какое количество образца должно быть разделено);

емкость системы (как соотносятся количество образца с емкостью средств разделения, которые можно использовать для его выполнения);

стоимость (насколько ценным является образец);

выигрыш в цене (насколько возрастает стоимость компонента в результате однократной очистки или обогащения по отношению к затратам разделения);

частота разделения (насколько часто разделение должно повторяться в будущем);

безопасность (какие имеются опасности при работе с образцом и при использовании методов разделения).

1.2.2. Выбор цели разделения

После установления существа проблемы следует поставить *реальные* цели разделения. Проще всего сказать, что каждый компонент должен быть выделен в чистом виде, без потери материала, в течение нескольких часов по цене 1 доллар за 1 г образца. Но такая цель разделения может быть недостижима. Более того, может быть такое разделение в действительности не является необходимым. Если допустим некоторый уровень примесей и потерь образца, то разделения можно достичь в минимальное время при разумной цене, а продукты будут соответствовать предъявляемым к ним требованиям.

Разделение методом препаративной ЖХ имеет по крайней мере пять независимых элементов: *чистота, количество, время, трудность разделения и стоимость* (рис. 1.2). Несомненно, что для достижения оптимального результата каждый из этих элементов должен быть выбран на основе компромисса. Ниже мы кратко рассмотрим каждый из них. Далее в этой главе мы более глубоко проанализируем их взаимодействие.

Чистота является понятием абсолютным. Вещество может быть либо чистым, либо нечистым. Среднего быть не может. Однако химики и биохимики используют термин «чистота» и соответствующие дополняющие слова (например, «степень чистоты», « $x\%$ чистоты», «степень активности») в относительном, а не абсолютном смысле. «Чистоту» обычно определяют на основе возможности детектировать примесь или пониженную активность в образце, используя доступные аналитические методы. Чем выше требования к уровню чистоты, тем больше уровень

компромисса в других элементах препаративной ЖХ, особенно в случаях трудных разделений. При определении степени необходимой чистоты в препаративной ЖХ следует иметь в виду окончательное использование очищенного материала. Для использования синтетических полупродуктов достаточно чистоты 85—95% (такие средства, как рутинная ЯМР- или ИК-спектрометрия, могут детектировать загрязнения только выше 5%-ного уровня).

Уровень примесей в натуральных продуктах мог бы быть идентифицирован при достижении концентраций 50—75%. Стандартные вещества для анализа или лекарства для испытания на животных требуют чистоты 99% и более. Некоторые биоактивные соединения, возможно, не нуждаются в дальнейшей очистке, а требуют удаления следовых количеств потенциальных токсинов. Чистота большинства биоактивных молекул измеряется в единицах активности, а не массы. Уровень активности обычно сравнивают с активностью активной части оригинала. В этом случае «чистота» представляется как максимальный и оптимальный уровень активности.

Количество. Этот элемент разделения имеет несколько аспектов. Если концентрация интересующего компонента в образце мала, то для получения требуемого количества соединения должны быть переработаны большие количества образца. В этом случае техника разделения и масштаб аппаратуры, которую следует использовать для разделения, определяются количеством образца, подлежащего переработке. Степень извлечения ценных компонентов должна быть высокой по отношению к общему переработанному количеству. Если в наличии имеется только оборудование для маломасштабных разделений и продукт необходимо получить только один раз, то большой образец может быть разделен на удобные части и подвергнут многоцикловогом хроматографическому разделению. Если требуются чистые препаративные или макропрепаративные ЖХ-разделения, особенно в случае получения коммерческих продуктов, то, по-видимому, оправданы затраты на приобретение крупномасштабного оборудования. Для микропрепаративной ЖХ может

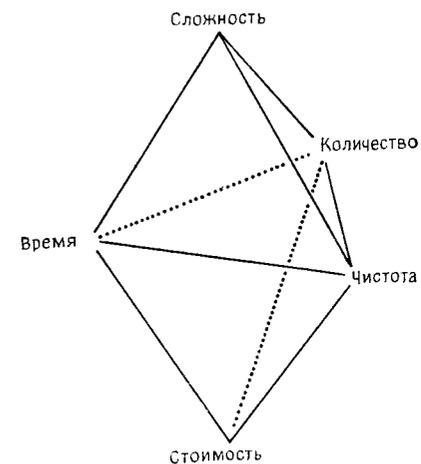


Рис. 1.2 Некоторые характеристики препаративной ЖХ.

быть использовано имеющееся оборудование для аналитической ЖХ.

Время является ключевым фактором, определяющим максимальный выход — принципиальную цель препаративной ЖХ (см. табл. 1.1).

Современная технология чрезвычайно сильно уменьшила время, необходимое для выполнения крупномасштабных хроматографических разделений, — от дней и часов до минут. При выборе времени разделения хроматографист должен исходить не только из задачи оптимизации условий разделения, но также учитывать время, необходимое для приготовления образца, создания системы и приведения ее в равновесное состояние и извлечения элюированных образцов на каждой стадии схемы разделения.

Трудности могут возрастать в зависимости от сложности образца, числа компонентов, которые должны быть выделены из-за несоизмеримости концентраций необходимых компонентов и особенно в случае близости свойств соединений. Трудные разделения более дороги, требуют большего времени и могут накладывать ограничения на количества материала, которые могут быть переработаны, а также на степень чистоты выделяемых продуктов. В случае сложных разделений лучше всего разбить разделение на несколько простых стадий и затратить время на оптимизацию условий для наиболее трудных ступеней разделения. Жидкостную хроматографию следует рассматривать только как одно из многих средств разделения, которое имеется в распоряжении химиков при работе с трудными образцами.

Стоимость становится важным моментом при увеличении масштабов разделения, особенно когда возрастают факторы трудности, требования к чистоте и степени извлечения или минимальному времени разделения. При увеличении стоимости растворителей и насадок следует принимать во внимание время жизни колонок и процессы регенерации и рецикла подвижной фазы. Очевидно, на стоимость значительно влияет оплата рабочей силы. В настоящее время для продуктивности академических исследовательских программ и коммерческих операций важным фактором является общее время разделения.

Большое значение имеет конкуренция как в частном, так и в государственном секторах, хотя ее результаты трудно оценить количественно.

1.2.3. План препаративного ЖХ-разделения

Определение проблем и цели разделения являются первыми ступенями планирования схемы разделения, необходимой для получения желаемого результата. Как показано на рис. 1.3, по-

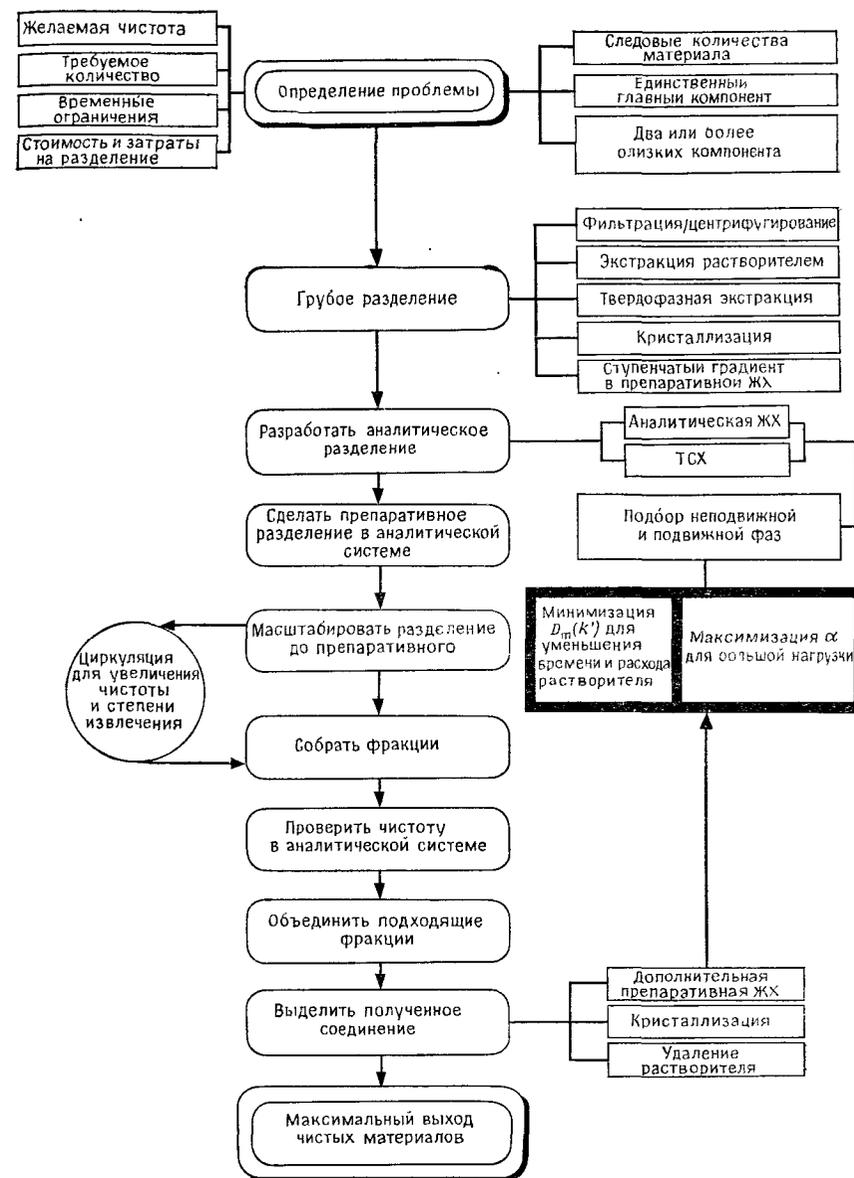


Рис. 1.3. План разделения в препаративной ЖХ.

тенциально трудно разрешимая задача может быть разбита на логически последовательные, простые стадии. Имеется несколько ключевых моментов, которые следует учитывать при подходе к препаративному ЖХ-разделению.

1. Хроматография является сравнительно дорогим методом разделения, и ее следует использовать только в случае необходимости. Например, если требуемое разделение может быть достигнуто путем твердофазной или жидкофазной экстракции или кристаллизации, или их комбинаций, то не следует использовать хроматографию.

2. Желательно попытаться фракционировать большие образцы на классы или группы компонентов сравнительно быстрыми и экономичными грубыми методами разделения. Затем индивидуальные соединения выделяют более тонкими методами.

3. Каждый компонент, подлежащий хроматографированию, должен быть *в растворе подходящего состава растворителя и в необходимой концентрации*.

4. Методы, используемые для переведения образца в раствор и удаления нерастворимой части, могут одновременно исключать большие посторонние части матрицы образца. При этом уменьшается проблема как сложности, так и масштаба разделения.

5. Каждая правильно спланированная ступень часто на порядок увеличивает разделяющую способность и скорость многомерной схемы разделения. Например, препаративная ступень градиентной ЖХ может быстро разделить большой гетерогенный образец на 6—8 фракций, перекрывающих широкую область полярности. Затем каждая фракция может быть очищена с помощью дополнительного ЖХ-разделения при условиях, позволяющих выделять индивидуальные компоненты (см. разд. 1.6.2.2.5 и табл. 1.8).

6. Время, затрачиваемое на оптимизацию селективности и удерживания, окупается, если препаративные ЖХ-разделения являются трудными, крупномасштабными или часто повторяются (см. разд. 1.3).

7. Аналитическая ЖХ является идеальным средством для оптимизации системы; может быть также использована тонко-слойная хроматография (ТСХ) (см. разд. 1.5).

Однажды разработанную аналитическую систему используют как средство определения параметров масштабирования и для анализа фракций, получаемых в результате препаративного ЖХ-разделения.

Решая проблему разделения, препаративная ЖХ вместе с тем ставит перед исследователем ряд других вопросов. На самом деле, компоненты образца могут быть выделены в индивидуальных фракциях, но они все-таки находятся в растворе при

концентрациях, значительно более низких, чем концентрации, в которых они были введены в хроматограф. Степень разбавления зависит от объема колонки и удерживания компонентов. Для того чтобы получить интересующий компонент в сухом состоянии, растворитель должен быть удален. Для удаления примесей, занесенных в результате использования большого объема растворителя или применения неподвижных фаз, может стать необходимым применение других приемов, например перекристаллизации. Эта особенность препаративной ЖХ часто не принимается во внимание (см. разд. 1.6).

1.3. Достижение разделения

С многих практических точек зрения препаративная ЖХ проще, чем аналитическая. Образцы большого объема и более простое оборудование делают работу проще и не требуют той утонченности приемов и способностей, которые требуются при работе с микрошприцами и миниатюрными коммуникациями. Препаративная ЖХ часто выполняется при условиях более низкой эффективности разделения, чем в типичных случаях аналитической ЖХ. Многие хроматографисты считают, что без особого труда можно выполнить требуемое аналитическое разделение просто за счет эффективности колонки. При оптимизации препаративной ЖХ часто констатируют ограниченную эффективность колонки, и разделение достигают за счет лучшего использования физико-химических процессов, приводящих к хроматографическому разделению.

Одним из главных вопросов в области хроматографической науки — какой фактор более важен для успешного разделения: коэффициент разделения или число тарелок. Обычно ответ основывается на опыте и является отражением подхода исследователя к проблеме. Реально — оба параметра критические, и их относительная важность зависит от конкретных условий разделения.

1.3.1. Коэффициент разделения α

Хроматография — динамичный равновесный процесс, который на молекулярном уровне включает распределение молекул растворенного вещества между подвижной и неподвижной фазами. Малейшее различие в относительном сродстве близких, но различных молекул растворенной смеси веществ по отношению к обеим фазам, умноженное на многократный фазовый перенос, который происходит при прохождении молекулы через хроматографическую колонку, приводит к заметному различию удерживания компонентов образца. Выбор оптимальной комбинации

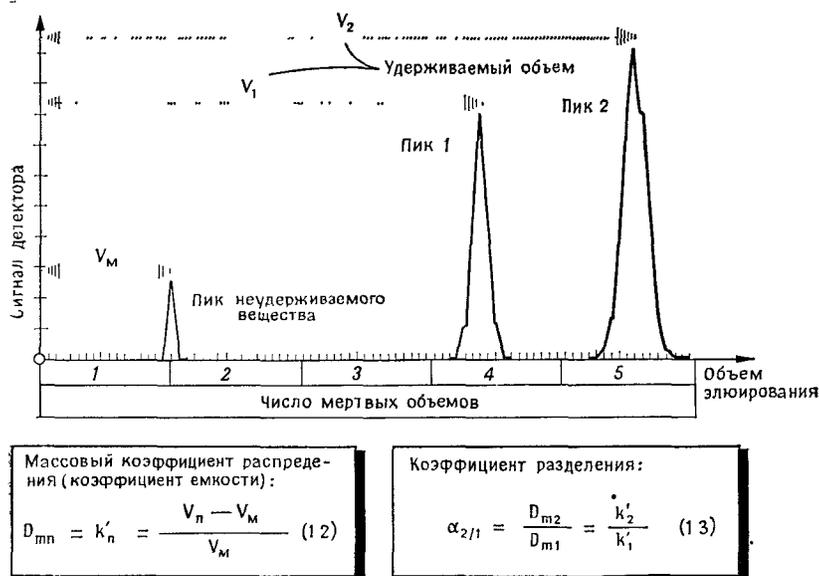


Рис. 1.4. Расчеты на основе кривой элюирования в аналитической ЖХ.

подвижной и неподвижной фаз с целью добиться максимального относительного различия между их сродством к компонентам образца имеет наибольшее влияние на успех любого препаративного ЖХ-разделения.

Детальное термодинамическое и кинетическое описание хроматографического процесса можно найти в различных работах, и нет смысла повторять его в этой книге [39—47]. Следует подчеркнуть два момента: во-первых, коэффициент разделения α выводится из теории равновесия и представляет собой отношение двух массовых коэффициентов распределения D_{m2}/D_{m1} (рис. 1.4), измеренных при идентичных условиях для данной пары компонентов; во-вторых, достаточно просто определить α из измерений статического равновесия или из хроматографических экспериментов. Таким образом, коэффициент массового распределения D_m равен

$$D_m = \frac{\text{Количество компонента в неподвижной фазе}}{\text{Количество компонента в подвижной фазе}} = k' \quad (1.1)$$

Хотя Комиссия по номенклатуре аналитической химии ИЮПАК рекомендовала использовать D_m [48], большинство хроматографистов продолжают представлять коэффициент в уравнении (1.1) термином «коэффициент емкости» k' , отдавая дань разви-

тию теории газовой хроматографии. Несмотря на это, привычный, обычно используемый термин «коэффициент емкости» может приводить к заблуждению в препаративной ЖХ, поскольку k' обратно пропорционален емкости по образцу (см. разд. 1.4.2). Поэтому в данной главе для лучшего понимания препаративной ЖХ мы будем использовать оба термина как напоминание, что k' в действительности описывает распределение компонентов образца между двумя фазами хроматографической системы.

Коэффициенты k' (D_m) и α рассчитывают на основе хроматограммы, как показано на рис. 1.4. Пик неудерживаемого вещества служит маркером, который проходит через хроматографическую систему без какого-либо существенного взаимодействия с неподвижной фазой. Объем подвижной фазы, необходимый для элюирования этого компонента в колонке V_M , или мертвый объем, равен объему подвижной фазы, содержащейся в хроматографической системе, начиная от точки ввода пробы до точки детектирования, причем учитываются объем дозатора, насадки колонки (между и внутри частиц), конца колонки, соединительных трубок и объем ячейки детектора. Объемы удерживания V_1 и V_2 соответствуют объемам подвижной фазы, требуемым для элюирования компонентов 1 и 2 из колонки, измеренным от точки ввода до максимума соответствующего пика. Каждый пик на хроматограмме представляет непосредственно или опосредованно концентрацию растворенного вещества подвижной фазы в точке детектирования на небольшом (но иногда важном) расстоянии от выхода из хроматографического слоя (см. разд. 1.7).

Если поток подвижной фазы (объем в единицу времени) через систему постоянен, то объем на хроматограмме можно представить как ось времени. Если скорость ленты постоянна, измеренное расстояние вдоль оси x представляет объем или время. Объемная скорость и скорость ленты самописца, так же как линейность и пропорциональность концентрации отклика детектора, могут меняться. Однако на практике это не принимается во внимание.

На построенной компьютером модельной хроматограмме на рис. 1.4 каждый пик имеет форму кривой гауссова распределения — идеальное и хорошо определенное описание вероятности того, что молекула будет элюироваться с определенным объемом в ЖХ-системе. Поскольку максимум пика, используемый для расчета V_M или V_n , соответствует точке, в которой молекулы элюируются с наибольшей вероятностью, то другие молекулы элюируются намного раньше и после этой точки. Даже в том случае, когда сигнал детектора при данной чувствительности вернулся к нулевой линии (нулевой сигнал), хвост гауссовой кривой продолжается невидимо, никогда в действительности не

достигая нулевой концентрации. Это положение, часто забываемое хроматографистами, следует учитывать в препаративной ЖХ, где хвосты пиков обычно выражены более четко и не имеют гауссовой формы (см. разд. 1.4.4). Величина хвоста пика, несмотря на то что хвост не всегда виден на хроматограмме, должна быть принята во внимание при планировании сбора фракций и их последующей обработки для достижения желаемого уровня чистоты.

Следует еще раз подчеркнуть, что, поскольку α является отношением (обычно $\alpha > 1$) двух удельных коэффициентов распределения, он непосредственно связан с хроматографическим процессом, в котором молекулы компонентов образца динамически распределены между подвижной и неподвижной фазами. Этот процесс распределения в конце концов определяет относительное положение каждого растворенного вещества (максимум пика) на кривой элюирования. Ширина пика не зависит от коэффициента разделения α .

1.3.2. Число тарелок N

Разрешение пиков R_s является математической функцией как относительного положения пиков, так и средней ширины пиков для данной пары элюируемых растворенных веществ. В единицах объема

$$R_s = (V_1 - V_2) / 0,5(W_1 + W_2) \quad (1.4)$$

где W_1 и W_2 — соответствующие ширины пиков, $0,5(W_1 + W_2)$ — средняя ширина и $(V_2 - V_1)$ — расстояние между центрами пиков анализируемой пары. В аналитической ЖХ обычно предполагают, что пики имеют гауссову форму. Независимо от того, насколько это предположение точно описывает действительность, такое предположение в значительной степени упрощает математически теорию ЖХ. Гауссово распределение симметрично относительно среднего значения, и его ширина может быть измерена в единицах σ — стандартного отклонения от среднего. Из рис. 1.5 видно, что ширина гауссовой кривой между ее точками перегиба, расположенными на высоте 60,7% высоты пика, равно 2σ . Если провести касательные к сторонам кривых в точках перегиба, то они пересекут нулевую линию на расстоянии 4σ , что эквивалентно ширине кривой на высоте 13,4% высоты пика выше нулевой линии. Аналогично существуют другие точки, представляющие ширину 3σ , 5σ и т. д.

Ранее, при развитии теории хроматографии, был предложен показатель качества, с помощью которого можно было сравнивать различные ЖХ-системы. В идеале он должен быть безразмерным, независимым от масштаба и легко измеряемым. Термин *число теоретических тарелок N* был взят из теории дистилля-

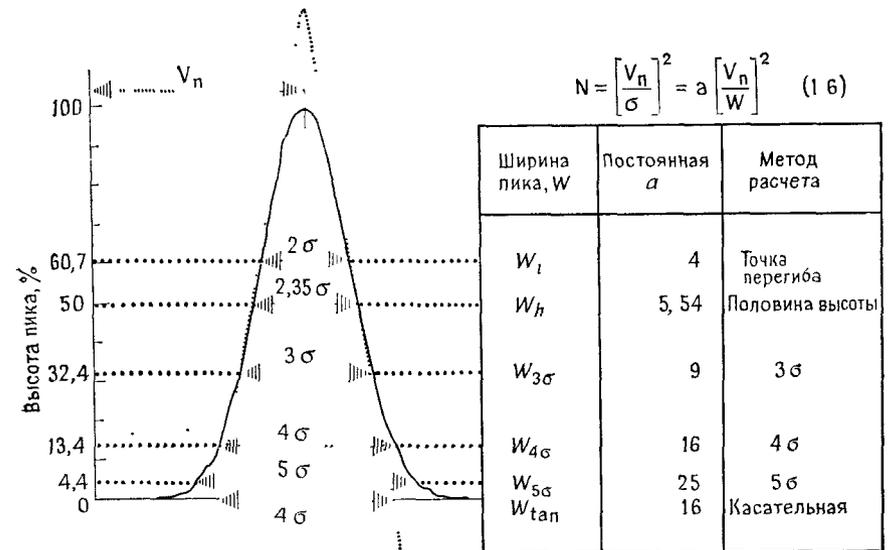


Рис. 1.5. Методы расчета числа теоретических тарелок N из измерений гауссова пика.

ции, но определен не как в дистилляции — как физическое свойство колонки, а как значение статистической функции *дисперсии плотности* σ^2 , которая связывает ширину пика σ с его объемом элюирования (уравнение (1.5)). Для расчета N независимо от формы пика можно использовать статистические моменты, но несмотря на то, что сигнал пика может быть превращен в числовой и обработан с помощью компьютера, большинство хроматографистов предпочитают ручные методы измерения, как это показано на рис. 1.5. В этих методах число теоретических тарелок связано с моделью гауссова пика [49].

Если пик не может быть аппроксимирован гауссовым распределением, то число теоретических тарелок нельзя рассчитать, используя уравнение (1.6). Так как эта ситуация является обычной в препаративной ЖХ (см. разд. 1.4.4), расчет тарелок любым из методов, показанных на рис. 1.5, становится бессмысленным для сравнения качества препаративных ЖХ-систем в условиях большой нагрузки. Более того, качество, оцениваемое в условиях малой нагрузки (аналитической), связанное с конструкцией системы, может не дать правильных сведений о качестве системы в условиях препаративных нагрузок (ср. разд. 1.7.1).

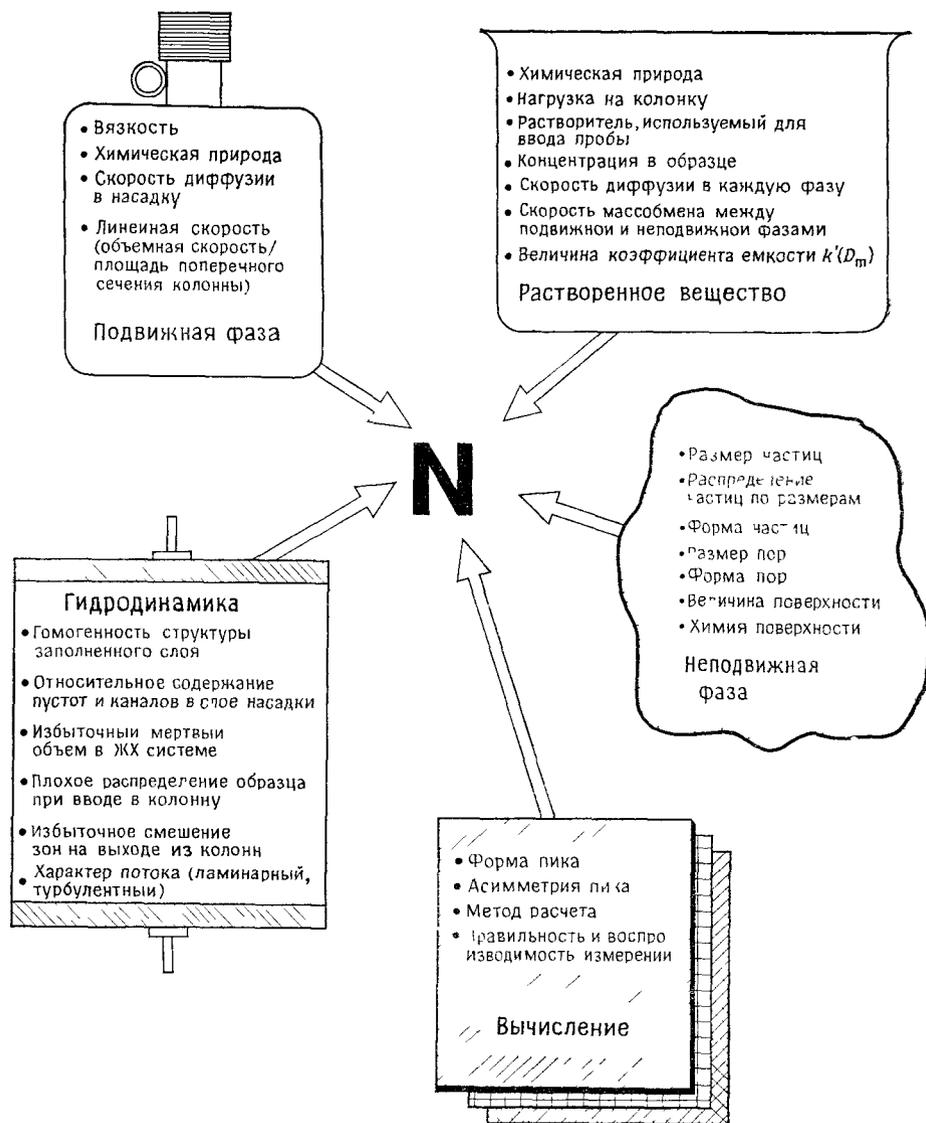


Рис 16 Факторы, влияющие на число теоретических тарелок N

В то время как коэффициент разделения получают на основе равновесной термодинамики, число теоретических тарелок определяют на основе статистической трактовки процесса, которая учитывает как положение пика, так и его ширину. Если на α влияют главным образом физико-химические характеристики

подвижной и неподвижной фаз и растворенных веществ, то N , как показано на рис. 1.6, заметно изменяется под действием многих факторов. Дальнейшее их обсуждение можно найти в прекрасных сообщениях по ЖХ [39—47, 50—59]

1.3.3. Зависимость разрешения от α и N

Если предполагается (рис. 1.4), что пики 1 и 2 имеют гауссову форму и примерно одинаковое число тарелок N , то, преобразуя и комбинируя уравнения (1.2)—(1.4) и подставляя результат в уравнение (1.6), можно выразить *эффективное число теоретических тарелок* N_e через разрешение R_s , коэффициент емкости k_1' (массовый коэффициент распределения D_{m1}) и коэффициент разделения α :

$$N_e = \left[R_s \frac{\sqrt{\alpha} \{2 + k_1'(\alpha + 1)\}}{2k_1'(\alpha - 1)} \right]^2 \quad (1.7)$$

Эту формулу можно далее упростить, предполагая, что ширины пиков одинаковы. Предположение справедливо только для рядом расположенных пиков, имеющих близкие объемы элюирования, одинаковые отклики детектора и количества веществ. После преобразования получаем хорошо известное уравнение для разрешения:

$$R_s = \frac{1}{\sqrt{\alpha}} \sqrt{N_e} \frac{k_1'}{(k_1' + 1)} (\alpha - 1) \quad (1.8)$$

Как можно видеть из уравнения (1.8), наиболее важным фактором, определяющим хорошее разрешение, является α . Изменение α от 1,1 до 1,2 удваивает R_s . Переход от $\alpha = 2$ к $\alpha = 4$ утраивает разрешение. Большие значения α обеспечивают увеличение разрешения, которое в свою очередь позволяет работать с большими нагрузками (ср. разд. 1.4.1). Увеличение коэффициента емкости k_1' от близкого к 0 до 2 также чрезвычайно сильно влияет на R_s , но при значениях k_1' , больших чем 5, этот эффект значительно уменьшается, в то время как значительно увеличивается расход растворителя. Так как R_s зависит от корня квадратного из эффективности колонки, удвоение числа эффективных тарелок увеличивает разрешение только в 1,4 раза. Десятикратное увеличение N дает увеличение R_s только в 3,2 раза. Важно также понимать, что увеличение N обычно связано с увеличением противодавления, с более высокой ценой аппаратуры и меньшей емкостью — факторов, нежелательных в препаративной ЖХ. Таким образом, достижение максимального коэффициента разделения между интересующими компонентами является единственным, наиболее важным путем, который можно использовать при оптимизации препаративных ЖХ-разделений.

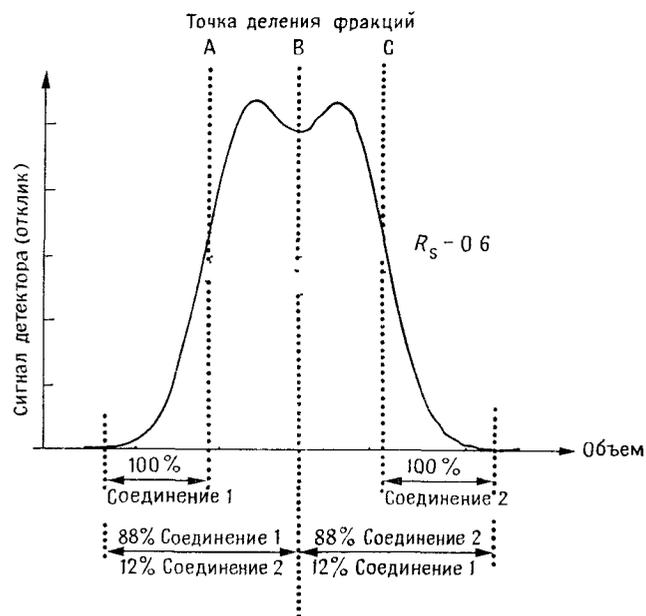


Рис 17 Как получить чистые вещества, если наблюдаемое разрешение является неполным

1.3.4. Степень разделения, необходимая в препаративной ЖХ

Как отмечалось в табл 1 1, типичной целью аналитической ЖХ является разделение до нулевой линии между интересующими пиками. Это соответствует коэффициенту разделения $R_s \geq 1,5$. Практически, если $R_s \geq 1$, обычно можно достичь адекватного интегрирования и количественной обработки пиков. При $R_s = 0,6$ происходит лишь частичное разделение, как показано на рис 17, но все-таки в этой ситуации еще можно выделить чистые компоненты.

Если целью является просто увеличение концентрации компонентов 1 и 2 соответствующих фракций со сбором части элюируемого материала до точки В (см рис 17) и соответственно после точки В в отдельные сборники, то это позволит получить соединения с уровнем чистоты 88% (для гауссовых пиков). Для получения каждого компонента с высокой чистотой для отбора следует использовать точки А и С. Фракция смешанного образца между этими двумя точками может быть собрана и возвращена в процесс или подвергнута рециклу (см разд 1 4 3 4). С увеличением R_s уровень чистоты при отборе до и после точки

Таблица 1 2 Чистота, получаемая при различных значениях R_s (см рис 17)

Разрешение R_s	Чистота при делении фракций в точке В % ^а
0,5	84,0
0,6	88,0
0,7	92,0
0,8	95,0
1,0	98,0
1,25	99,4

^а Равные количества каждого компонента. Гауссова форма пиков. Иллюстрации можно найти в [60] и гл 5.

В очень быстро возрастает (табл 1 2). Например, при $R_s = 0,8$ может быть получена чистота 95%, однако такое разрешение все-таки намного ниже разрешения, типичного для аналитической ЖХ.

Пример, показанный на рис 17, относится к случаю малой нагрузки и умеренно трудного разделения. Для более легких разделений (большого α) и увеличения нагрузки до момента, когда R_s опускается до 0,6, формы рассматриваемых пиков будут существенно отклоняться от гауссова распределения и иметь более острые фронты и более заметные хвосты (см разд 1 4 4). Это позволит получать даже больше чистого компонента 1, но уменьшит количество чистого компонента 2, который может быть получен после точки, в которой хвост пика 1 опустится до нулевой линии. Далее в этой главе будет показано, как проводить такие разделения и выделять полностью оба компонента с высокой частотой путем использования циркуляционной техники (разд 1 4 3 4). Выделение образца зависит также от порядка элюирования и относительных концентраций каждого компонента. Это хорошо проиллюстрировано в гл 5 этой книги и работе [60].

1.4. Нагрузка колонки

1.4.1. Нагрузка или перегрузка!

Главный вопрос применения препаративной ЖХ — какое количество образца можно загрузить в систему и все-таки получить требуемое разделение? Систему часто отклоняют как «перегруженную», когда уровень нагрузки превосходит область, в которой эффективность перестает быть математически предсказуемой, изотерма становится нелинейной и уравнения перестают

адекватно описывать негауссовы формы пиков. Тем не менее и в этих условиях, несмотря на эти препятствия, химик может успешно разделять компоненты образца, следуя определенным практическим советам.

В ряде дискуссий по хроматографии перегрузку рассматривали как точку, в которой размер образца вызывает понижение коэффициента емкости компонента k' (массового коэффициента распределения D_m) на 10% по сравнению с измеренными ранее элюируемыми максимумами пика. Как показано ниже, успешное препаративное ЖХ-разделение может быть выполнено при уровнях нагрузки, намного превосходящих эту точку. Более практическим определением перегрузки служит *нагрузка, которая больше не позволяет выделять продукт с требуемой чистотой или степенью извлечения.*

За немногими исключениями, до введения современной высокоэффективной жидкостной хроматографии колоночная ЖХ была препаративным методом. Такие химики, как Кун, Ледерер и Винтерштейн, возродившие метод Цвета в начале 30-х гг., и Райхштейн с сотрудниками, стандартизовавший методологию элюентной ЖХ (в частности, применительно к разделению стероидов), развили основные положения для нагрузки колонки; их экспериментальная работа велась с большим числом образцов в течение более чем десятилетия [61]. Мартин и Синдж были первыми, кто развил в хроматографии концепцию теоретических тарелок и жидко-жидкостную распределительную хроматографию [62]. Через десятилетие вслед за стандартизацией Шталем методики тонкослойной хроматографии (ТСХ), адсорбционная ЖХ была поставлена на более прочный теоретический фундамент [39—50].

Задолго до того, как был введен коэффициент разделения и предложен его расчет, хроматографисты методом проб и ошибок установили, что для фиксированного размера образца более сложные разделения требуют значительно большего отношения массы насадки к массе образца, чем в случае легких разделений. Как показано в табл. 1.3, эмпирические положения, развитые в 40-х гг., достаточно хорошо согласуются с нагрузками, предложенными в 60-х гг. на основе значения линейных изотерм адсорбции и стандартизации адсорбента. Следует подчеркнуть, что величина нагрузки зависит в большинстве случаев от параметров, перечисленных на рис. 1.6, которые влияют на N . Таким образом, любые рекомендации, опубликованные для удобства хроматографиста, как раз и являются «основными положениями». Эксперимент все еще служит лучшим путем определения, какую нагрузку следует выбрать для данной ситуации. Структура и свойства молекул, характер их взаимодействий с подвижной и неподвижной фазами в присутствии других компо-

Таблица 1.3. Сравнение α и рекомендаций по нагрузкам в препаративной ЖХ, полученных в 1940-х и 1960-х гг.^a

α	Сложность разделения	ЖХ-разделение (метод)	Масса адсорбента на 1 г образца	
			Райхштейн и др. [61]	Снайдер [63]
$\geq 2,0$	Легкое	Открытые колонки. Ступенчатый градиент	~ 15	~ 20
$\geq 1,5$	Среднее	Возможно на открытых колонках, изократическое	50—500	до ~ 500
$\geq 1,3$	Сложное	На грани возможного методом ТСХ	до 5000	500—5000
$< 1,3$	Очень сложное	Возможно только с помощью ВЭЖХ	—	—

^a Данные приведены для типичного силикагелевого адсорбента с удельной площадью поверхности 300 м²/г, средний размер пор $>60 \text{ \AA}$.

нентов образца, геометрии и свойства активных фаз (особенно их взаимодействие с молекулами растворителя), их активность, величина поверхности адсорбента, размер его пор и т. д. наряду с другими аспектами являются критическими для определения оптимального размера образца, при котором достигается максимальный выход в препаративной ЖХ.

1.4.2. Качественная модель нагрузки колонки

Хроматография — динамический процесс, поскольку одна или две распределяющие фазы находятся в движении. Концепцию динамического равновесия трудно понять математически или представить себе мысленно, поэтому часто проще сделать приближение путем «моментальных снимков» различных стадий и затем объединить их в модель, представляющую весь процесс. Рассмотрим «моментальный снимок» молекул образца, входящих в слой хроматографической колонки. Эта простая картина позволит лучше понять смысл многих сложных переменных, которые управляют хроматографическим процессом.

Наша модель демонстрирует случай адсорбционной хроматографии на колонке, заполненной силикагелем, сравнительно малых органических молекул. Общепринято, что при хроматографии на силикагеле «активными местами», на которых происходит адсорбция, служат силанольные ($-\text{SiOH}$) группы на поверхности силикагеля. Это концевые группы кремнекислородной полимерной структуры $(\text{SiO}_2)_n$, образованной из тетраэдри-

ческих субъединиц. Некоторые силанольные группы расположены достаточно близко друг к другу для того, чтобы образовать между собой водородную связь (водородно-связанные силанольные группы). Стоящие отдельно силанольные группы называют свободными, несвязанными силанольными группами. Добавление небольших количеств воды к силикагелю делает поверхность силикагеля более гомогенной за счет образования водородных связей молекул воды со свободными силанольными группами и частично со связанными силанольными группами, в результате чего образуется моно-или полимолекулярный слой молекул воды. Это является обычным условием при выполнении хроматографии на силикагелевых слоях, так как силикагель адсорбирует влагу из воздуха и из неполностью высушенных смесей растворителей. Небольшие количества адсорбированной воды очень трудно удалить хроматографически, и обычно желателен иметь небольшие количества заранее присутствующей воды (3—5% по массе) для того, чтобы упростить условия уравнивания колонки, улучшить воспроизводимость, уменьшить необратимую адсорбцию, увеличить емкость по образцу и регенерацию [64] (см. разд. 1.6.1.1.4).

Было сделано много попыток количественно измерить число силанольных групп на поверхности различных типов кремнезема. Считают, что число силанольных групп на поверхности 100 \AA^2 для силикагелей, используемых в хроматографии, должно быть между 2 и 6. Это значение меняется в зависимости от многих экспериментальных параметров и методики, используемой для измерений [65].

Предположим, что молекула вводимого образца имеет компактный размер и форму (мол. масса M 250) с одной активной функциональной группой, так что на каждых 100 \AA поверхности силикагеля может быть потенциально адсорбировано 3 молекулы. Так как $1 \text{ м} = 10^{10} \text{ \AA}$, то $(3 \text{ молекулы}/100 \text{ \AA}^2) \cdot (10^{10} \text{ \AA}/\text{м})^2 = 3 \cdot 10^{18}$ молекул может быть адсорбировано на каждом квадратном метре поверхности кремнезема. Колонка, содержащая 325 г силикагеля, имеющего поверхность $300 \text{ м}^2/\text{г}$, могла бы адсорбировать $(3 \cdot 10^{18} \text{ молекул}/\text{м}^2) \cdot (300 \text{ м}^2/\text{г}) \cdot (325 \text{ г}) = 3,12 \cdot 10^{23}$ молекул соединения. Деля это число на число Авогадро, получим, что потенциальная адсорбционная емкость равна 0,52 моля (или 130 г) соединения с молекулярной массой 250.

Далее предположим, что коэффициент емкости k' (массовый коэффициент распределения D_m) этого соединения равен 2, т. е. при равновесных условиях в каждый данный момент адсорбированных молекул на неподвижной фазе вдвое больше, чем их остается в подвижной фазе. Это означает, что колонка могла бы потенциально содержать 195 г соединений (130 г адсорбированных и 65 г в подвижной фазе) одновременно. Если бы k' уве-

личился до 10, то емкость упала бы до 143 г (130 г адсорбированных и 13 г в подвижной фазе), тогда как при $k'=0,1$ в колонке могло бы содержаться 1430 г соединений (130+1300).

Модель следует несколько развить, чтобы объяснить, почему, несмотря на большую потенциальную емкость, типичные нагрузки при разделении, выполняемых на такого рода колонках, составляют только 1—10 г. Каждая молекула соединения, имеющая $k' > 0$, часть времени ее пребывания в хроматографическом слое проводит в адсорбированном состоянии на неподвижной фазе. Молекулы другого типа в зависимости от относительной величины их взаимодействия с неподвижной и подвижной фазами будут проводить больше или меньше времени в неподвижной фазе. Это взаимодействие может быть химическим, механическим или электрическим по природе, или же комбинированным. Различие в силах притяжения силикагелем молекул двух разных типов чрезвычайно мало, однако абсолютная величина взаимодействия достаточно велика. Поэтому, для того чтобы одна молекула селективно удержалась и таким образом отделилась от другой при ее прохождении через слой силикагеля, она должна переходить на поверхность силикагеля и в подвижную фазу, туда и обратно много-много раз, с тем чтобы очень малое различие в перемещениях масс для каждого типа молекулы, многократно умноженное, привело к значительному различию в измеряемых временах удерживания.

Если бы было необходимо разделить только две молекулы одну от другой, то проблема была бы простой. Но в 1 г образца может содержаться порядка 10^{21} молекул, и это требует включить в модель статистические факторы (кинетика) и эффекты, связанные с объемными свойствами (термодинамика), чтобы объяснить сложные взаимодействия и конкуренцию между молекулами и механизм хроматографического процесса. Детальное описание можно найти в литературе (например, [39, 40]).

Введение порции молекул в слой силикагеля вызывает первоначально хаос, и требуется время и пространство для того, чтобы молекулы рассортировались. Молекулы образца и элюента соревнуются за доступные активные места на поверхности, вытесняют друг друга, ищут пути наименьшего сопротивления, хотя и извилистые, внутри, вокруг и, возможно, через частицы пористого силикагеля. Продвигаясь, они обходят некоторые адсорбционные места для того, чтобы занять другие, и в общем не используют полностью всю доступную им поверхность силикагеля. Для того чтобы достичь равновесного распределения между неподвижной и подвижной фазами для определенного количества вещества, введенного с заданной концентрацией, требуется определенный объем слоя силикагеля. Этот объем

слоя является фактически первоначальным определением «хроматографической тарелки» [62]. Если бы этот объем слоя был равен полному слою силикагелевой насадки, то колонка содержала бы одну тарелку. Если этот объем составляет только 0,01 или 0,001 слоя силикагеля, то колонка содержит 100 или 1000 тарелок соответственно.

В случаях когда размер образца очень мал (аналитические нагрузки), определяют собственную, «врожденную» эффективность колонки («число тарелок» или высота тарелки), которая определяется не размером образца, а механическими параметрами, такими, как размер частиц, метод заполнения, конструкция колонки (см. разд. 1.4.3.2). Но в препаративной ЖХ размер тарелки (длина или высота, которая для данного диаметра цилиндра определяет объем) принципиально определяется количеством и концентрацией образца, введенного в слой. Чем меньше различие между силами притяжения каждой из фаз к молекулам двух видов, тем труднее разделение и тем большее число раз должен происходить процесс адсорбции и десорбции для достижения разделения. Чтобы обеспечить достаточное взаимодействие трудноразделяемого образца с поверхностью силикагеля, размер образца нужно соответственно уменьшить. Если желаемое разделение не может быть достигнуто даже при уменьшении таким образом эффективного объема тарелки, то, чтобы сделать время удерживания достаточным для требуемого количества молекулярных переходов между подвижной и неподвижной фазами, следует увеличить число тарелок (собственную эффективность колонки). Это можно сделать одним из следующих путей: а) уменьшить размер частиц в колонке тех же размеров (что резко ограничивает размер образца); б) увеличить эффективную длину колонки (что позволяет производить загрузку больших образцов, но увеличивает время разделения и затраты растворителей) следующим путем:

- 1) заполнить более длинную колонку;
- 2) соединить несколько колонок последовательно;
- 3) использовать циркуляцию.

Если число тарелок, требуемое для данного разделения, заранее известно, то можно оценить размер образца, который может быть разделен на колонке заданных размеров. К сожалению, очень трудно получить точные численные значения размеров тарелки при вводе пробы в препаративной ЖХ. При прохождении молекул образца через слой в колонке размер первоначальной полосы всегда только увеличивается из-за различных механизмов размывания полосы. Поэтому, когда компоненты образца разделяются на индивидуальные, часто перекрывающиеся и давая более широкие зоны, первоначальный объем тарелки почти невозможно измерить. Поэтому, чтобы привести

Таблица 1.4. Число эффективных теоретических тарелок, необходимое для каждого компонента при различных коэффициентах разделения

α	N_e (рассчитано по уравнению (1.7))					
	$R_s=0,6$	0,7	0,8	1,0	1,25	1,5
10	2,6	3,5	4,6	7,1	11,1	16,0
5	4	6	8	12	19	28
3	9	12	16	25	39	56
2	23	31	41	64	100	144
1,7	40	55	72	112	175	251
1,5	71	96	125	196	306	441
1,3	174	237	310	484	756	1089
1,2	369	502	655	1024	1600	2304
1,1	1384	1884	2460	3844	6006	8649
1,05	5358	7293	9526	14 884	23 256	33 489

Другие условия $k'=2,0$; $\alpha=16$ (метод касательных, см. рис. 1.5).

нашу модель в соответствии с оцениваемой нагрузкой колонки, следует сделать некоторые дополнительные предположения.

Вместо измерения объема тарелки при введении пробы в методе ЖХ можно измерить объем каждого элюируемого пика наряду с его удерживаемым объемом, полученным из аналитической хроматограммы (условие малой нагрузки). Число эффективных теоретических тарелок для каждого компонента можно рассчитать с помощью уравнения (1.7). Число тарелок N_e для различных коэффициентов разделения и значений разрешения приведено в табл. 1.4.

Вернемся к рассмотренному выше примеру. Деля общую потенциальную емкость для 325 г силикагеля в колонке на число тарелок, требуемое для соединения, можно оценить размер образца на такой колонке. Так, для смеси двух компонентов с $\alpha=1,3$, каждый с молекулярной массой 250, и $k_1'=2$, которую следует разделить с требуемым разрешением 0,7, в колонку можно ввести образец смеси 1,6 г ($195 \text{ г}/237 \text{ тарелок} = 0,8 \text{ г}$ для компонента 1 и $180/237 = 0,8 \text{ г}$ для компонента 2). Минимальная собственная эффективность колонки должна быть равна $2 \cdot 237 = 474$ тарелки. Это значение легко достижимо при высоких скоростях потока, с использованием крупных частиц насадки, при разумной стоимости и относительно низком сопротивлении колонки. Нагрузки для компонентов, имеющих другие коэффициенты разделения и размеры колонок, приведены в табл. 1.5. Следует помнить, что с изменением типа соединения или адсорбента эти числа будут меняться. Однако эксперименты последнего десятилетия показали, что эти положения являются хорошей отправной точкой для оценки нагрузки в препаративной

Таблица 1.5 Нагрузка (г компонента) для колонок различного диаметра (d_c) при различных коэффициентах разделения

α	Нагрузка по компоненту, г						
	$d_c=0,4$	0,8	1,0	2,5	5,7	8	10 см
10	0,3	1,0	2	10	52	103	161
5	0,1	0,6	1	6	30	60	93
3	0,07	0,3	0,46	2,9	15	29	46
2	0,03	0,1	0,18	1,1	6	11	18
1,7	0,02	0,07	0,1	0,64	3	7	10
1,5	0,01	0,04	0,06	0,36	2	4	6
1,3	0,004	0,016	0,02	0,15	0,8	1,5	2,4
1,2	0,002	0,008	0,01	0,07	0,4	0,7	1,1
1,1	0,0005	0,002	0,003	0,02	0,1	0,2	0,3
1,05	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,025	0,05	0,08
	1,6	6,4	10	63	325	640	1000 г

Масса насадки в каждой колонке

Другие условия $k'_1=2,0$, $a=16$ (метод касательных, (см рис 1.5))· длина всех колонок 30 см, насадка — силикагель с удельной площадью поверхности 300 м²/г, $R_s=0,7$ Для характеристики соединений см. текст

адсорбционной ЖХ [66]. Почти всегда эти оценки дают нижнюю границу нагрузки, поэтому, для того чтобы добиться действительно максимального выхода, следует проводить дальнейшие эксперименты при нагрузках, превышающих эти начальные условия.

1.4.3. Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой

1.4.3.1. Нагрузка и α

В разд. 1.3.3 была подчеркнута важность коэффициента разделения α для получения наивысшего возможного разрешения в методе ЖХ. Из данных табл. 1.4 и 1.5 становится ясным чрезвычайно сильное влияние собственной эффективности колонки и нагрузки на разделение. На рис. 1.8 графически представлено соотношение между α и трудностью разделения, которая прямо пропорциональна нагрузке или требованиям к эффективности

Сравнивая три хроматограммы на рис. 1.8 со значением $\alpha = 2$; 1,3 и 1,1 соответственно, можно увидеть, как α сильно влияет на выход. Дополнительное сравнение можно сделать, используя шкалы, показанные наверху рис. 1.8. Например, если путем выбора других неподвижной и подвижной фаз можно

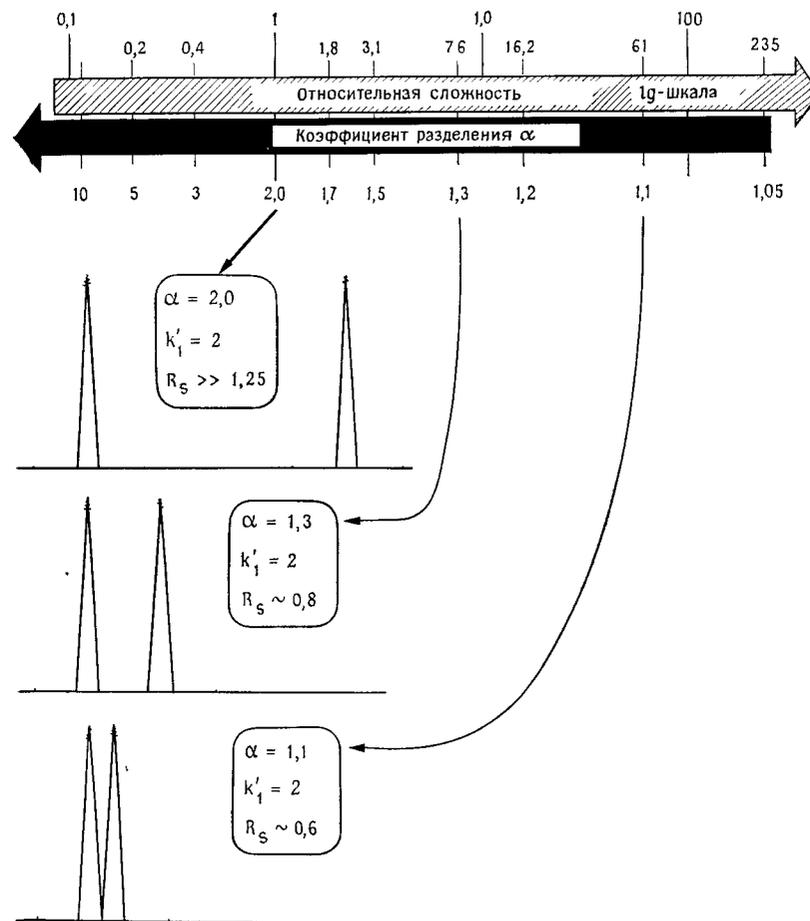


Рис. 1.8 Соотношение между коэффициентом α и сложностью разделения. На трех искусственных хроматограммах треугольники, изображенные сплошными линиями, показывают пики при малых нагрузках, штриховые линии — наблюдаемое разрешение пиков в тех же условиях, но нагрузка увеличена в 10 раз. Приблизительные значения разрешения соответствуют условиям большой нагрузки. Примечание: при иллюстрации этих ЖХ-разделений, для простоты, не учтены искажение формы пика и смещение максимума пика при увеличении нагрузки

увеличить α от 1,05 до 1,2, то нагрузка может быть увеличена примерно в 15 раз. Или при той же нагрузке длину колонки можно уменьшить в той же пропорции, экономия при этом затраты на насадку и растворители и сберегая время, необходимое для завершения разделения. Увеличение α от 1,2 до 2 дает сле-

дующее 15-кратное увеличение в нагрузке, выходе или соответствующую экономию. Большее значение α означает, что можно использовать насадку с частицами большего размера. Такие насадки обычно намного дешевле, работают при меньших проходах (значении ΔP обратно пропорционально квадрату диаметра частицы), т. е. предъявляют меньшие требования к оборудованию (см. разд. 1.7). Таким образом, время, затрачиваемое на увеличение коэффициента разделения α , может окупиться важным преимуществом при разделении в препаративной ЖХ.

1.4.3.2. Нагрузка и эффективность

Из обсуждения в разд. 1.3.2 и 1.4.2 следует, что в препаративной хроматографии используют два типа эффективности: *собственную эффективность колонки*, которая определяется динамическими и гидродинамическими свойствами упакованного слоя, конструкцией аппаратуры, свойствами материала насадки и т. д., *разделительную эффективность*, которая существенно зависит от природы и количества образца и физико-химических характеристик разделительной системы. Число тарелок N используется как мера любого типа эффективности, но первая эффективность обычно определяется при идеальных, а последняя — при реальных условиях. Как отмечено выше, собственная эффективность колонки измеряется при малых нагрузках в условиях, когда изотерма адсорбции или распределения линейна (ср. разд. 1.4.4). Каждая колонка, используемая в препаративной хроматографии, должна иметь собственную эффективность, измеренную в аналитических условиях (малые нагрузки), как можно большую для данной комбинации конструкции колонки и материала насадки. Эмпирически установлено, что длина, или высота, тарелки h в эффективной колонке приблизительно равна удвоенному диаметру частиц (d_p), которыми упакована колонка. Таким образом, колонка длиной 30 см, заполненная насадкой с размером частиц 10 мкм, должна содержать примерно 15 тысяч тарелок в идеальных условиях ($h \approx 2d_p = 2 \cdot 10 \text{ мкм} = 20 \text{ мкм}$ или $0,002 \text{ см}$; $30 \text{ см}/h = 15000$). Частицы размером 100 мкм в той же самой колонке должны давать 1500 тарелок ($30 \text{ см}/(2 \cdot 0,01) = 1500$). Многочисленные факторы, приводящие к уменьшению этой величины для идеальной колонки, показанные на рис. 1.6, рассматриваются в работах [39—47, 50—59] и не будут здесь анализироваться подробно.

Типичные препаративные ЖХ-колонки часто имеют высоты тарелок в пределах от $2d_p$ до $10d_p$. Однако самым главным является следующее: *колонка должна быть выбрана, сконструирована и упакована для проведения требуемого разделения наи-*

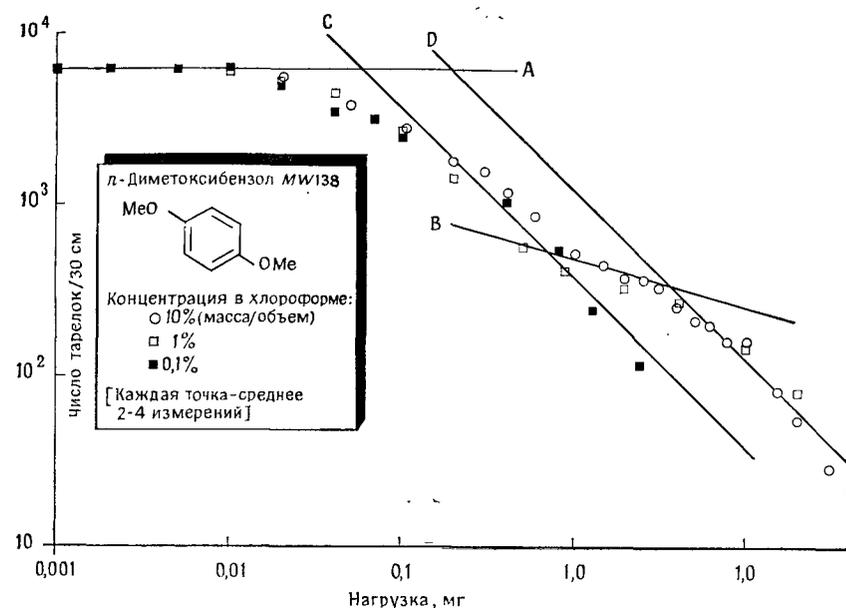


Рис. 1.9. Снижение числа тарелок с увеличением нагрузки при изменении концентрации образцов (оси в логарифмическом масштабе). Колонка: μ -порасил, $d_{\text{внутр}} = 4,2 \text{ мм}$, $l = 30 \text{ см}$; объемная скорость: $2,0 \text{ мл/мин}$; линейная скорость: $0,26 \text{ см/с}$ (метка — гексан); детектор — рефрактометр (РФ).

более эффективным и экономичным из возможных способов. Колонка должна быть настолько эффективна, насколько это возможно при использованном размере частиц и колонки. Разделительную эффективность в противоположность собственной эффективности измеряют при действительных препаративных условиях ЖХ. При больших нагрузках и больших значениях α число эффективных тарелок будет намного меньше, чем собственное число тарелок используемой колонки. Однако, когда α приближается к 1, для достижения разделения нагрузка должна быть уменьшена, и оба типа эффективности будут близки друг к другу. Два типа эффективности иллюстрируются данными, приведенными на рис. 1.9 [66]. В этих экспериментах увеличивали массу тестового соединения, пара-диметоксибензола ($k' = 2$ в хлороформе), вводимого в силикагелевую, заполненную частицами 10 мкм колонку. Собственная эффективность, определенная по точке, в которой линия A пересекается с вертикальной осью, измеренная при скорости потока 2 мл/мин, далекой от оптимального значения, хотя и типичной на практике, превышала 6500 тарелок. Увеличение вводимого количества при-

вело в конце концов к тому, что число эффективных тарелок начало уменьшаться вначале медленно и потом с линейной скоростью, обозначенной линией С (в логарифмической шкале). В соответствии с традиционными понятиями эту колонку следовало бы рассматривать как перегруженную уже при значении примерно 0,02 мг. Однако можно видеть, что скорость потери эффективности все-таки меньше, чем скорость увеличения нагрузки до 0,2 мг, что в 10 раз превышает традиционную перегрузку. И конечно, если коэффициент разделения достаточно высок, можно вводить еще большие количества.

Данные, приведенные на рис. 1.9, позволяют также сопоставить эффект объемной перегрузки с массовой перегрузкой (ср. разд. 1.5.1.1.4 и 1.6.2.1.2). Отметим, что, когда образец вводится с концентрацией 0,1%, измеряемая эффективность при нагрузках выше 0,01 мг (объем 10 мкл) имеет меньшее значение, чем при введении той же массы вещества в растворе большей концентрации. Эффект объема образца, проявляющийся при высоких нагрузках для 1%-ных и 10%-ных растворов, может объяснить плато (линия В) в районе точки перегиба между двумя параллельными линейными областями (линии С и D).

Как отмечалось при обсуждении качественной модели нагрузки в разд. 1.4.2, изменение типа молекул будет сильно влиять на возможную величину нагрузки и разделительную эффективность. Это иллюстрируется данными на рис. 1.10 [66]. Линии А, В, С, D и точки, относящиеся к *para*-диметоксибензолу, идентичны приведенным на рис. 1.9. Заметим, что намного большая по размеру молекула тристеарина с ее тремя полярными эфирными группами, которые могут взаимодействовать с поверхностью силикагеля отдельно или в комбинации, приводит к тому, что та же самая колонка при малых нагрузках имеет *собственную эффективность*, примерно в 8 раз меньшую, чем в случае ароматической молекулы меньшего размера. Тристеарин в этом растворителе имеет также намного большее значение $k'(D_m)$ при малых нагрузках; это значение быстро падает по мере увеличения нагрузки. Выше 10 мг измеряемая эффективность становится весьма ненадежной из-за очень низких значений и нерегулярных форм пиков, но, по-видимому, выходит на уровень плато, аналогичного плато, обозначенного линией В, для молекул меньшего размера. Общая форма кривых (исключая плато) на рис. 1.9 и 1.10 была предсказана Джеймсом Л. Уотерсом в начале 70-х гг. [67] до того, как эти данные были получены экспериментально. Уотерс также предсказал, что при использовании насадок с частицами большего размера, колонка имеет соответственно меньшие значения собственной эффективности при малых нагрузках. Однако эффективность остается постоянной в широком диапазоне нагрузок, и, падая в конце кон-

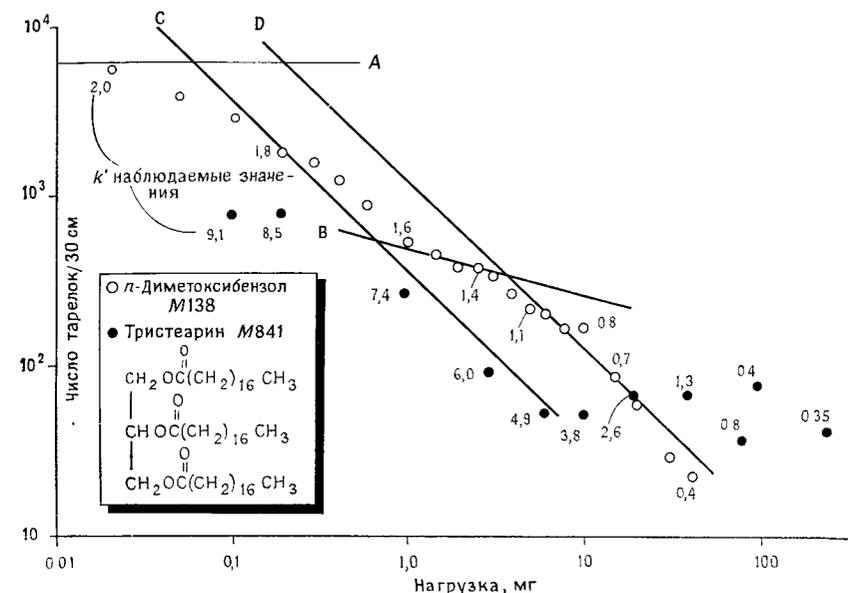


Рис. 1.10. Снижение числа тарелок с увеличением нагрузки для образцов разной молекулярной массы (оси — в логарифмическом масштабе). Концентрация 10% (масса/объем). Остальные условия, как на рис. 1.9.

цов, сближается при прочих равных условиях с эффективностью колонки, заполненной частицами малых размеров. Эксперимент, подтвердивший гипотезу Уотерса, показан на рис. 1.11. Данные для колонки, заполненной десятимикронным μ -порасилом, и линии А, В, С, D аналогичны приведенным на двух предыдущих рисунках. Отметим, что при примерно 10-кратном увеличении размера частиц (до 125 мкм) нагрузка возросла более чем в 100 раз. Это означает, что при проведении трудных разделений больших образцов простых смесей веществ с низкой молекулярной массой следует использовать длинные колонки (или набор колонок и (или) циркуляцию), заполненные частицами больших размеров, а не более короткие колонки, заполненные частицами малых размеров с аналогичной общей собственной эффективностью (хотя и имеющими большую собственную эффективность на метр длины). В 1974 г. этот вывод противоречил обычной в то время практике. Однако более поздние эксперименты других групп авторов подтвердили этот вывод [68—70].

1.4.3.3. Нагрузка и время удерживания

Выход или количество материала, очищенного за единицу времени, является практической целью препаративной ЖХ (см. табл. 1.1). Двумя принципиальными параметрами, определяю-

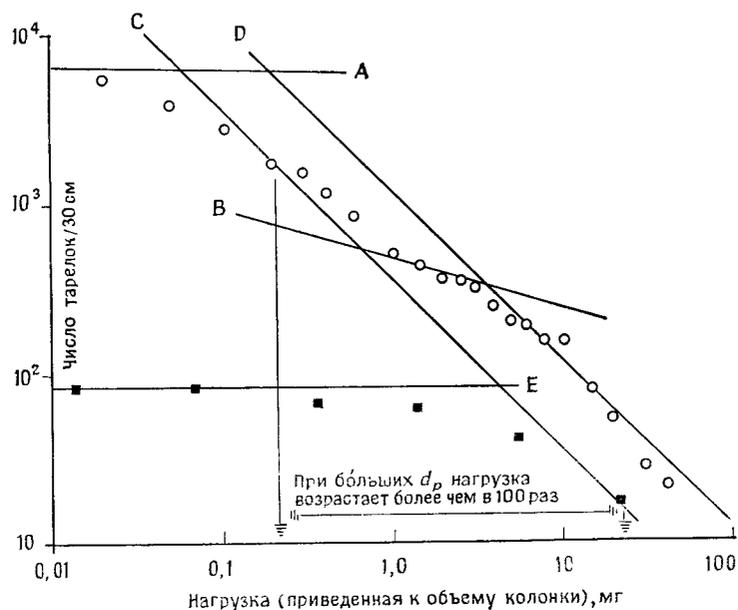


Рис. 1.11. Снижение числа тарелок с увеличением нагрузки для насадок с разным размером частиц. \circ μ -порасил (10 мкм), $d_{\text{внутр}}=4,2$ мм, $l=30$ см (поверхность 325 м²/г), 2 мл/мин (линейная скорость $=0,26$ см/с); \blacksquare порасил А (125 мкм), $d_{\text{внутр}}=7,9$ мм, $l=61$ см (поверхность 325 м²/г), 6 мл/мин (линейная скорость $=0,26$ см/с). *n*-Диметоксibenзол, 10% в хлороформе, другие условия см. на рис. 1.9.

щими выход в данном разделении, служат нагрузка и время. Подобно многим другим переменным, которые рассматривались до сих пор, они являются взаимозависимыми с точки зрения компромисса, необходимого при оптимизации системы разделения (рис. 1.2). Если скорость потока подвижной фазы (объем в единицу времени) и объем системы остаются постоянными в ходе разделения, то, как было показано в разд. 1.3.1 и проиллюстрировано рис. 1.4, объем можно выразить непосредственно через время удерживания. Важно отметить вышеуказанное условие, так как, например, может изменяться подача насоса или сжиматься или набухать (как ионообменные слои при градиенте соли) слои в хроматографической колонке. В любом случае в крупномасштабной препаративной ЖХ время, необходимое для осуществления разделения и полного элюирования всех интересующих нас компонентов и приготовления колонки для последующего использования (путем промывания, установления равновесия и так далее), вносит вклад по крайней мере в два

важных экономических фактора: стоимость рабочей силы и затраты на растворитель.

Время разделения в свою очередь определяется большим числом переменных, начиная с термодинамических свойств ЖХ-системы. Коэффициент распределения растворенных веществ между подвижной и неподвижной фазами k' определяет отношение объема ко времени, требуемому для элюирования этого растворенного вещества из хроматографического слоя (см. разд. 1.3.1). Хотя меньшие значения k' позволяют увеличивать нагрузку в адсорбционной ЖХ (разд. 1.4.2), увеличение k' примерно до 5 может обеспечить увеличение разрешения (разд. 1.3.3). При оптимизации коэффициента разделения α комбинацию подвижной и неподвижной фаз прежде всего выбирают так, чтобы сделать максимальным отношение коэффициентов k' , и затем стремятся установить наименьшее значение k' , которое позволяет работать с хорошей нагрузкой при приемлемом разрешении, поскольку это минимизирует расход растворителя и общее время разделения. К сожалению, во многих случаях трудного разделения ($\alpha < 1,3$) увеличение времени разделения и расхода растворителя являются обычной платой за достижение требуемого результата. При заданном количестве образца разделение можно выполнить или путем его повторения несколько раз с использованием малой нагрузки на колонке малого объема (высокая эффективность на единицу длины), или за один пробег при полной нагрузке на колонке большого объема (та же общая эффективность, но большая емкость, см. разд. 1.4.3.2). Даже в последнем случае, который обычно оптимален, может потребоваться большее время для того, чтобы разделить необходимое количество образца.

Скорость потока — переменная процесса, которая в наибольшей степени влияет на время. Чтобы сделать разделение как можно более быстрым, в случае легких разделений ($\alpha \geq 2$) выбирают высокие скорости потока, работая в пределах противодавления ΔP , допускаемого системой, и практических возможностей используемого растворителя. При меньших α иногда выгодно уменьшать скорость потока, чтобы поддерживать оптимальный компромисс между размерами колонки, нагрузкой и эффективностью, необходимой для получения требуемой степени разрешения и выделения вещества. Таким образом, выбор удельной скорости потока обусловлен непосредственно термодинамикой разделения (α и время удерживания). Другие, связанные со скоростью потока вопросы, влияющие на время и масштаб препаративного ЖХ-разделения, будут рассмотрены в разд. 1.5.1.

Следует подчеркнуть один важный момент. *Возможности совре-
временных препаративных ЖХ-систем делают не только жела-*

тельными, но и возможным выполнение препаративных разделений в той же временной шкале, в которой проводят соответствующие аналитические ЖХ-разделения. Именно эта скорость наряду с большими нагрузками и способностью разделения (селективность и эффективность) делают современную препаративную хроматографию такой внушительной (см. разд. 1.1). Сегодня проблемой для хроматографиста является не просто выполнение большей работы за данное время, но и отыскание путей решения сложных задач, которые не могли быть решены до этого; выделение прежде неизвестных лабильных соединений, ускорение или упрощение сложных синтезов, совершенствование полученных продуктов, открытие новых областей исследований и т. д.

1.4.3.4. Нагрузка в циркуляционном методе

Циркуляция служит приемом, который используют в препаративной ЖХ для того, чтобы увеличить длину хроматографического слоя и избежать затрат на покупку и использование длинных колонок или дополнительных секций для колонок. На практике этого достигают путем добавления крана в гидравлическую систему, который позволяет направлять элюент или некоторые его определенные части из выхода колонки назад, на вход колонки (см. разд. 1.7.2.2). Сложные образцы, особенно содержащие сильноудерживающиеся компоненты, для элюирования которых может потребоваться ступенчатый или непрерывный градиент, обычно не подходят для использования метода циркуляции. Образцы такого типа лучше всего фракционировать на ранних стадиях методами, позволяющими разделять соединения по классам, как отмечено в разд. 1.2.3. Затем на более поздних стадиях выделения очень мощным средством разделения соединений может быть метод циркуляционной ЖХ, позволяющей проводить разделение при низких α ($< 1,3$), когда в образце содержится много соединений, присутствующих в небольших количествах.

Впечатляющей иллюстрацией возможности такого разделения, оказавшегося необходимым при синтезе витамина В₁₂, стало разделение, проведенное группой профессора Вудварда [71]. На одной из стадий синтеза было необходимо отделить промежуточный эфир кобириновой кислоты, показанный на рис. 1.12, от ее нового аналога, отличающегося от нормального эфира только конфигурацией в положении 13. ЖХ с рециклом на силикагеле позволила разделить два эписмера до нулевой линии в результате 7 проходов через трехметровую колонку, что эквивалентно одному проходу через колонку длиной 21 м.

Второй пример возможности использования циркуляции для

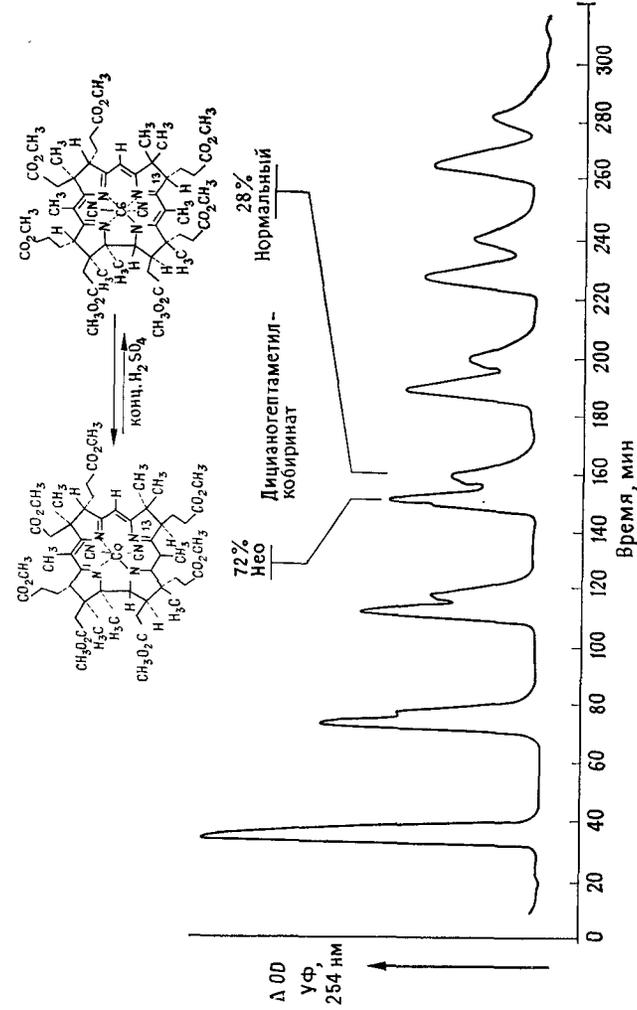


Рис. 1.12. Один из первых впечатляющих примеров использования циркуляции в современной ЖХ: разделение с помощью циркуляционной ЖХ *n*-нормальных) и *нео*-дидангептаметилкобиринатов. Колонка: 5 секций, соединенных последовательно, общая длина 3,05 м (секция: $d_{\text{внутр}} = 3,2$ мм, $l = 61$ см); кремнеземная пористая насадка корасил II, $d_p = 37-75$ мкм; подвижная фаза: гексан/ацетат/изопропанол/метанол — HCN (220 : 60 : 10 : 10), объемная скорость 1 мл/мин [71].

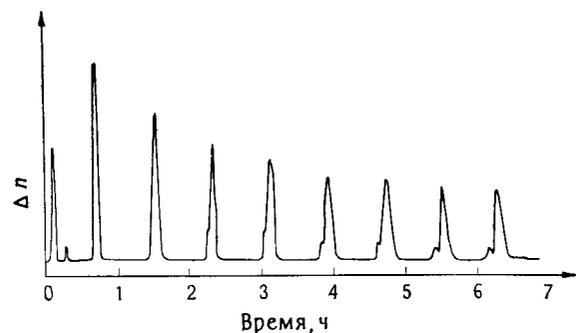


Рис. 1.13. Разделение с помощью циркуляционной ЖХ эпимеров с чрезвычайно малым α . Колонка: μ -порасил; две колонки ($d_{\text{внутр}}=3,9$ мм, $l=30$ см), включенные последовательно, общая длина 60 см; образец: 26-гидроксихолестерол-3,26-диацетат из аорты человека, 25S-эпимер менее полярен и элюируется впереди более полярного 25R-эпимера; детектор — (РФ) [72].

разделения близких соединений со значением α , близким к единице, показан на рис. 1.13. После ацетилирования 26-гидроксихолестерола (2 мг), выделенного из ткани аорты человека, 25S-эпимер (10% смеси) 26-гидроксихолестерол-3,26-диацетата был отделен от 25R-эпимера за 7 проходов через пару колонок длиной по 30 см, заполненных силикагелем (10 мкм) [72]. Выделению 25S-эпимера, минорного компонента в смеси, способствовала его более низкая полярность, благодаря чему он элюировался раньше. Если бы порядок элюирования был обратим, то, чтобы его полностью отделить от негауссова хвоста пика преимущественно присутствующего 25R-эпимера, для элюирования 25S-эпимера потребовалось бы большее число проходов.

В двух приведенных примерах трудность разделения не позволяла использовать большие нагрузки, и время выделения измерялось часами. Очевидно, исследователи в каждом случае были удовлетворены достигнутым успехом разделения пары соединений столь одинаковой структуры. Для достижения их экспериментальной цели не требовалось дальнейших попыток оптимизировать селективность, время удерживания или выход.

Помимо преимущества циркуляции в тех случаях, когда необходимо иметь дело с очень трудными разделениями, она потенциально (особенно при $\alpha \geq 1,3$) позволяет значительно увеличивать нагрузку на колонку при хорошем разрешении и выделять компоненты со значительной экономией растворителя, стоимости и времени разделения. Это проиллюстрировано модельными экспериментами, представленными на рис. 1.14 [73]. При умеренной нагрузке двух тестовых компонентов (100 мг каждого, $\alpha=1,3$) на колонке, заполненной крупными частицами,

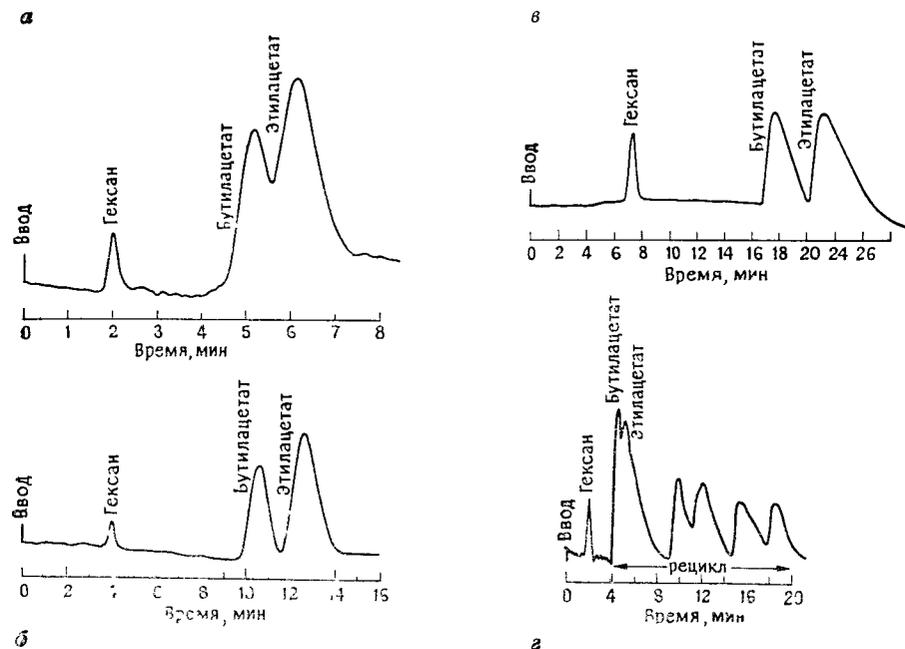


Рис. 1.14 (а—г). Демонстрация возможностей увеличения выхода и уменьшения расхода растворителя в циркуляционной препаративной ЖХ, а также влияния на разделение длины колонки и нагрузки.

Рис	Длина колонки*, см	Нагрузка**, г	Объем образца, мл	Объемная скорость, мл/мин	Выход, г/мин	Расход растворителя, л	R_s (оценка)
1.14а	30	0,21	10	250	0,028	1,9	0,8
1.14б	60	0,21	10	250	0,014	3,6	1,3
1.14в	120	2,1	100	300	0,08	8,1	1,3
1.14г	30	2,1	100	300	0,1	3,0	1,2***

Другие условия. * Колонка: препак-500 силикагелевый картридж ($d_{\text{внутр}}=5,7$ см, $l=30$ см, мертвый объем ~ 500 мл, $d_p \approx 75$ мкм), одна или несколько колонок, включенных последовательно; ** образец: стандартная смесь гексана (1% масса/объем), бутилацетата и этилацетата (каждый 10% масса/объем, $\alpha=1,3$) в подвижной фазе (метиленхлорид); детектор — РФ; *** разрешение оценено в третьем цикле при сравнении со стандартными кривыми [60], хроматограммы из [73].

получили разрешение 0,8 (рис. 1.14, а). Удваивание длины колонки до 60 см путем добавления последовательно другой колонки дало разделение почти до нулевой линии ($R_s=1,3$) при той же нагрузке (рис. 1.14, б). Десятикратное увеличение на-



Рис. 1.15 Использование метода циркуляции с отбором пика.

высоких объемных скоростях потока шкала времени эквивалентна шкале в аналитическом ЖХ-разделении.

Еще более эффективным средством циркуляционной ЖХ является метод вырезания (отбора) пика. В этом методе переключающий кран используется в течение каждого прохода: а) для того чтобы направлять ненужные компоненты в отход, сброс; б) для сбора части чистых компонентов на фронте и хвосте пиков; в) для рециркуляции остающихся неп полностью разделенных смесей образца обратно в колонку.

Идея метода демонстрируется на рис. 1.15 (см. также разд. 1.3.4 и рис. 1.7). На первом проходе может быть собрано с высокой степенью чистоты большее количество компонента 1, тогда как количество очищенного компонента 2, будет меньше, чем в идеальном случае, если компонент 1 присутствует в более высокой концентрации или его хвост значительно отличается от формы идеального гауссова пика. Величина хвостовой части пика будет зависеть от нагрузки и используемой ЖХ-системы (см. разд. 1.4.4).

Выгоды от циркуляции с отбором пика показаны на рис. 1.16 [74]. Поскольку величина нагрузки при каждом последующем проходе за счет отбора (вырезания) уменьшается, эффективность разделения колонки значительно возрастает, причем уменьшается число циклов, необходимых для разделения и полного выделения всего образца. В противном случае 6-кратная циркуляция в системе с малой нагрузкой также может очистить все 3 г образца, но производительность будет в 3 раза меньше, а расход растворителя примерно в 4 раза больше.

Циркуляция с отбором может быть также использована для улучшения очень трудных разделений. Разделение, показанное на рис. 1.17, было выполнено на колонке, состоящей из трех секций (общая длина 2,7 м), заполненной 37—75 мкм-сорбен-

грузки (1 г удерживаемого компонента) и введение дополнительной колонки длиной 60 см (общая длина 120 см) также дало разделение почти до нулевой линии за один проход (рис. 1.14, в). Однако три прохода через одну колонку 30 см позволили получить примерно такое же разделение за меньшее время и израсходовать примерно втрое меньше растворителя (рис. 1.14, г). Отметим также, что в колонке большего диаметра при более

том с привитой обращенной фазой. Это соответствует рекомендациям разд. 1.4.3.2 — более длинная колонка, заполненная частицами большего размера, использована для того, чтобы увеличить емкость и эффективность разделения. В свою очередь как емкость, так и эффективность были далее увеличены с помощью циркуляции с отбором пика. 300 мг трех изомеров положения (1, 2, 3), продуктов расщепления дегидроизоандростерон-17-тозилгидразона по Бамфорду-Стивенсу, были таким образом выделены и идентифицированы с помощью ЯМР и масс-спектрологии [75].

Затем 100 мг первого изомера, который, как предполагалось на основе данных ТСХ и аналитической ЖХ, должен быть продуктом побочного расщепления цепи 2-ариланалога (20S)-20-гидроксистерола при инкубации в лабораторных условиях митохондрии надпочечной железы, были смешаны с неизвестным продуктом инкубации, имевшим радиоактивную метку. Эта смесь была хроматографирована в селективной жидко-жидкостной распределительной системе и затем рециркулирована в системе, показанной на рис. 1.17. Выделение компонента 1 и дальнейшая кристаллизация до постоянной удельной активности позволила сделать серьезные предположения, что неизвестное соединение идентично 17-метил-18-норандроста-5,13(17)-диен-3β-

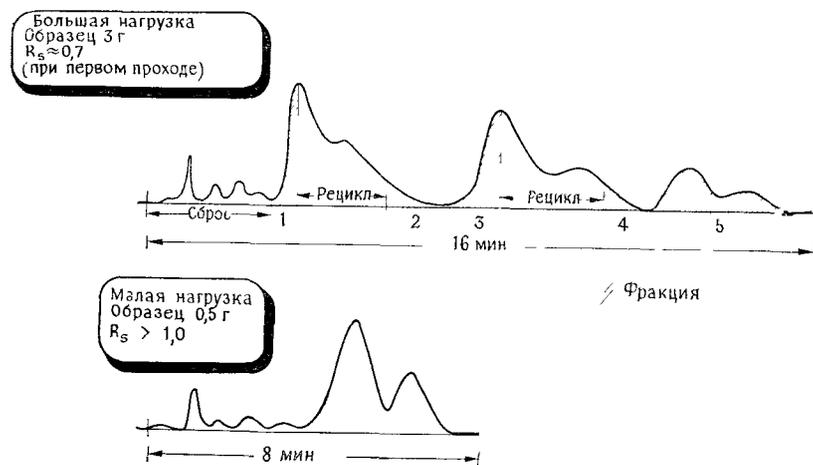


Рис. 1.16. Увеличение выхода при использовании метода циркуляций с отбором пика. Колонка: $d_{\text{внутр}} \sim 5,7$ см, $l = 30$ см; объемная скорость: 500 мл/мин. Опыт с большой нагрузкой: образец 3 г, время разделения: 16 мин, расход растворителя: 6,3 л, выход 0,19 г/мин. Первый цикл: $R_s \approx 0,7$. Опыт с малой нагрузкой: образец: 0,5 г (6 вводов для разделения всего образца 3 г), время разделения: 48 мин (для 3,0 г), расход растворителя: 24 л (для 3,0 г), выход: 0,06 г/мин (для 3,0 г), $R_s > 1$ [74].

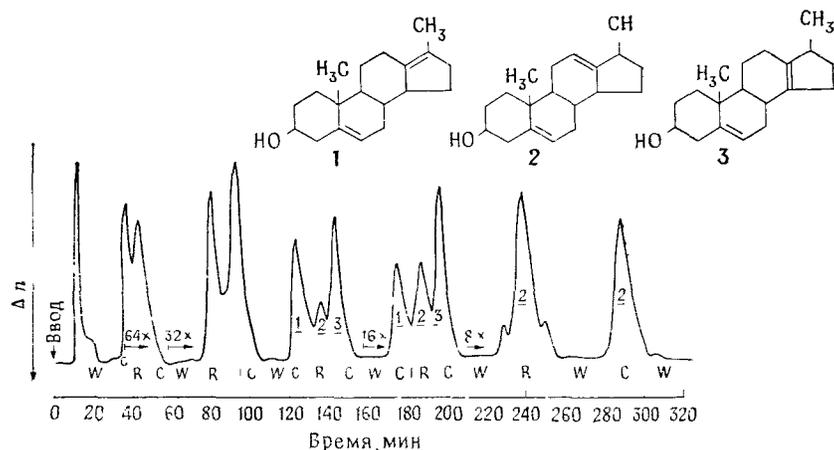


Рис. 1.17. Увеличение емкости по образцу и разделительной эффективности в препаративной ЖХ при использовании циркуляции с отбором пика при разделении очень сложной смеси изомеров положения 1, 2, 3. Колонка: обращено-фазная насадка бондапак C_{18} — порасил В, $d_p = 37-75$ мкм, три последовательно соединенные колонки ($d_{\text{внутр}} = 8$ мм, $l = 91,5$ см), общая длина — 2,75 м; объемная скорость 9,5 мл/мин; подвижная фаза — ацетонитрил/вода (9:1); образец — 300 мг смеси продуктов расщепления дегидроизоандростерон-17-тозилгидразона по Бамфорду — Стенвенсу; детектор — РФ (детектирование в потоке), чувствительность изменяли, как указано на рисунке, от 128× до 64×, 32× и т. д.; W — фракции на сброс; C — собираемые фракции; R — фракции на рециркуляцию [75].

олу (соединение 1). Это было окончательно подтверждено масс-спектрометрией образца (1 мг), выделенного из продукта инкубации в больших масштабах [75]. Таким образом, препаративная циркуляционная ЖХ с отбором пика была использована здесь в двух направлениях: во-первых, для очистки синтетических стандартов с целью объяснения структуры и, во-вторых, для подтверждения наряду с другими хроматографическими разделениями и аналитическими методами (метод обратного изотопного разбавления, масс-спектрометрия) идентичности продукта биологического превращения, выделенного на фемтамольном уровне.

Приведенные для иллюстрации пять примеров ясно показывают, что при использовании в необходимых случаях циркуляция в системах для препаративной ЖХ имеет ряд преимуществ: высокий выход, малое время разделения, малые затраты растворителя, минимальные затраты на колонку. Циркуляцию лучше всего использовать для смесей, содержащих только несколько соединений, близких по свойствам [76—85]. Сильно удерживаемые соединения должны быть предварительно удалены с по-

мощью других грубых методов разделения (см. разд. 1.23, рис. 1.3). Некоторые дополнительные практические соображения по циркуляции будут рассмотрены в разд. 1.7.2. Теоретические трактовки, которые обосновывают выгоду циркуляции, опубликованы в других работах [86, 87].

1.4.4. Влияние нагрузки на форму пика

Как говорится, «лучше один раз увидеть, чем сто раз услышать». Для хроматографиста графическое представление концентрации элюента сигналом детектора (хроматограмма) может дать прямое видимое представление о состоянии системы и природе процесса разделения.

Выше уже отмечалось, что препаративная ЖХ выполняется при условии больших нагрузок, результатом которых являются пики на хроматограммах, форма которых далека от идеальной гауссовой, показанной на рис. 1.5. Часто искажение пика может быть связано с большой величиной образца. Однако имеются другие вредные причины искажения формы пика. Сведения о них часто можно получить из сочетания очевидных (хроматограмма) и неочевидных (знание образца и ЖХ-системы) данных. Прежде чем рассматривать другие возможные причины искажения формы пиков (разд. 1.4.4.2), рассмотрим влияние большой нагрузки на процесс адсорбции.

1.4.4.1. Изменение формы пика с увеличением нагрузки

В формуле (1.1) в разд. 1.3.1 количество образца в неподвижной или подвижной фазе можно выразить как произведение концентрации образца (C_s или C_m соответственно) и объема фазы (V_s или V_m соответственно):

$$D_m = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K_D \cdot \frac{V_s}{V_m} = k' \quad (1.9)$$

Массовый коэффициент распределения (D_m или k') связан с отношением объемов неподвижной и подвижной фаз с помощью константы распределения K_D (которую называют также коэффициентом распределения). График C_s зависимости от C_m для данного соединения и адсорбционной системы при условиях равновесия при постоянной температуре и давлении должен давать прямую линию с наклоном, равным K_D (рис. 1.18). Кривая, показанная на рис. 1.18, представляющая изотерму Ленгмюра [88, 89], отклоняется от линейности в точке, где адсорбционная емкость по образцу неподвижной фазы или растворимость образца в подвижной фазе становится ограниченной. В первом случае изотерма становится выпуклой, в последнем —

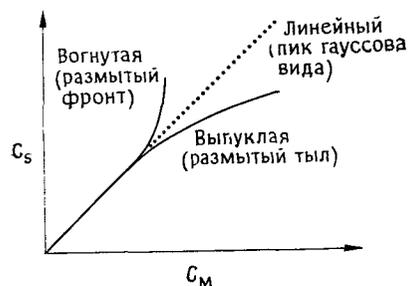


Рис. 1.18. Изотермы Ленгмюра (описание соответствующих форм хроматографических пиков приведены в скобках).

пользованием треугольника, определенного нулевой линией и касательными к каждой стороне, форма пика при низких концентрациях вещества аналогична равнобедренному треугольнику. При росте концентрации в нелинейной области изотермы, пик постепенно принимает форму прямоугольного треугольника. В этой ситуации, поскольку K_D уменьшается, молекулы в центре полосы стремятся дольше оставаться в подвижной фазе и мигрируют быстрее, чем молекулы при низкой концентрации на краях полосы; при этом фронт обостряется и задний конец пика расширяется. Вертикальная сторона почти прямоугольного треугольника элюирует первой при кажущемся k' , много меньшем действительного k' , рассчитанного из положения максимума пика в условиях малой нагрузки. В случае вогнутых изотерм происходит обратная ситуация: фронт пика становится размытым, а хвост — резким (форма прямоугольного треугольника обратная). Важно отметить, что площадь пика, но не его высота, пропорциональна концентрации в нелинейной области, если отклик детектора остается линейным. Однако если необходимо делать количественные расчеты, основанные на сигнале детектора, то в соответствующей области концентраций должна быть проверена линейность отклика от концентрации.

Размытые хвосты пиков и их перекрывание могут вызвать сомнение у хроматографистов, использующих аналитическую ЖХ: можно ли вообще выделить чистые компоненты при разделении в условиях нелинейных изотерм. Примеры успешных разделений приведены на рис. 1.14, г, 1.16 и 1.17, где для успешных разделений была использована циркуляционная хроматография с отбором пика. Но до тех пор, пока не будут получены такие разделения, остаются сомнения в возможности достижения требуемых результатов, что может вести к стремлению использовать чрезмерно заниженные нагрузки и скорости потока раст-

имеет вогнутую форму. Выпуклая изотерма является наиболее общим случаем в адсорбционной ЖХ, и пик в этом случае имеет хвост при более высоких концентрациях образца. Напротив, вогнутые изотермы имеют размытый фронт хроматографического пика.

Размывание задней части пика, обусловленное выпуклой изотермой, начинается в вершине и продолжается до нулевой линии. Как показано схематически на рис. 1.19 с ис-

ворителей, что в свою очередь значительно снизит выход в preparативных разделениях.

Эксперимент, представленный на рис. 1.20 [90], показывает, что в действительности происходит в процессе preparативного разделения с большими нагрузками. (Понимание этой ситуации должно успокоить и вселить уверенность в успешном preparативном ЖХ-разделении при больших нагрузках.) 14,4 г смеси пропилпарабена (А) и бутилпарабена (В) были разделены менее чем за 11 мин, но с очень небольшим кажущимся разделением, на которое указывало легкое плечо на задней стороне пика с широким хвостом (непоказанного на рис. 1.20) Весь элюент из колонки был собран в фракции по 10 мл. Аликвоты из каждой фракции были проанализированы на содержание парабенатов с использованием обращенно-фазной аналитической жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. На рис. 1.20 построен график УФ-поглощения отдельных компонентов каждой фракции, показывающий индивидуальные, перекрывающиеся концентрационные профили в зависимости от объема элюирования. Штриховые кривые отражают общий процент каждого компонента, элюированного из колонки.

Анализ данных на рис. 1.20 показывает, что 40% пропилпарабена (компонент А, 2,8 г) могут быть собраны в чистом виде (>99%) путем отбора фронта пика до объема, равного примерно 2,3 мертвых объемов, и 20% всего количества бутилпарабена, введенного в колонку (компонент В, 1,4 г), также можно выделить с чистотой более 99% из хвоста пика, начиная с объема элюирования, большего чем 3,5 мертвых объема. Если бы часть пика в объеме, где пики перекрываются (от 2,3 до 3,5 мертвого объема), была рециркулирована, можно было бы собрать дополнительно таким же образом чистый материал. При второй циркуляции принять решение о том, где собирать фракции, было бы проще. Уменьшение на 30% нагрузки и возросшая эффективная длина колонки значительно улучшили бы разрешение (от менее чем 0,6 до примерно 0,8). Появился бы заметный минимум между центрами пиков. Положим, достаточной является 95%-ная чистота, тогда 55% А и 65% В можно собрать с



Рис. 1.19. Представление (с помощью треугольников) изменения формы полосы с увеличением нагрузки.

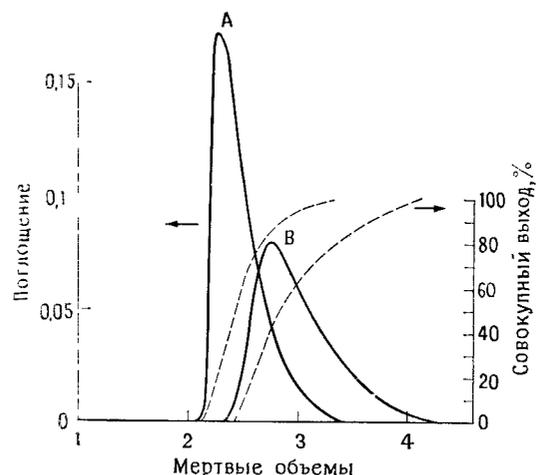


Рис. 1.20. Действительные профили концентрации препаративного разделения параенов при большой нагрузке и минимальном видимом разделении. Образец: А — пропилпарабен, В — бутилпарабен; введенный образец — 7,2 г А и 7,2 г В, растворенные в 180 мл подвижной фазы; колонка — картридж C_{18} препак-500 ($d_{внз, г\ddot{u}}=5,7$ см, $l=30$ см); подвижная фаза: метанол/вода (70:3 по объему); объемная скорость: 200 мл/мин (один мертвый объем/2,5 мин); температура комнатная; объем отбираемых фракций: 10 мл

этой степени чистоты при однократном разделении. Возможно, эти количества оказались бы достаточными для соответствующих целей; в этом случае область смешанных пиков могла бы быть отброшенной. В противном случае циркуляция смешанной части с отбором пика позволила бы полностью извлечь компоненты введенного образца с требуемой чистотой, даже если бы не все разделенные части А и В были удалены при первом и втором цикле.

Рис. 1.20 иллюстрирует также важное явление, которое помогает успешному препаративному разделению при больших нагрузках, — *фронтальное вытеснение*. Если за компонентом образца, когда он проходит через слой хроматографической колонки, следует высокая концентрация сильнее удерживающего соединения, то молекулы последнего будут конкурировать и вытеснять первый компонент с адсорбционных мест. Если концентрация достаточно высока, то вытеснение вторым компонентом может стать даже более важным, чем десорбция, обусловленная молекулами подвижной фазы. В любом случае это проявляется в обострении или сужении зоны компонента, элюируемого первым, и увеличении количества этого компонента, которое может быть отобрано в чистом виде из неполностью разделенной смеси. Поэтому разделительную систему лучше

всего выбрать так, чтобы *требуемый компонент элюировался первым, особенно если он присутствует в количествах, сравнительно малых по сравнению с потенциально вытесняющим соединением*. Обсуждение фронтального вытеснения как метода разделения материалов, в частности на препаративном уровне, выходит за рамки этой главы [91, 92].

Повторим некоторые ключевые моменты, которые следуют из нашего обсуждения формы пика в хроматографической препаративной системе при больших нагрузках:

□ Используйте высокие концентрации растворенного вещества, присутствующего в резком фронте пика с размытым тылом, путем отбора и сбора возможно большего количества чистого компонента из этой области.

□ Попытайтесь выбрать такую комбинацию неподвижной и подвижной фаз, при которой требуемый компонент в смеси будет элюироваться первым, особенно если он присутствует во много меньших концентрациях.

□ Используйте, если возможно, метод циркуляции с отбором пика для полного выделения компонентов образца с требуемым уровнем чистоты.

□ Все эти рекомендации наиболее целесообразны, при условии что α оптимизировано для получения наибольшего выхода.

1.4.4.2. Дополнительные причины искажения формы гауссова пика

Как было отмечено в начале разд. 1.4.4, на искажение формы гауссова пика помимо больших нагрузок могут влиять другие причины. Некоторые из них приведены на рис. 1.21, где представлены пики различной формы. Как указывалось выше, пик 1 является результатом большой нагрузки при выпуклой нелинейной изотерме адсорбции. Аналогичную форму в зеркальном изображении имел бы пик для вогнутой изотермы. Такая форма пика является закономерной, если в препаративной ЖХ стремятся получить максимальный выход.

Пик 2 имеет более или менее симметричную форму, обычную в аналитической ЖХ в случаях небольших нагрузок для компонентов с линейной изотермой адсорбции. Если такой пик встречается в препаративной ЖХ при чувствительности детектора, установленной для больших нагрузок, то это может указывать на присутствие в малых концентрациях компонентов другой структуры, имеющих чрезвычайно сильный отклик детектора, не характерный для компонентов других типов, присутствующих в смеси.

Пик 3 имеет почти нормальный вид, за исключением выраженного хвоста, начинающегося на задней части пика вблизи

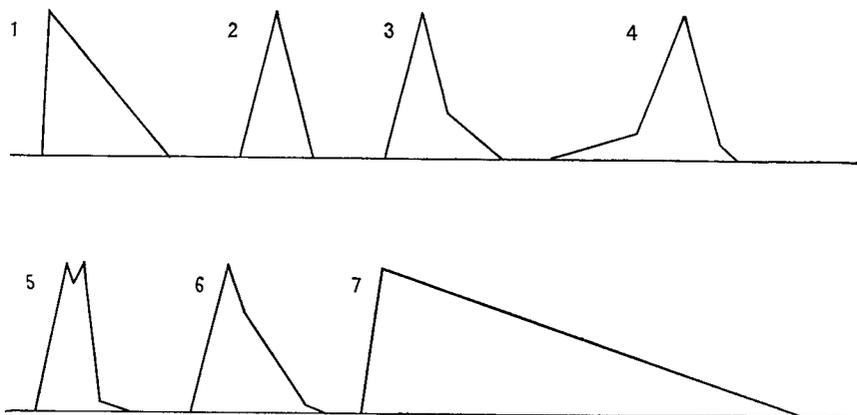


Рис. 1.21. Форма пика как визуальный указатель природы процесса разделения и состояния системы. 1 — нелинейная форма, 2 — нормальный пик, 3 — смешанный вид, 4 — плохая растворимость в подвижной фазе, 5 — дефект ввода, 6 — два растворенных вещества, 7 — неполное равновесие.

нулевой линии. Это характерно для соединений, которые имеют сильные взаимодействия различного типа с неподвижной фазой, например соединений основного характера на силикагеле в нормально-фазной системе растворителей. Возможно, в зависимости от pH, состава растворителя или температуры компонент существует в двух или более формах, одна из которых является основной, например анионная и нейтральная формы органических кислот, аномеры моносахаридов и т. д. Причиной может быть сложный механизм разделения в условиях конкуренции, например когда одновременно происходят жидко-жидкостное распределение и адсорбция. Возможно, разделение осложнено предварительно недетектируемым изменением части неподвижной фазы, которое ведет к гетерогенному характеру взаимодействия растворенных веществ, как, например, в случае частичного гидролиза привитой фазы на силикагеле, приводящего к возникновению гидрофильных мест на гидрофобной поверхности.

Пик 4 выглядит зеркальным изображением типа 3. Такая форма пика обычно указывает, что некоторые или все растворенные соединения смеси ограничено растворимы в подвижной фазе. Размывание на передней части такого пика может указывать на то, что образец дал осадок на входе в хроматографический слой и медленно растворяется. В таких случаях разделение обычно очень плохое. Возможно, такой образец необходимо растворить в другом растворителе, который имеет большее сродство и лучше растворяет образец, но не препятствует вводу соответствующего количества образца в разделитель-

ную систему и не ухудшает разрешение пиков (см. разд. 1.6.2.2.6).

Пик 5: такая форма пика обычно вызвана техническими причинами. Кажущееся неполное разделение двух компонентов может быть фактически результатом неправильного введения пробы, неправильной конструкции системы ввода пробы или распределителя на входе в колонку, в результате чего образец вводится в хроматографический слой двумя различными порциями. Другой возможной причиной является наличие дефектов в колонке (пустые объемы или каналы), которые могут приводить к разделению образца на две или более частей. В этом случае колонку следует испытать на собственную эффективность в условиях низкой нагрузки. В случае найденного дефекта ее следует переупаковать или заменить.

Пик 6: на задней или передней стороне пика имеется участок с другим наклоном. Обычно это служит предупреждением того, что пик содержит полностью разделенные компоненты. В таких случаях можно увеличить возможность выделения обоих компонентов этой смеси, используя циркуляцию с отбором пика, более длинную или более эффективную колонку, уменьшая величину нагрузки. Однако лучше всего провести дальнейшую оптимизацию разделительной системы, добиваясь максимального α .

Пик 7 наиболее часто встречается при использовании рефрактометрического детектора в жидко-жидкостной распределительной хроматографии. В этом случае компонент, элюируемый в виде относительно узкого пика с указанной формой фронта имеет заднюю часть, замаскированную продолжительным дрейфом нулевой линии. Это связано с тем, что компонент образца нарушает равновесие между подвижной и неподвижной жидкими фазами, существовавшее до его появления в колонке. Детекторы на основе дифференциальных рефрактометров очень чувствительны к малейшим изменениям в составе растворителя и, таким образом, отслеживают возвращение разделительной системы к равновесным условиям, соответствующим нулевой линии. В этом случае следует собирать фракции в различных частях пика и проверять их на присутствие образца. В тех случаях когда в задних фракциях отсутствует образец, даже если сигнал детектора не вернулся к нулевой линии, разделение закончено и пробег может быть закончен с целью экономии растворителя и времени.

В заключение следует сказать, что негауссово размывание хроматографических пиков в препаративной адсорбционной ЖХ обычно является результатом больших нагрузок в нелинейной области изотермы адсорбции. Однако существует ряд других причин отклонения формы пика от симметричной, которые указывают на то, что имеются проблемы в самой хроматографиче-

ской системе и в нее следует внести коррективы. Развивая методы распознавания таких ситуаций, мы увеличиваем возможность проведения успешных препаративных разделений и быстрой оптимизации оборудования и условий разделения для получения максимального выхода и выгод. Если даже формалика не вызывает сомнений, целесообразно собрать фракцию в процессе разделения. Затем каждую фракцию можно исследовать с помощью аналитической ЖХ, используя систему с теми же подвижной и неподвижной фазами для определения того, что произошло. Затем подходящие фракции могут быть объединены или разделены в зависимости от необходимости. *Препаративная ЖХ дает больше возможности комбинировать малые фракции элюата, чтобы не перерабатывать повторно большие фракции, в которых произошло непреднамеренное повторное смешение разделенных компонентов в процессе сбора образца.*

1.5. Масштабирование разделения

Стадии схемы разделения показаны на рис. 1.3 и рассмотрены в разд. 1.2.3. Прежде чем переходить к крупномасштабному препаративному разделению, связанному с затратами на материал и рабочую силу, разделение, если это вообще возможно, следует предварительно оптимизировать и испытать в малом масштабе. Наилучшую методологию для этих целей дает аналитическая ЖХ. В некоторых ситуациях может быть также с успехом использована тонкослойная хроматография (ТСХ). Для правильного последующего масштабирования система малого масштаба должна иметь как можно больше общих параметров с системой большего масштаба, которая будет использована. Соответствие параметров особенно важно в распределительной и градиентной хроматографии. Оно несколько менее строго в случае простых разделений с помощью адсорбционной хроматографии.

1.5.1. Масштабирование на основе аналитической ЖХ

Аналитическая хроматография является наилучшим средством масштабирования, поскольку она дает наилучшую возможность имитировать условия крупномасштабного разделения контролируемым образом. Однако в этом отношении она не всегда совершенна.

1.5.1.1. Общие соображения

1.5.1.1.1. Химические свойства материала насадки. В идеале не должно быть разницы между насадками, используемыми в аналитической и препаративной ЖХ, за исключением, возможно,

размера частиц. Любое химическое или физическое модифицирование поверхности, такое, как прививка фазы, термообработка, промывка и т. д., должны быть идентичными для аналитической и препаративной насадок и контролироваться аналитическими измерениями и хроматографическими тестами. Однако поскольку такие обработки обычно выполняются в разных масштабах, то идентичная обработка при соблюдении всех условий для поверхностно модифицированных материалов хотя и является идеалом, но не всегда возможна. Даже простое уменьшение размера частиц неорганических материалов (таких, как кремнезем или оксид алюминия) или органических полимерных материалов (таких, как полистирол или полиакрилат), неизменных в других отношениях, не могут гарантировать одинаковую хроматографическую селективность «одного и того же» материала двух размеров. Например, размол частиц большего размера для получения более мелких частиц потенциально может привести к появлению новых поверхностей, которые в физико-химическом отношении отличаются от поверхности, первоначально доступной в больших частицах. Обычно наблюдаемые различия в аналитических и препаративных разделениях, которые могут быть связаны с химией материала насадки, не ухудшают возможность проведения требуемого разделения. Если считают, что из-за различия неподвижных фаз, выбранных для разделения в малом и большом масштабе, возможны значительные различия в результатах, то, выполняя соответствующие эксперименты на малых колонках, заполненных каждой из неподвижных фаз, определяют необходимые изменения в системе в условиях масштабирования.

1.5.1.1.2. Предыстория насадки. Обработка и простое приведение к фазовому равновесию как аналитических, так и препаративных насадочных материалов очень важны для успешного масштабирования и получения воспроизводимых результатов. Это особенно справедливо и позволяет экономить много времени в жидко-жидкостной распределительной хроматографии на поверхностно-активных веществах и в адсорбционных системах жидкость — твердое тело с использованием многокомпонентных подвижных фаз, содержащих одну или более минорных составляющих (меньше 1—5%, ср. разд. 1.6.2.2.3). Обычно при исследовании с целью дальнейшего масштабирования, если это возможно, берут или свежую колонку, или колонку, использованную с известным растворителем, после которого ее можно легко привести в равновесие в условиях, пригодных для препаративного разделения. Аналитическое ЖХ-разделение, разработанное на колонке, которая прежде использовалась во многих других разделениях с различными системами растворителей, при после-

дующем перенесении результатов на препаративную ЖХ-колонку со свежей насадкой при использовании той же подвижной фазы может привести иногда к совершенно непредсказуемому разделению. Следует помнить, что компоненты подвижной фазы, особенно добавки и модификации, могут необратимо удерживаться на материале насадки, постоянно изменяя ее разделяющие характеристики при определенных условиях. Если препаративная насадка не подвергалась действию тех же самых компонентов подвижной фазы, что и аналитическая колонка, то она может иметь совершенно новые свойства.

1.5.1.1.3. Геометрия колонки. Проще всего масштабировать колонки, если они отличаются только по диаметру, а не по длине и если каждая имеет достаточную разделительную эффективность для решения данной проблемы (см. в табл. 1.4 сведения по эффективности и в табл. 1.5 сведения по нагрузке для колонок различного диаметра). В качестве простого указания по масштабированию можно предположить, что нагрузка прямо пропорциональна длине колонки. Однако это предположение следует изменить, если насадка в короткой колонке, заполненной малыми частицами, и в длинной колонке, заполненной большими частицами, отличаются не только по размеру частиц, но и по таким свойствам, определяющим емкость, как величина поверхности (ср. разд. 1.6.1).

Обычно предполагается, что нагрузка прямо пропорциональна площади поперечного сечения колонки (d^2 или r^2). Однако такое предположение может быть ошибочным, если маленькие и крупномасштабные препаративные колонки отличаются в устройстве систем распределения в местах ввода или вывода образца. Результатом этого может быть неполное использование всей емкости хроматографического слоя в одной или в обеих колонках (ср. разд. 1.7.1.1). К счастью, различия обычно бывают в пользу крупномасштабной системы, так как аналитические колонки для ЖХ обычно не имеют системы распределения образца, кроме металлокерамического пористого фильтра или сита, обеспечивающих центральный одноточный ввод или вывод.

1.5.1.1.4. Концентрация образца. Концентрации образцов обычно значительно различаются в мелких и крупномасштабных разделах. Аналитическая ЖХ выполняется с вводом очень разбавленных образцов (<1% масса/объем). При увеличении нагрузки в препаративных разделах концентрацию образца также увеличивают (1—10%) для того, чтобы вводимый объем был разумным. Искусение использовать более высокие концентрации образцов (больше 10%) возрастает при увеличении масштаба до очень больших препаративных ЖХ-колонок. Однако

это может вести к большей высоте тарелки, дополнительному расширению полосы и уменьшению разрешения — всем симптомам *массовой перегрузки* (см. разд. 1.4.2). Если вводимый объем при нормальных концентрациях образца (примерно <10%) превышает 10—20% от мертвого объема колонки, то пики слабоудерживаемых компонентов (низкое k') могут чрезмерно размываться и разрешение может стать недостаточным для получения требуемого результата. Такие условия обычно называют *объемной перегрузкой* (см. разд. 1.4.3.2 и 1.6.2.1.2). Другой часто встречающейся трудностью при работе с большими образцами является плохая растворимость. Использование для ввода образца растворителя, отличного от подвижной фазы, или адсорбция образца на части неподвижной фазы, помещенной в предколонку, являются не очень желательными приемами, однако в сложных случаях может возникнуть необходимость их использования (см. разд. 1.6.2.2.6).

1.5.1.2. Пример последовательного подхода к масштабированию

Рассмотрим в качестве примера разработки препаративного ЖХ-разделения типично реальную ситуацию масштабирования. Здесь мы следуем схеме, приведенной на рис. 1.3 (разд. 1.2.3).

1. **Определение проблемы.** В процессе изучения канцерогенности бензопирена (см. [73]) была синтезирована смесь двух родственных промежуточных спиртовых полупродуктов. Требовалось получить несколько граммов каждого изомера с чистотой больше чем 99%.

2. **Проведение грубых разделений.** Два главных продукта реакции были выделены из реакционной смеси с помощью обычной методики, включающей экстракцию растворителем, жидкость-жидкостное распределение в делительной воронке, отделение органического слоя, сушку, фильтрацию и удаление растворителя.

3. **Разработка аналитического разделения.** Грубая смесь стадии 2 была подвергнута ТСХ на микропластинке с силикагелевым слоем (подвижная фаза — хлороформ, стабилизированный этанолом, примерно 0,75% по объему). Смесь содержала два главных компонента (значения R_f 0,18 и 0,24) в соотношении 80/20 по массам. Предположительно, это были 1- и 4-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидрофенантрен, соответственно компоненты А и В.

Для простоты в качестве подвижной фазы для начального аналитического разделения, выполненного на силикагелевой колонке с размером частиц 10 мкм, был выбран метиленхлорид. При этих условиях $k_A' = 4,7$; $k_B' = 3,3$. Коэффициент разделения α был 1,4, т. е. такой же, как в описанной выше системе ТСХ.

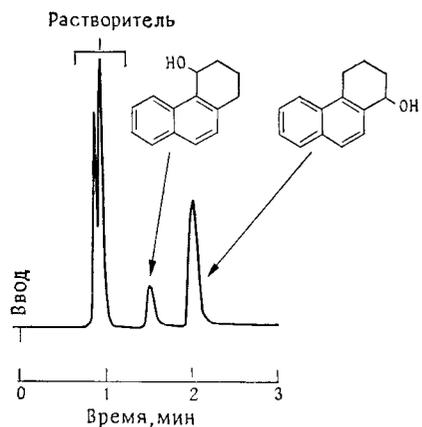


Рис. 1.22. Аналитическое разделение 4- и 1-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидрофенантронов (синтетическая смесь 20 : : 80). Объемная скорость: 4 мл/мин; колонка: силикагель μ -порасил, $d_p = 10$ мкм, $d_{\text{внутр}} = 4,2$ мм, $l = 30$ см; растворитель — метиленхлорид/этилацетат (95 : 5); детектор — РФ, 16 \times ; размер образца: 100 мкг в 10 мкл подвижной фазы [73].

печить оптимальное взаимодействие образца с неподвижной фазой при более высоких нагрузках. Кроме того, подвижная фаза, содержащая менее 5% полярного модификатора, при ее использовании со свежей препаративной колонкой, заполненной силикагелем, требует очень большой аккуратности для достижения соответствующего равновесия в системе (см. разд. 1.6.2.2.3). Поэтому была испытана третья подвижная фаза: метиленхлорид — этилацетат (95 : 5). Результат, показанный на рис. 1.22, был почти идеальным: $k'_A = 1,33$; $k'_B = 0,63$; $\alpha = 2,2$.

Как отмечалось в разд. 1.3.3, для минимальной затраты растворителя и максимальной емкости по образцу в идеальном случае значения k' должны быть меньше пяти ($k' < 5$). Не всегда возможно достичь хорошего коэффициента разделения между парой соединений, когда оба имеют $k' < 1 \div 2$. В рассмотренном примере стереохимия способствовала более сильному взаимодействию с поверхностью силикагеля полярной гидроксильной группы в менее экранированном положении 1 по сравнению с ОН-группой в 4-гидроксиизомере. Поэтому выбор силикагеля в качестве неподвижной фазы дал оптимальный результат.

4. Проведение препаративного разделения на аналитической системе. Согласно данным табл. 1.5, в колонку использованного

К счастью, компонент, содержащийся в меньших количествах, элюировался первым (см. разд. 1.4.4).

Опыт разделения соединений такой структуры показывает, что лучшее разделение может быть получено при использовании двухкомпонентной подвижной фазы. Поэтому повторное ЖХ-разделение на силикагеле было выполнено с использованием смеси хлороформ — этанол (99 : 1 по объему) в качестве подвижной фазы. При таком разделении коэффициент α был равен примерно 2,2 ($k'_A = 0,87$; $k'_B = 0,4$). Эта степень разделения позволяла теперь перейти к мультиграммовым нагрузкам на препаративной колонке. Однако значение k' , полученное при небольших нагрузках, несколько мало для того, чтобы обеспечить

здесь размера можно загрузить примерно 30 мг каждого компонента (0,019 г соединения/г силикагеля). Но так как образец не является смесью эквимолярного состава, в аналитическую колонку было дозировано примерно 50 мг смеси для того, чтобы исследовать характер разделения при большой нагрузке. Как видно из рис. 1.23, сохранялось хорошее разрешение, хотя линейный динамический диапазон детектора был недостаточным для этой концентрации. Этот опыт препаративного разделения в малом масштабе убедил, что масштабирование на большую колонку с меньшей собственной эффективностью колонки позволит адекватно разделить несколько граммов смеси.

5. Увеличение масштаба препаративной системы. Было решено разделить примерно 20 г смеси за два раза, вводя смесь порциями примерно по 10 г каждая. Соответственно препаративная колонка (колонка 1 в уравнении (1.10)) была выбрана той же длины, но ее объем примерно в 200 раз превышал объем аналитической колонки (колонка 2 в уравнении (1.10)). Отношение площадей поперечного сечения было $(57 \text{ м})^2 / (4,2 \text{ м})^2 = 184$. Приведенное ниже уравнение масштабирования (1.10) показывает, что это позволяет разделять примерно 10 г-образец (0,054 г, введенные в аналитическую колонку, умноженные на 184, дают 9,9 г, см. табл. 1.5).

$$m_1 = m_2 \left(\frac{d_1}{d_2} \right)^2 \frac{l_1}{l_2} \quad (1.10)$$

где m_i , d_i и l_i — нагрузка, внутренний диаметр и длина колонки i .

Из табл. 1.4 видно, что при $\alpha = 2,2$ необходима очень небольшая собственная эффективность для получения хорошего разделения. Было определено, что неподвижная фаза с размером частиц 75 мкм более чем подходяща для использования в препаративной ЖХ-колонке. Хотя препаративная насадка больше по размерам частиц, во всех остальных аспектах она идентична силикагелевой насадке в аналитической колонке, не считая

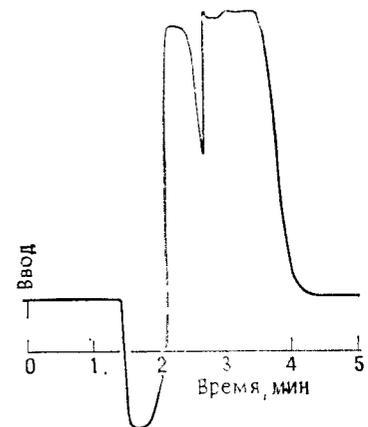


Рис. 1.23. Препаративное разделение смеси тетрагидрофенантронов в малом масштабе. Объемная скорость: 2,5 мл/мин; колонка и растворитель: см. рис. 1.22; детектор — РФ, 28 \times ; образец: 54 мг в 1,75 мл подвижной фазы [73].

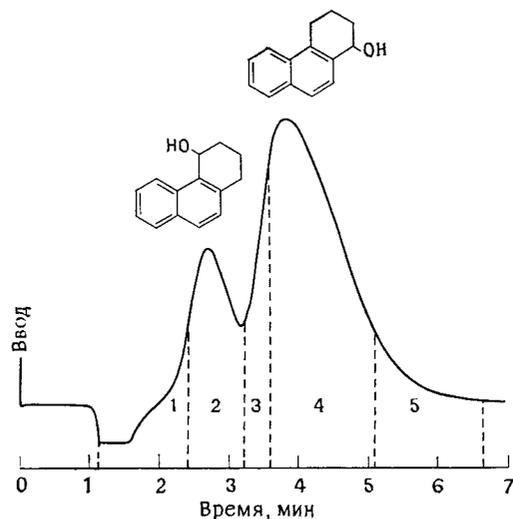


Рис. 1.24. Preparативное разделение смеси тетрагидрофенантронов. Объемная скорость: 300 мл/мин; колонка: силикагелевый картридж препак-500, $d_{\text{внутр}} = 5,7$ см; $l = 30$ см, $d_p = 55-105$ мкм; растворитель: см. рис. 1.22; детектор—РФ, относительный отклик 1; образец 10 г в 45 мл подвижной фазы [73].

предыстории, связанной с использованным растворителем. Это различие не считали существенным, так как аналитическая колонка была новой, причем использовалась только для разработки методики разделения этого образца на стадиях 3, 4. Масштабируя нагрузку для большой колонки, увеличивают затем объемную скорость потока в соответствии с уравнением (1.11) для того, чтобы временные рамки как для малых, так и для больших разделений были эквивалентны:

$$\omega_1 = \omega_2 \left[\frac{d_1}{d_2} \right]^2 \quad (1.11)$$

где ω_i — объемная скорость потока в колонке i .

После масштабирования объемной скорости таким образом, чтобы линейная скорость (объемная скорость в $\text{см}^3/\text{мин}$, деленная на площадь поперечного сечения колонки в см^2) была сопоставима с линейной скоростью при аналитическом разделении, preparативное разделение было завершено за 7 мин, как показано на рис. 1.24. Так как время разделения не было критичным, решили использовать несколько меньшую скорость потока, чем предсказанная уравнением (1.11) (300 мл/мин вместо 460 мл/мин), чтобы достичь некоторого увеличения разрешения.

6. Сбор фракции. В течение каждого preparативного разделения было собрано 5 фракций, как показано на рис. 1.24.

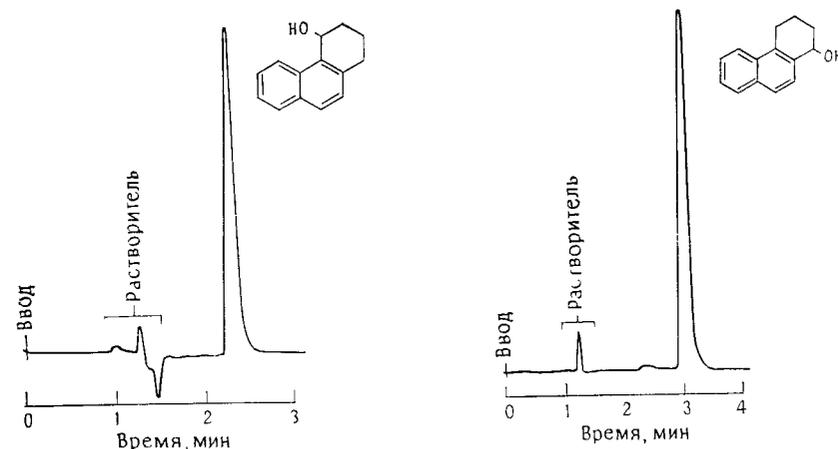


Рис. 1.25. Анализ фракции 2 (слева) и фракции 4 (справа), полученных в preparативном разделении на рис. 1.24. Скорость потока, колонка и растворитель: см. рис. 1.22; детектор: РФ, 8 \times ; образец: 20 мкл соответствующей фракции, чистота каждой фракции по данным ЖХ равна 99,9% [73].

7. Проверка чистоты фракций с использованием аналитической системы. Как показано на рис. 1.25, аналитическую ЖХ-систему, разработанную на стадии 3, использовали для мониторинга чистоты собранных фракций preparативного разделения.

8—10. Соединение подходящих фракций; окончательная обработка и выделение разделенного материала, максимальное извлечение чистого материала. Из двух preparативных разделений после последующего выпаривания растворителя выделили с уровнем чистоты $>99\%$ 12,6 г компонента А (объединенные фракции 4 и 5) и 3,3 г компонента В (фракция 2). Так как образец не был дорогим и выделенные количества чистых компонентов были достаточны для последующих ступеней синтеза, отбросили фракции 1, 3 и 5. Эти фракции не исследовались на потенциальные следовые компоненты, так как последних не было видно при аналитических разделениях, и это выходило за рамки проводимого исследования.

1.5.2. Масштабирование на основе данных ТСХ

Между ТСХ и ЖХ имеется значительное различие, поэтому масштабирование preparативной ЖХ на основе данных ТСХ менее очевидно.

Во-первых, силикагель, используемый в обычных ТСХ-пластинках, имеет большую удельную поверхность (500—700 $\text{м}^2/\text{г}$) и меньший средний диаметр пор (60 Å), чем силикагель, используемый для заполнения типичных ЖХ-колонок (300 $\text{м}^2/\text{г}$,

100 Å соответственно). Таким образом, образцы обычно более сильно удерживаются на ТСХ-пластинках с силикагелем, чем на аналитических колонках, заполненных силикагелем.

Во-вторых, по существу ТСХ-разделение является градиентным. Когда подвижная фаза поднимается по слою силикагеля на пластинке для ТСХ за счет капиллярных сил, более полярные составляющие растворителя (даже вода, растворенная в количествах нескольких миллионных долей) адсорбируется сухим силикагелем и движется более медленно, чем менее полярные компоненты. Этот градиент будет в большей или меньшей степени воздействовать на компоненты образца в зависимости от степени их удерживания. Результирующая селективность в ТСХ может отличаться от селективности в ЖХ-колонне с той же подвижной фазой.

В-третьих, обычно разделительная способность ТСХ-пластинок меньше, чем для типичных ЖХ-колонок. К счастью, этот фактор действует в пользу хроматографа, масштабирующего разделение. При прямом переходе от ТСХ к большим препаративным колонкам может смутить появление компонентов, о существовании которых не было известно до проведения ЖХ. Поэтому будьте готовы к неожиданностям, если нельзя было предварительнее сделать аналитической ЖХ.

В-четвертых, расход растворителя в ТСХ мал, так как компоненты образца мигрируют только на небольшое расстояние вдоль хроматографического слоя, а не элюируются полностью с пластинки. Более того, разделению способствует, хотя потенциально элюирование ограничено, уменьшение скорости подвижной фазы по мере ее продвижения вверх по пластинке против сил тяжести.

В-пятых, если не приняты меры предосторожности, в ТСХ образец может подвергаться в принципе фотохимическому окислительному или химическому разложению, что связано со способом распространения компонентов по тонкому потенциально каталитическому слою адсорбента и с временем выдержки, если время проявления велико, что зависит от природы растворителя и характеристик используемого слоя (толщина, размер частиц и т. д.). Обзор принципов ТСХ и методов работы можно найти в книгах [93, 94] и цитируемых в них работах. Вопросы препаративной ТСХ рассматриваются также в гл. 2 этой книги.

В ТСХ относительная степень миграции компонентов образца выражается с помощью значений R_f .

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное центром зоны образца}}{\text{Расстояние, пройденное одновременно подвижной фазой}} \quad (1.12)$$

Используя для начала отсчета точку, в которой образец нанесен на пластинку, и положение пятен образца и фронта растворите-

ля к моменту окончания миграции, рассчитывают значение R_f , измеряя расстояния на пластинке. R_f можно скоррелировать с k' в элюентной ЖХ (см. рис. 1.4), используя следующие соотношения:

$$R_f = 1/(k' + 1), \quad \text{или} \quad k' = (1 - R_f)/R_f \quad (1.13)$$

Из-за описанного выше различия ТСХ и элюентной ЖХ нельзя на основе данных ТСХ, полученных с той же подвижной фазой, точно предсказать значение k' для аналитического ЖХ-разделения. Для серии от относительно неполярных до умеренно полярных стероидов и растворителей, отличающихся по полярности от пентана до этилацетата, Хара [95] нашел, что лучшую оценку значений k' для ЖХ-разделений из данных по ТСХ можно получить, используя уравнение (1.14), причем $b=1,5$:

$$bR_f = 1/(k' + 1), \quad \text{или} \quad k' = [1 - bR_f]/bR_f \quad (1.14)$$

Использование уравнения (1.14) с $b=1,5$, по-видимому, позволяет адекватно предсказывать значение k' для многих органических соединений на колонках, заполненных силикагелем, в условиях адсорбционной ЖХ. Например, используя данные, цитируемые ранее (в разд. 1.5.1.2, стадия 3), применительно к гидрокситетрагидрофенантренам и учитывая некоторое различие между элюируемыми силами растворов, содержащих 0,75 и 1% этанола в хлороформе, на основе уравнения (1.14) можно достаточно хорошо предсказать значения k' для А и В во втором из трех ЖХ-разделений.

Другой пример показан на рис. 1.26. Смесь эфиров холестерина хорошо разделили на пластинке со слоем из силикагеля, используя в качестве проявителя смесь бензол—гексан 50:50 [96]. Как видно из сопоставления данных R_f и k' , приведенных на рис. 1.26, уравнение (1.14) с $b=1,5$ достаточно хорошо предсказывает соответствующие значения k' , полученные из данных по аналитической ЖХ на силикагеле с использованием той же подвижной фазы. Было легко достигнуто масштабирование на основе данных по разделению в ТСХ для разделения 10 г образца методом препаративной ЖХ. Чистота фракции была установлена также с помощью ТСХ. Аналитические ЖХ-разделения показаны для сравнения.

ТСХ можно использовать для предсказания условий ступенчатого элюирования для препаративных разделений, как показано на рис. 1.27 [97]. Три системы ТСХ, использующие подвижные фазы прогрессивно увеличивающейся полярности, сравнивали для разделения пары более простых эфиров гликоля. На основе этой информации, исходя из больших коэффициентов разделения и соотношений между α и нагрузкой, приведенных в табл. 1.5, около 100 г смеси разделили всего за 7 мин в ус-

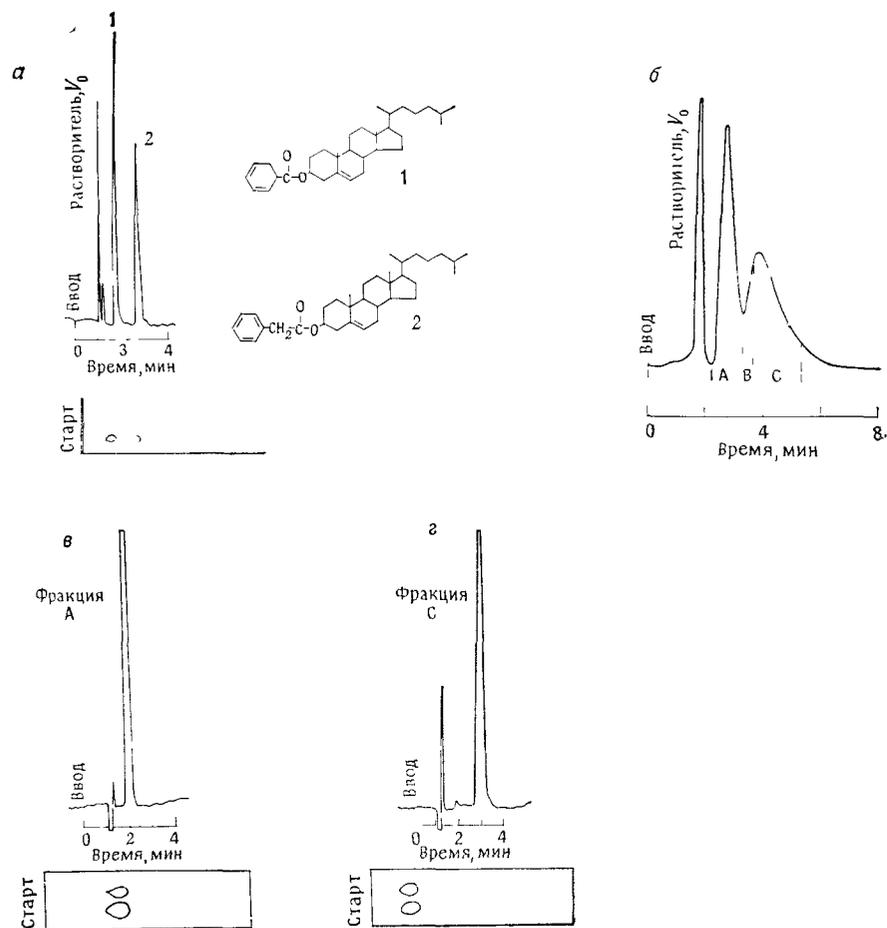


Рис. 1.26. Сравнение масштабирования на основе данных ТСХ и ЖХ по разделению эфиров холестерина. *a* — аналитическое разделение смеси с помощью ТСХ и ЖХ; *б* — препаративная ЖХ; *в* — ТСХ и ЖХ фракции А препаративного разделения; *г* — ТСХ и ЖХ фракции С препаративного разделения.

Общие условия. Образец: смесь равных по массе количеств холестеролбензоата (1) и холестеролфенилацетата (2), 10% (масса/объем) в подвижной фазе. Подвижная фаза: во всех случаях смесь бензола и гексана (50 : 50 по объему).

Аналитическая ТСХ. Пластика 5×20 см с готовым слоем силикагеля-60, толщина слоя: 0,25 мм, время проявления: 40 мин, расстояние от старта до фронта растворителя: 16,3 см. Обнаружение: фосфорномolibденовая кислота (10% в этаноле); R_f и коэффициент разделения: 1) $R_f=0,36$, k' , рассчитанный по уравнению (1.14), равен 0,85; 2) $R_f=0,21$, k' рассчитанный по уравнению (1.14), равен 2,17; $\Delta R_f=0,15$, $\alpha=2,6$.

ловиях трехступенчатого градиента. После анализа с помощью ТСХ, объединения и окончательной обработки фракций было получено 14,8 г А и 54 г В с высокой степенью чистоты.

Более полная информация и примеры масштабирования препаративной ЖХ на основе разделений, полученных в ТСХ, имеются в ссылке [98]. Приведенные выше результаты использования данных ТСХ для масштабирования получены для разделений, основанных на механизме адсорбционной ТСХ. Разделение на основе распределительного и других механизмов масштабировать на основе данных ТСХ не так просто. В этих случаях следует использовать аналитическую ЖХ как средство масштабирования.

1.5.3. Масштабирование разделения с градиентным элюированием

В области разделения малых молекул с помощью аналитической ЖХ градиентное элюирование стало ценным средством при исследовании сложных смесей или групп соединений с неизмеримой хроматографической полярностью. Успехи приборостроения, в частности создание систем подачи растворителя и систем смешения, совершенствование конструкции детекторов, а также контроль работы приборов на основе микропроцессоров сделали возможным высокий уровень воспроизводимости в схемах разделения с непрерывным градиентом. Микропрепаративное ЖХ-разделение, выполняемое на аналитическом оборудовании, может реализовать эти возможности. Однако при переходе в область препаративной и макропрепаративной хроматографии значительно уменьшаются возможности создания сложных градиентов и контрольных устройств, пригодных для работы с большими объемами и высокими скоростями подвижной фазы, которые бы воспроизводили точно градиенты, характерные при работе с аналитическими приборами. В таких ситуациях обычно рекомендуют использовать подходящую последовательность изократического и ступенчатого градиентного элюирования, если оно вообще возможно (см. разд. 1.6.2.2.5). Выгоды такого подхода

Аналитическая ЖХ. Колонка: силикагель μ -порасил, $d_{\text{внутр}}=4,2$ мм, $l=30$ см, $d_p=10$ мкм. Объемная скорость: 2,0 мл/мин. Детектор: РФ, 8×; время анализа 3,5 мин; емкость и коэффициент разделения: 1) $k'=0,82$; 2) $k'=2,06$; $\alpha=2,5$.

Препаративная ЖХ. Колонка: силикагелевый картридж препак-500, $d_{\text{внутр}}=5,7$ см, $l=30$ см. Объемная скорость: 350 мл/мин. Детектор: РФ. Размер образца: 10 г в 100 мл подвижной фазы. Время анализа: приготовление колонки — 1,5 мин, смачивание и уравнивание колонки — 5,0 мин, приготовление и введение образца — 2 мин, разделение и сбор фракций — 8 мин, общее время разделения — 16,5 мин.

Анализ и чистота. Фракция А: холестеролбензоат (1) >99,9%; фракция В: холестеролфенилацетат (2) >99,4% по данным аналитической ЖХ [96].

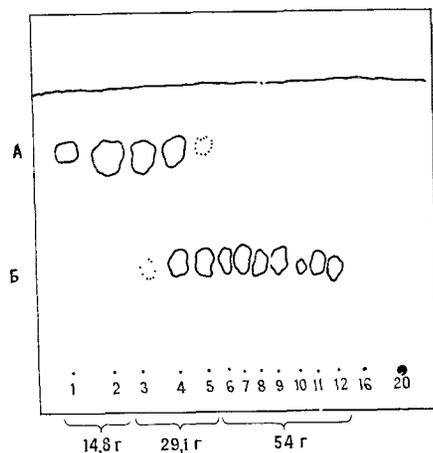


Рис. 1.27. Разделение пары сложных моноэфиров гликоля, масштабированное на основе данных ТСХ, выполненное с использованием ступенчатого градиента.

Аналитическая ТСХ

Подвижная фаза (ПФ)	R_{fA}	R_{fB}	a
1	0,49	0,03	11
2	0,65	0,30	4,3
3	0,90	0,64	5,1

ПФ 1: CH_2Cl_2
 ПФ 2: гексан/ЕтОАс (70 : 30 по объему)
 ПФ 3: гексан/ЕтОАс (50 : 50 по объему)

Препаративная ЖХ	
Образец	Пара сложных моноэфиров гликоля
Соотношение в образце	А/В - 30/70
Размер образца	98 г в 1000 мл ПФ 1
Объемная скорость	500 мл/мин (0,5 мертвого объема/мин)
Колонка	две последовательно соединенные колонки с силикагелевыми картриджами препнак-500
Ступени градиента	1 мертвый объем (1000 мл) ПФ 1 1 мертвый объем (1000 мл) ПФ 2 2 мертвых объема (2000 мл) ПФ 3
Размер фракций	200 мл
Расход растворителя	5 л
Выход	6,9 г/мин (общее время на очистку и разделение)

Контроль (мониторинг) извлечения компонентов образца с помощью аналитической ТСХ. Условия: пластинка с силикагелем 20×20 см; растворитель ПФ 2. Номера фракций показаны ниже стартовых пятен для каждой аликвоты. Количества извлеченных компонентов образца из объединенных фракций показаны под пятнами.

заключаются в простоте управления, уменьшении капитальных затрат, более надежном контроле процесса и часто в более низкой его стоимости.

Напомним также, что цели аналитической и препаративной ЖХ различаются (см. табл. 1.1). Вероятно, градиентное разде-

ление может быть использовано для сокращения времени анализа или обеспечения количественного определения двух или большего числа компонентов, сильно отличающихся по полярности из единого сложного образца в одном хроматографическом опыте. Однако аналогичные условия могут и не быть оптимальными для выделения одного или большего числа этих соединений в крупномасштабных разделениях. Рассмотрим тщательно схему препаративного разделения с учетом замечаний, сделанных в разд. 1.2. Возможность перерабатывать быстро большие образцы в условиях ступенчатого градиента наряду с возможностью лучшего разделения для пары компонентов, изолированных таким образом, при последующих изократических условиях может дать превосходную альтернативу разделению в непрерывном градиенте.

Возрастающая важность микропрепаративной ЖХ как средства очистки биологически важных макромолекул делает, однако, необходимым создание средства для проведения крупномасштабных разделений в условиях непрерывного градиента. Это особенно справедливо для новых разделений, в основе которых лежат гидрофобные или смешанные взаимодействия и используются высокоэффективные подвижные фазы. Классические ионнообменные, ситовые (гельпроникающие) и аффинные методы, традиционно применяемые в колонках большого диаметра при низком давлении, и подача растворителя за счет гравитационных сил могут быть быстро вытеснены современными методами, когда станут доступны подходящие материалы и оборудование. Новейшие приборы для ЖХ открывают хорошие перспективы использования в дальнейшем градиентных разделений в крупном масштабе. Однако в настоящее время опыт работы с такими системами очень ограничен.

Успешное масштабирование градиентных систем требует просто разумного подхода с учетом некоторых рекомендаций, предложенных в этой главе для изократического и ступенчатого градиентного препаративного ЖХ-разделения. Следует позаботиться о воспроизводимости наклона или формы градиента, учитывая любые различия в геометрии колонки (длина, объем), химическую природу насадки (разд. 1.5.1), способ создания градиента, характеристики предколонного смесителя и объем задержки градиента. Во всех случаях разделения основываются на коэффициенте распределения компонента между неподвижной и подвижной фазами (k' или D_m). Непрерывный градиент изменяет значение k' известным образом по зависимости, аппроксимируемой серией небольших изократических ступеней. Увеличивающаяся сила растворителя в течение элюирования сжимает полосу образца. Результатом этого являются узкие пики и уменьшение хвоста пика даже при условии больших

нагрузок, хотя не обязательно за этим следует соответствующее увеличение разрешения. Подробное обсуждение вопросов градиентного элюирования и масштабирования выходит за рамки этой главы. Читатель может познакомиться с этими вопросами в ряде обзоров и современных работ (41—43, 46, 47, 57, 58, 99—105).

1.6. Выбор препаративной системы разделения с учетом материалов для насадки и элюентов

Как отмечалось в разд. 1.3.3, наиболее важной стадией при разработке препаративного ЖХ-разделения является получение максимальной селективности — коэффициента разделения α . Это делается путем тщательного выбора комбинаций неподвижной и подвижной фаз, имеющих химические и физические свойства, подходящие для компонентов образца, которые должны быть очищены [см., например, 40—45, 47, 50—59, 99, 106 и ссылки в этих работах]. Приведем некоторые идеи, представления и наблюдения, дающие читателю направление в выборе наилучшего пути для получения максимального α .

1.6.1. Неподвижная фаза

Первой и самой главной целью является достижение желаемого разделения; вторая цель — оптимизация коэффициента разделения; третья (в иерархии целей, которые управляют выбором неподвижной фазы в препаративной ЖХ) — сведение к минимуму цены и трудностей работы. Многие смеси могут быть разделены в нескольких ЖХ-системах. Если имеется такой выбор, экономические и эксплуатационные соображения могут окончательно определить, какую систему следует выбрать. С другой стороны, ряд методов выделения никогда не бывает оптимальным, так как свойства образца могут обусловить критический компромисс между различными параметрами системы. В этих случаях каждая попытка выбрать неподвижную фазу основывается главным образом на ее способности приводить к оптимальному разделению. Если нет предварительного опыта, которым можно было бы руководствоваться, то используйте обзор по доступным материалам для насадок, например [7], и обратитесь к литературе, чтобы выбрать материал, соответствующий требованиям схемы разделения. Кроме стоимости первоначальной покупки не забудьте учесть стоимость рабочей силы и материалов, необходимых для заполнения колонки и ее уравнивания, учтите стабильность насадки и частоту и стоимость регенерации или замены используемой насадки. Целесообраз-

ность любого вклада или затрат должны быть оценены на основе стоимости продуктов, выделенных с желаемой чистотой и в соответствующих количествах.

1.6.1.1. Химические свойства неподвижной фазы

1.6.1.1.1. Механизм разделения. Как отмечено выше (см. разд. 1.3.1), хроматография является динамическим равновесным процессом, включающим на молекулярном уровне многократное повторение процесса распределения молекул растворенных веществ между подвижной и неподвижной фазами. В основе процесса распределения могут быть два принципиально различных механизма. Один из них включает *притяжение молекул неподвижной фазой*, в другом происходит проникновение разделяемых молекул в неподвижную фазу в условиях *отсутствия притяжения*. Первый из них может включать: неспецифическую адсорбцию на твердых поверхностях, распределение в жидком слое неподвижной фазы, электронное притяжение к полярным, ионным или богатым π -электронами поверхностным группам или компонентам неподвижной фазы, структурно-специфические аффинные взаимодействия с соответствующими группами на поверхности. Во втором случае механизм проникновения в неподвижную фазу в отсутствие сил притяжения включает разделение по размеру или форме молекул в растворе и (или) ионного состояния. Обычная терминология, используемая в монографиях по ЖХ, группирует эти различные механизмы под общими названиями: *адсорбционная* (жидкость — твердое тело), *распределительная* (жидкость — жидкость), *ионообменная* или с переносом заряда, *аффинная*, *ситовая* (гельпроницающая, эксклюзионная, гельфилтрационная) и *ионэкслюзионная* хроматография соответственно. Однако в настоящее время хорошо известно, что классификация какой-либо насадки по одному из этих общих механизмов разделения может ввести в заблуждение, поскольку в любой данной системе разделения могут конкурентно или синергично действовать более чем один из названных механизмов.

Планируя конкретное разделение, попытайтесь прежде всего предсказать, какой механизм (или механизмы) разделения можно использовать, чтобы реализовать различия в молекулярной структуре, размере, форме или заряде выделяемых соединений; затем выберите подходящую неподвижную фазу. Например, силикагель, благодаря геометрии и полярности его поверхности, является хорошей неподвижной фазой для разделения соединений, которые отличаются только положением довольно полярных функциональных групп (как гидрокситетрагидрофенантрены на рис. 1.22) или имеют различия в структуре вблизи

полярного конца довольно неполярной молекулы (такой, как у эфира холестерина на рис. 1.26). Оксид алюминия обладает уникальной селективностью к ароматическим углеводородам [50]. Большие биомолекулы, такие, как протеины с близкой основной структурой, могут иметь разные эффективные размеры в растворе или различия в среднем заряде, что наводит на мысль использовать насадку для ситовой (гельфилтрационной) хроматографии или соответственно слабый ионообменник. Обширный обзор свойств доступных насадок для препаративной ЖХ опубликован в работе [7]. Многие из цитированных выше работ по ЖХ содержат детальное рассмотрение используемого механизма разделения (например, [42]).

В процессе развития хроматографии в качестве неподвижных фаз применяли самые различные материалы, включая уголь, гранулированный сахар, костный порошок, чайные листья, стиральные порошки [57], однако ЖХ стали широко использовать после того, как метод стандартизировали (см. разд. 1.4.1). После этого в число основных неподвижных фаз вошли несколько подходящих и общедоступных материалов, которые могут быть получены без больших затрат с воспроизводимыми свойствами.

В поисках таких материалов хроматографисты обратились к близким технологиям, используемым для производства осушителей, носителей катализаторов, наполнителей и других поверхностно-активных, механически прочных порошков. В результате таких поисков прежде всего был найден оксид алюминия и, наконец, силикагель — неподвижная фаза для ЖХ с выдающимися свойствами [50, 51]. В настоящее время силикагель со всеми его современными усовершенствованиями является наилучшей неподвижной фазой для препаративной ЖХ, когда необходимо разделить небольшие органические молекулы ($M \leq 2000$). Размер и формы его частиц, свойства поверхности, структура пор могут быть приспособлены для решения самых разных задач. Его поверхность имеет высокую активность, и ее можно легко модифицировать водой или другими агентами или путем ковалентной прививки модификатора (см. разд. 1.6.1.1.2 и 1.6.1.1.3). Силикагель смачивается почти любой возможной подвижной фазой и инертен по отношению к большинству соединений. Он характеризуется хорошей емкостью как при адсорбции, так и при абсорбции. Обладая высокой емкостью, чистотой и отличной механической прочностью, он сравнительно дешев. Наиболее важно, что силикагель может быть использован для разделения большого многообразия химических соединений, а его хроматографические свойства, как это следует из многочисленных данных, в общем предсказуемы и воспроизводимы. Рассматривая вопрос о препаративных ЖХ-разделениях

большого масштаба, следует прежде всего попытаться использовать возможности адсорбционной хроматографии на немодифицированном силикагеле со всеми сопутствующими выгодами: низкая стоимость, гибкость, механическая прочность, хорошая разделительная способность, легкое масштабирование и простая эксплуатация.

1.6.1.1.2. Сопоставление адсорбции и распределения. Среди различных вариантов разделения в жидкостной хроматографии, вероятно, наибольшим возможным числом комбинаций фаз и поэтому наибольшей потенциальной селективностью обладает распределительная жидко-жидкостная хроматография, хотя она меньше всего используется в лабораториях. Традиционно жидко-жидкостное распределение включает прохождение менее полярной подвижной фазы через слой, заполненный носителем с большим объемом и малой удельной поверхностью (таким, как диатомитовая земля), на который нанесена неполярная подвижная фаза [107, 108]. Обращая полярность фаз, т.е. нанося менее полярные соединения на носитель и используя более полярную жидкость в качестве подвижной фазы, получают альтернативный вариант метода. Эти два варианта были названы *нормально-фазной* и *обращенно-фазной* хроматографией соответственно.

Простая трехкомпонентная двухфазная система изооктан — метанол — вода (в различных пропорциях) является высокоселективным средством разделения для большого разнообразия соединений (например, см. работу [75] и ссылки в ней, а также [109]). В такой системе метанол увеличивает концентрацию изооктана в водной фазе и воды в органической фазе. При пропускании подвижной фазы через носитель неподвижной фазы под действием сил тяжести или низкого давления часть жидкой неподвижной фазы обычно выходит из слоя колонки в пределах мертвого объема и затем элюируется в очень небольших количествах. При повышении давления и уменьшении времени разделения увеличивается также скорость потери неподвижной фазы.

Истечение неподвижной фазы делает систему жидкость — жидкость несовместимой с обычной техникой детектирования в аналитической ЖХ. Одним из методов решения этой проблемы является ковалентная прививка неподвижной фазы к поверхности твердого носителя. Получение таких привитых фаз, особенно октадецилсилил-оксид кремния (C_{18}), было одним из наиболее важных факторов, вызвавших громадный рост применения аналитической ЖХ в последние 15 лет. По оценкам от 60 до 90% всех аналитических ЖХ-разделений делается на «обращенно-фазных» силикагелевых насадках [54, 110, 111].

В настоящее время термин «обращенно-фазный» обычно обозначает разделение, выполняемое на силикагелях, поверхность которых стала гидрофобной после химической модификации. К сожалению, наряду с сужением смысла термина сузилась возможность выбора хроматографистом подходящей неподвижной фазы для проектируемой распределительной системы. Более того, не все связанные фазы, используемые в аналитической хроматографии, имеют в препаративной ЖХ подходящие аналоги, идентичные по селективности, но с большими размерами частиц. Это затрудняет масштабирование.

К счастью, хотя выбор неподвижных фаз ограничен, большое число аналитических разделений может быть выполнено на колонках, заполненных силикагелем со связанной фазой. Поэтому при разработке новых аналитических методов в подавляющем числе случаев C_{18} -силикагель используют в первую очередь. Однако это привело к тому, что многие хроматографисты не рассматривают другие неподвижные фазы, которые представляли бы лучший выбор для применения в крупномасштабных ЖХ-препаративных разделениях. Например, немодифицированный силикагель намного дешевле, чем силикагель с привитой фазой, и на нем многие разделения могут быть выполнены так же, если не лучше, чем на силикагелях со связанной фазой при использовании типичных элюентов или других нормально- или обращенно-фазовых систем [112—114].

Разделение в последних системах происходит за счет комбинации механизмов разделения и адсорбции, хотя до конца они не поняты. Даже привитые фазы, такие, как C_{18} , хорошо адсорбируют некоторые количества органических растворителей из водно-органической подвижной фазы, образуя жидкую неподвижную фазу *in situ* [40, 54, 110, 111]. Природа таких адсорбированных слоев может изменяться с изменением концентрации органического растворителя в подвижной фазе. Так, компоненты смеси стероидов, предварительно разделенные традиционной распределительной жидко-жидкостной хроматографией после введения в колонку, заполненную фазой C_{18} , элюируются в «нормально-фазном» порядке при использовании элюента метанол — вода (60 : 40), но в «обращенно-фазном» порядке, если отношение метанол — вода меняется на 40 : 60 [115]. Такое обращение порядка элюирования было бы маловероятным, если бы единственным механизмом, действующим в этой хроматографической системе, была твердофазная адсорбция (гидрофобное взаимодействие).

Таким образом, следует подчеркнуть следующие моменты:

□ Аналитическое разделение, выполненное на *обращенно-фазном* привитом силикагеле, нельзя рассматривать как оптимальное с точки зрения масштабирования препаративной ЖХ-

системы до анализа подвижной и неподвижной фазы с точки зрения селективности, стоимости, времени жизни, стабильности и т. д. (ср. также разд. 1.6.1.2 и 1.6.2).

□ Если используется распределительный механизм разделения, чрезвычайно важно привести систему к равновесию. Небольшие изменения в составе растворителя в подвижной фазе, обусловленные неадекватным смешением, изменением температуры, впитыванием *in situ* твердой фазой и т. п., может привести к значительному различию в составе элюента и в селективности (ср. разд. 1.6.2.2.3).

1.6.1.1.3. Химическая устойчивость и загрязнение образца. Как было отмечено ранее в разд. 1.2.3 (п. 8), решение проблемы разделения часто ставит новые задачи. В препаративной ЖХ образец вступает в контакт с большим количеством неподвижной фазы, при этом возникает потенциальная возможность его загрязнения. Загрязнения, обусловленные неподвижной фазой, обычно значительно отличаются по химическому составу от компонентов образца. В некоторых случаях такие загрязнения допустимы. В других случаях их удаление является обязательным. К счастью, различия свойств образца и загрязнений может упростить последующие стадии обработки, допуская использование грубых методов, таких, как кристаллизация, селективное осаждение или твердофазная адсорбция.

Загрязнения образца, обусловленные неподвижными фазами, являются результатами химической нестабильности или разрушения насадки или одновременного элюирования загрязнений, содержащихся в матрице насадки. Первая ситуация, вероятно, наблюдается при использовании привитых силикагелей или ионообменников (на основе смол или силикагеля). Например, почти все доступные сейчас привитые фазы на основе силикагеля получают с силоксановой связью —Si—O—Si— между матрицей силикагеля и привитой группой на поверхности. Хотя эта связь является термически стабильной (допускает использование определенных связанных фаз в газовой хроматографии), реакции, используемые для ее получения, обратимы [116, 117]. Эта часто не принимаемая во внимание характеристика обуславливает гидролитическую нестабильность, которая становится значительной в кислотных или щелочных условиях. Часто случается, что условия, ускоряющие гидролиз привитой фазы (например, очистка пептидов на C_{18} с использованием водной подвижной фазы, содержащей трифтороуксусную кислоту при pH 2÷3), способствуют также удерживанию продуктов гидролиза на насадке (например, октадецилдиметилсиланол удерживается на C_{18} в водном растворе). При этом образуется *in situ* поверхностная фаза с разделительными свойствами,

аналогичными свойствами первоначально привитой фазы. Поэтому первое время разделение происходит, как это предсказывается, но при последующем вымывании фазы органическим растворителем колонка становится «чистой», адсорбированная фаза удаляется, в результате остается измененная поверхность с другой селективностью (например, менее гидрофобная и более гидрофильная благодаря большому содержанию доступных силанольных групп).

Сильные анионообменники также обладают определенной степенью химической нестабильности. Открывая контейнер с такой насадкой, обычно чувствуют сильный запах рыбы, обусловленный свободными третичными аминами, образующимися в результате гидролитического расщепления четвертичных аминогрупп. Хотя анионообменники обычно хранятся в более стабильной солевой форме, например в виде хлоридов или ацетатов, присутствие влаги ускоряет превращение таких ионообменников в менее стабильную гидроксидную форму, которая способствует более быстрому разрушению насадки, необратимой потере ионообменной емкости и загрязнению образца.

Одним из путей, позволяющих избежать проблем, связанных с нестабильностью или разложением поверхностно-связанных химических групп, служит использование неорганических или органических материалов (таких, как исходный силикагель или поперечно сшитые полистеролы), не несущих функциональных групп.

Однако и такие насадки могут загрязнять образец. Полимерные матрицы, даже высоко сшитые, могут содержать небольшие количества низкомолекулярных олигомеров и других соединений, использованных или образовавшихся при синтезе полимеров. Такие компоненты могут быть сконцентрированы внутри полимерной матрицы, и требуется достаточно большое время для их диффузии на поверхность, откуда они могут быть вымыты подвижной фазой.

Кремнезем в сухом состоянии — очень активный адсорбент. При неправильном хранении он может адсорбировать не только влагу, но и различные другие материалы из окружающей среды (масла, компоненты дыма, пары химических веществ и т. д.), которые могут вымываться в условиях жидкофазных препаративных разделений. Некоторые исследователи пытаются очистить «грязный» силикагель путем нагревания его на воздухе до нескольких сотен градусов, надеясь «выжечь» органические включения. Этим они часто вызывают осаждение углерода на поверхности, причем изменяются селективность и гидрофильность поверхности силикагеля. Силикагель, хотя и очень медленно, растворяется в водной среде. Большая часть растворенных или суспендированных мелких частиц силикагеля легко

удаляется из образца выпариванием загрязненных фракций до сухого состояния в стеклянном сосуде с последующим растворением образца в подходящем растворителе; при этом кремнезем прилипает к стенкам сосуда и остается на них [118].

Всегда, независимо от того, используется модифицированная или немодифицированная фаза, необходимо учитывать следующие моменты.

□ Название привитой функциональной группы не обязательно описывает действительную химию поверхности модифицированной фазы для ЖХ, например аналитические и препаративные C_{18} -насадки могут очень сильно отличаться по селективности в зависимости от методов предварительной обработки исходного материала, синтеза, обработки после прививки, приведения колонки в равновесие и ее истории.

□ Следует использовать насадки, одинаковые по качеству (от партии к партии), свободные от поверхностных загрязнений.

□ Если требуется очистка, то ее надо выполнить неdestructивным, экономически оправданным способом непосредственно перед использованием.

□ Остерегайтесь изменений в селективности насадки при промывке и в процессе использования, вносите соответствующие поправки в условия разделения при последующих пробегах и (или) заменяйте насадку на свежую.

1.6.1.1.4. Загрязнения в неподвижной фазе. Так же как образец может быть загрязнен неподвижной фазой, неподвижная фаза может быть загрязнена образцом и (или) подвижной фазой. При использовании больших колонок загрязнения неподвижной фазы вызывают серьезные трудности. Если насадка колонки не может быть «очищена» эффективно и возвращена к ее начальному состоянию непосредственно в колонке или в результате ее обработки после удаления из колонки, то часть или всю насадку следует выгрузить и заменить. Это удорожает процесс и увеличивает время простоя установки. Стоимость очистки и регенерации колонки часто может быть выше, чем стоимость замены насадки, если для удаления сильно удерживаемых загрязнений, влияющих на селективность и (или) емкость (см. разд. 1.6.2.2.3), требуются большие количества дорогого растворителя.

Общие причины загрязнения неподвижных фаз и способы их устранения:

□ Адсорбция воды из влажной подвижной фазы или растворителя, в котором находится образец, на сухой активной поверхности (например, силикагеля или оксида алюминия) — один из наиболее общих видов загрязнения неподвижной фазы; может потребовать увеличения времени для уравнивания колон-

ки, даже если вначале использовать свежую колонку. Если возможно, лучше всего использовать неподвижную фазу, которая уже содержит небольшие количества воды (например, 3—5 масс. % силикагеля) [64]. Для приготовления подвижных фаз и растворов образцов используйте органические растворители, содержащие небольшие количества воды. Количества воды, присутствующего в обычных растворителях квалификации «для жидкостной хроматографии», обычно достаточно [66]. Это способствует уравниванию колонки и хорошей воспроизводимости разделения. Если требуется сверхактивная неподвижная фаза для разделения очень неполярных соединений, то следует использовать чрезвычайно сухие материалы, получаемые путем обработки подходящими веществами, чувствительными к влаге. Неподвижную и подвижную фазы, возможно, после использования, следует удалить, если невозможно поддерживать влажность на необходимом уровне или если средства реактивации разделительной системы дороги или требуют большого времени. В некоторых ситуациях может быть желательнее найти альтернативный способ разделения, который устраняет необходимость использования неподвижных фаз высокой активности.

□ Необратимое связывание растворимых, более сильно удерживаемых компонентов образца на насадке при условиях элюирования. Эти вещества могут вымываться или не вымываться из насадки более сильными элюентами (см. ниже разд. 1.6.2.1.2 в связи с понятием «элюирующая сила»). Такие вещества лучше всего удалить на стадии предварительной адсорбционной очистки до проведения препаративного ЖХ-разделения.

□ Засорение пор частиц и промежуточного пространства между частицами, а также устройств, удерживающих насадку (фильтры-фритты, сетки и т. д.), нерастворимыми частицами или коллоидным материалом матрицы образца. Последние следует удалять до разделения с помощью соответствующей эффективной стадии фильтрации.

□ Осаждение одного или большего числа компонентов образца внутри слоя. Это может быть связано с введением образца в растворитель, отличным от подвижной фазы (см. разд. 1.6.2.2.6), или с разделением на зоны внутри колонки определенных компонентов образца, один из которых способствовал растворимости другого. Это иногда наблюдается при разделении природных продуктов [119]. В первом случае можно избежать загрязнения, если проверить растворимость путем смешивания части вводимого раствора с подвижной фазой до проведения препаративного ЖХ-разделения. Последняя ситуация трудно предсказуема. В этом случае лучшим руководством служит опыт работы с аналогичными образцами.

□ Микробные заражения, связанные с природой образца и (или) фазы. Этого можно избежать одним из следующих средств: уменьшить время разделения, добавить подходящие ингибиторы в колонку в процессе использования и (или) хранения, поддерживать стерильные условия в процессе разделения или разгружать колонку после ее использования вместо того, чтобы ее хранить и использовать повторно.

□ Реакция одного или большего числа компонентов с насадкой (например, образование шиффовых оснований) или каталитическое разложение введенных компонентов образца под действием насадки (например, реакции конденсации альдегидов или кетонов, инициируемые сухим активным оксидом алюминия) с последующей необратимой адсорбцией высокомолекулярных продуктов разложения. Этих ситуаций следует избегать путем предварительного рассмотрения потенциальных химических осложнений. Затем или следует поддерживать скорость потока высокой и время пребывания в колонке коротким и добавлять ингибиторы реакции в подвижную фазу, или, если возможно, использовать неподвижные фазы, которые не могут вызывать или ускорять такие реакции.

1.6.1.2. Физические свойства

В идеале случайные блуждания молекулы растворенного вещества через хроматографический слой должны быть эквивалентны по пути и скорости (поэтому по времени) блужданию любой другой идентичной молекулы в том же слое [39]. Конечно, этот идеал недостижим на практике. На основе современного состояния приготовления частиц и методов заполнения ими хроматографических слоев невероятно, чтобы идеальное блуждание было когда-либо достигнуто в хроматографическом слое, полученном на основе частиц. Однако пока лучшего способа нет, и использование таких слоев остается удобным путем осуществления хроматографии. Ключевыми характеристиками при создании слоев препаративной ЖХ являются: размер частиц, форма, пористость (размер пор, форма и распределение по размерам), доступная площадь поверхности, механическая прочность, стоимость и доступность.

1.6.1.2.1. Размер частиц, форма и плотность. В разд. 1.4.3.2 обосновывалось важное значение диаметра частиц насадки для собственной эффективности колонки. Следует помнить, что, хотя удобно иметь дело с единственным численным значением для d_p при его использовании в различных уравнениях, реально d_p представляет *распределение частиц по размеру*, или набор диаметров. Многие исследователи опытным путем нашли, что оптимальным компромиссом между эффективностью колонки

и стоимостью насадки являются материалы, в которых размер самых малых и самых больших частиц меняется не более чем в 1,5—2 раза (для $d_p \leq 15$ —20 мкм), например 8—12, 10—15, 20—40, 50—100 мкм и т. д. ([20] и цитированные там работы). Следует быть осторожным при интерпретации результатов, опубликованных в литературе, поскольку они зависят в большой степени от экспериментальных условий, методики заполнения колонки, конструкции колонки — важных переменных, которые не всегда контролируются подходящим способом (см. разд. 1.7.1).

Форма частиц, их плотность и механическая прочность определяют проницаемость колонки (сопротивление потоку, противодавление), а также стабильность слоя и его эффективность. Хотя обычно частицы группируют в два класса: *нерегулярные* и *регулярные* (например, сферические), имеется почти столько же форм частиц, сколько типов частиц. Например, нерегулярные частицы силикагеля имеют форму осколков стекла. Овально сглаженные частицы силикагеля могут быть получены путем удаления острых углов нерегулярных частиц; сферические или сфероидальные (овальные) частицы силикагеля обычно получают путем непосредственного синтеза. Гидроксиапатит имеет форму плоских пластин, хотя некоторые новые модификации имеют сферическую или сфероидальную форму. Целлюлоза может быть в форме волокон, микросталлических стержней или сфер. Частицы пористых полимеров могут представлять шары в форме лопнувших от нагревания кукурузных зерен или их регулярные фрагменты после размола.

Очевидно, что плотноупакованный слой из плоских пластинок минимальной пористости будет обладать очень небольшим промежуточным объемом, через который смогла бы протекать подвижная фаза. В такой колонке ΔP намного больше и выход в препаративной ЖХ строго ограничен в результате необходимости уменьшения скорости потока. Такие же ограничения скорости возникают при использовании колонок, заполненных рыхлыми, крошащимися, хрупкими, ломкими или сжимаемыми материалами. В таких случаях по мере увеличения скорости потока ΔP возрастает экспоненциально (нормально ΔP возрастает прямо пропорционально скорости потока) благодаря потере промежуточной емкости в результате сжимаемости частиц и дрейфа наиболее мелких частиц или их фрагментов, что обычно происходит при упаковке колонки или работе слоя при высоких скоростях потока. По этим причинам для препаративных и микропрепаративных ЖХ-разделений предпочитают насадки с хорошей механической прочностью и частицами более круглой формы (в противоположность плоским или нитевидным). Доступные насадки, отвечающие требованиям прочности формы и воспроизводимой селективности, обычно готовят из неоргани-

ческих материалов, таких, как оксид кремния и оксид алюминия, или сильносшитых органических полимеров, таких, как сополимер стирола с дивинилбензолом [7].

В тех случаях когда d_p меньше 10—15 мкм, считают, что сферические частицы имеют преимущество, так как их легче упаковать в эффективные слои (хотя достоинством является также более высокая плотность частиц, обычно типичная для сферических материалов) и получить слои с меньшим сопротивлением потоку. С ростом d_p легкость упаковки начинает больше зависеть от плотности частиц и меньше от формы частиц, и перепад давления становится несколько менее критичной переменной. Для получения оптимальной проницаемости слоя перед использованием наиболее мелкие частицы, конечно, должны быть удалены из насадки для препаративной колонки.

Монодисперсные насадки с вариацией d_p , меньшей чем 10—20%, вероятно, более дороги в производстве, но они могут уменьшить сопротивление потоку в слоях, где ΔP является критичным. Они могут также способствовать успеху при заполнении колонок частицами с $d_p \leq 10$ мкм. Однако при хорошей методике заполнения частицами большего размера для препаративного разделения более широкое распределение d_p может дать эквивалентную, если не более высокую, собственную эффективность, вероятно, из-за того, что число свободных мест и каналов и ширина каналов между большими частицами уменьшается за счет перемешивания с малыми частицами, что делает скорость потока между частицами более однородной по слою [120, 121]. Необходимы некоторые контрольные эксперименты с использованием новых доступных насадок и оборудования для того, чтобы проверить эту гипотезу. К сожалению, имеющиеся в литературе различные экспериментальные материалы по тем или иным причинам неубедительны.

Большие слои, образованные из нерегулярных частиц с $d_p \geq 20$ мкм, имеют эквивалентную хроматографическую эффективность, такую же, что и слои из сферических частиц, но они значительно дешевле. Однако сферические частицы, возможно, имеют несколько большую механическую устойчивость к дополнительной массе насадки, когда возрастает высота слоя, и меньшее истирание частиц при возрастании скорости потока. Однако эти свойства следует экспериментально проверить, прежде чем покупать более дорогой насадочный материал.

1.6.1.2.2. Размер и объем пор, удельная площадь поверхности. Роль пористой структуры частиц неподвижной фазы в хроматографическом процессе до сих пор остается не вполне ясной. Главная часть поверхности объема пор насадки обычно зависит от наличия в матрице пор наименьшего размера (меньше 40 Å

в диаметре). К сожалению, такие поры наименее полезны для хроматографического разделения [50]. Они обычно недоступны для реагентов, используемых для модификации поверхности, и поэтому вносят дополнительный вклад в гетерогенность модифицированной поверхности частиц насадки.

Были описаны различные формы пор, такие, как «бутылкообразная форма», в виде «пузырей», «каналов» и т. д. Математическое описание пор, имеющих некруглое сечение, — более трудная задача, обычно требующая упрощающих допущений. Поры могут быть сообщающимися внутри матрицы или изолированными в виде отдельных ячеек. Независимо от формы пор и их сообщения между собой они будут недостижимы для молекул образца в подвижной фазе до тех пор, пока не выйдут на поверхность и не образуют часть доступной поверхности частиц. Таким образом, только небольшая часть пор действительно участвует непосредственно в процессе разделения [122—123]. Понимание этого привело к разработке для аналитической ЖХ поверхностно-пористых неподвижных фаз и полностью пористых частиц малого диаметра, у которых длина диффузионного пути молекул образца внутрь пор и из них в неподвижную фазу сведена к минимуму ([42] и цитированные там ссылки).

В препаративной хроматографии, где важна более высокая емкость, больший размер частиц, большая удельная поверхность, обычно используют полностью пористые насадки. При использовании таких материалов, однако, наиболее вероятно, что некоторые молекулы могут диффундировать достаточно глубоко в частицу матрицы, попасть в ловушку и не выйти наружу за время, достаточное для того, чтобы вместе с оставшимися молекулами зоны образца продвигаться дальше. В лучшем случае это обусловит дополнительное размывание зоны, в худшем — приведет к необратимой адсорбции и загрязнению неподвижной фазы. Для препаративных насадок для ЖХ, изготовленных на силикатной основе, наилучшим компромиссом между размером пор, доступной поверхностью и емкостью образца при разделении малых органических молекул, по-видимому, является: $<10\%$ — меньше 50 Å, $\geq 50\%$ — больше 80—90 Å (см. ниже); удельная поверхность 200—350 м²/г (БЭТ, адсорбция азота) [124]. Этим условиям не отвечают традиционные недорогие с большим размером частиц нерегулярные силикагели, которые использовались в течение многих лет в препаративной ЖХ низкого давления. Эти насадки получали из силикагеля, предназначенного для сушки. Такой силикагель был дешев, производился в больших промышленных масштабах и был оптимизирован для адсорбции воды в большом количестве мелких пор ($\ll 50$ Å) и соответственно имел высокую удельную поверхность (400—700 м²/г и выше) [50].

Разделение больших молекул, таких, как полипептиды и белки за счет гидрофобных взаимодействий на материалах, основанных на силикагеле, требует иных свойств насадки.

В аналитических разделениях, по-видимому, используют три диапазона пористости:

а) $\geq 50\%$ пор больше 150—200 Å; удельная поверхность 20—100 м²/г [125];

б) $\geq 50\%$ пор меньше 50 Å; удельная поверхность 400 м²/г [125];

в) материал почти полностью непористый, объем пор меньше 0,05 мл/г; удельная поверхность $\ll 10$ м²/г [126, 127].

В первом случае размеры пор достаточно велики для осуществления межмолекулярных взаимодействий с внутренней поверхностью пор. Во втором и третьем случаях все взаимодействия, очевидно, происходят на внешней поверхности частиц. Любое влияние силанофильных взаимодействий практически отсутствует, что указывает на то, что большие молекулы растворенных веществ не проникают внутрь пор и не взаимодействуют с поверхностью очень малых пор. В последнем случае для достижения большей емкости и большей удельной поверхности размер частиц должен быть уменьшен до необычно малых размеров (примерно 1—2 мкм), что непрактично для обычных препаративных крупномасштабных ЖХ-разделений, использующих типичную геометрию колонок и оборудование. Таким образом, подход (а), возможно, оптимален для получения высокой емкости. Для чрезвычайно больших лабильных молекул ($M > 10^6$) подходы (б) или (в) (использование частиц подходящего размера), может быть, является наилучшим даже несмотря на то, что емкость по необходимости ограничена. Во всех трех диапазонах уменьшение размера частиц способствует улучшению массообмена больших молекул между фазами и при этом улучшает разделительную эффективность. Наилучшей системой для препаративного ЖХ-разделения биомолекул с высокой молекулярной массой часто является градиентное элюирование на колонках большого диаметра и малой длины, заполненных частицами с малым d_p .

1.6.1.2.3. Выбор фаз на основе соотношения размера пор и объема. Для того чтобы сделать заключение или предсказать результат разделения на основе измерения размера пор и (или) объема пор, информация должна соответствовать действительной ситуации. К сожалению, часто дело обстоит не так. Так же как размер частиц насадки, размер пор не может быть точно представлен единственной величиной, а скорее представляет область распределения по размерам. Одним из предпочтительных методов измерения объема пор и расчета распределения

пор по размерам служит метод ртутной порометрии, хотя его возможности распространяются и на поры намного меньшего размера, чем поры, участвующие в хроматографическом процессе. Зная поверхностное натяжение и контактный угол смачивания для ртути на поверхности исследуемого материала и предполагая цилиндрическую форму пор, можно рассчитать средний диаметр пор [122]. При сравнении различных неподвижных фаз для ЖХ отсутствуют общепринятые стандарты и объективные методы интерпретации данных порометрии и рассчитанных из них данных о распределении пор по размерам. Недавно предложен метод «10-50-90» [128, 129], в котором в качестве базы для сравнения берут три следующие точки на кривой ртутной порометрии:

1) значение нижнего предела (10% объема пор остается в порах меньшего размера, чем это значение);

2) номинальное значение размера пор (50% объема присутствует в порах большего размера и 50% — в порах, меньших, чем это значение);

3) значение верхнего предела (10% объема пор присутствует в порах большего, чем это значение). Например, две силикагелевые насадки с близкими значениями площади поверхности, обозначенные фирмой-производителем как «100 Å», могут в действительности иметь соответствующие «10-50-90»-распределения пор по размерам 60—90—175 Å и 50—80—300 Å. Это говорит о том, что первая насадка была бы наилучшей для разделения малых молекул при использовании адсорбционного механизма; второй материал мог быть более подходящим для разделения молекул большего размера и для разделения, основанного, по крайней мере частично, на механизмах распределения и ситовом.

В то время как *доступная поверхность* является критическим параметром, определяющим емкость при адсорбционном разделении, *доступный объем пор в подходящем диапазоне размера пор* определяет емкость ситовых *гель-проникающих* процессов. Хотя в ситовой хроматографии используют подвижные фазы, которые служат хорошими растворителями для разделяемых образцов, концентрация образца может быть ограничена вязкостью вводимого раствора, а нагрузка — доступным объемом пор, если необходимо достичь разделения близких соединений [130—134]. По сравнению с адсорбционной и распределительной хроматографией в ситовой хроматографии емкость может быть ниже в случае трудных разделений, но больше для грубых разделений, таких, как обессоливание или удаление низкомолекулярных добавок из полимерной матрицы.

Так как в ситовой хроматографии молекулы разделяются в соответствии с их размером в растворе, возможно использо-

вать молекулярные стандарты известного размера для измерения размера пор в насадках для ситовой хроматографии. Этот метод, известный как *обращенно-ситовая* (обращенная гелепроникающая) *хроматография*, лучше оценивает распределение пор по размерам для тех пор, которые в действительности участвуют в хроматографическом процессе. Хотя результаты измерений с помощью обращенно-ситовой хроматографии еще не имеют достаточно хорошей корреляции с данными порометрии и могут меняться для данной насадки в зависимости от типа подвижной фазы и используемых стандартов, они все же обнаружили много различий между действительными размерами пор и значениями, приведенными в опубликованных спецификациях для номинального размера пор многих неподвижных фаз для ЖХ [135]. Поэтому следует подчеркнуть два важных момента:

□ Современные аналитические методы не дают возможности непосредственно измерять параметры, позволяющие оценивать характеристики неподвижных фаз для ЖХ, например их поверхность, доступную для растворенного вещества в хроматографическом процессе. Большая часть информации получена косвенным путем с помощью корреляций и предположений.

□ Известные номинальные значения размера частиц, размера пор и площади поверхности обычно не могут служить физической основой для механического понимания и сравнения качества хроматографических систем.

1.6.2. Подвижная фаза

Подвижная фаза является компонентом системы, который наиболее просто изменяется хроматографистом, когда он оптимизирует α для препаративного ЖХ-разделения. Однако часто эти возможности при разработке новых разделений не принимаются во внимание в угоду испытанным и надежным методам. Так же как в случае выбора неподвижной фазы, необходимо учитывать практические и экономические соображения при выборе растворителей и модификаторов, обеспечивающих необходимое разделение. Критическим моментом, особенно при крупномасштабных разделениях, является безопасность работы с растворителем.

1.6.2.1. Химические и физические свойства

1.6.2.1.1. Общие вопросы. Аналитическая и препаративная ЖХ предъявляют существенно различные требования к основным свойствам растворителя. Некоторые из них приведены в табл. 1.6. В большинстве случаев лучшие растворители для приготовления смесей, используемых в качестве подвижной фа-

Таблица 1.6. Сравнение требований к растворителям в аналитической и препаративной ЖХ

Характеристика растворителя	Аналитическая ЖХ	Препаративная ЖХ
Точка кипения	Должна быть достаточно высокой для предотвращения закипания в головках насоса или изменения состава подвижной фазы из-за испарения низкокипящего компонента	Должна быть достаточно низкой для облегчения выделения образца путем испарения растворителя (азетропная однократная перегонка может помочь в случае некоторых соединений с более высокой точкой кипения)
Поглощение в УФ-области	Критично для оптимальной чувствительности и работы детекторов для УФ- и видимой области спектра, особенно при коротких длинах волн	Не имеет значения, если не используется для слежения за разделением или проверки фракций до удаления растворителя
Показатель преломления	Для максимальной чувствительности выбирают растворитель с n , максимально отличным от n главного (главных) компонента	Для минимальной чувствительности при больших нагрузках выбирают растворитель с показателем преломления, близким к n соединения, присутствующего в больших концентрациях
Вязкость	Должна быть как можно меньшей для получения наивысшей эффективности (оптимальные массообмен и скорость диффузии и малые ΔP)	Те же требования, что и для аналитической ЖХ. Важна также для типа потока (ламинарный или турбулентный) вне колонки, см. «Плотность»
Плотность	Более плотные растворители требуют меньшей высоты напора над входом в насос. Не всегда является критичным моментом	Отношение плотности к вязкости важно для ΔP в трубопроводах (см. разд. 1.7.2.1)
Чистота	Любые летучие и нелетучие примеси, влияющие на работу детектора или колонки, должны быть удалены. Нелетучие остатки не критичны. Рекомендуется использовать квалификацию «для ВЭЖХ»	Летучие примеси допустимы, если они не влияют на работу колонки и могут быть легко удалены упариванием из фракций образца. Содержание нелетучих остатков должно быть чрезвычайно малым. Рекомендуется перегонка в стеклянной аппаратуре растворителей квалификации «реактив»

зы в препаративной ЖХ, должны иметь следующие свойства: низкие температуры кипения для легкого, экономичного и мягкого выделения образца из растворителя; минимальную вязкость для обеспечения минимального противодавления и максимальной эффективности колонки; низкую стоимость; низкий уровень нелетучих загрязнений для минимального загрязнения образца; химическую инертность, чтобы не вызывать модификацию компонентов образца или неподвижной фазы; химическую стабильность для того, чтобы не было необходимости использовать стабилизаторы или не происходило разложения в процессе использования, ведущего к дрейфу времен удерживания, и (или) селективности или к возникновению опасности; хорошую растворяющую способность для обеспечения максимальных нагрузок; низкую воспламеняемость и токсичность для максимальной безопасности при хранении и использовании. Природа не осчастливила нас ни одним-единственным растворителем, который бы обладал всеми этими свойствами, но некоторый набор растворителей, которые можно использовать для препаративной ЖХ, и отдельные их свойства приведены в табл. 1.7.

1.6.2.1.2. Элюирующая сила. Относительную способность какой-либо подвижной фазы вытеснить данный компонент образца из неподвижной фазы по отношению к другой подвижной фазе обычно обозначают как «элюирующая сила». Элюирующая сила зависит от многих факторов, включая природу функциональных групп в каждом растворителе, полярность растворителя, дипольный момент, способность к образованию водородных связей, многообразие специфических и дисперсионных молекулярных сил и другие параметры, описывающие физико-химическую природу каждого компонента подвижной фазы (см. работы [40—43, 47, 138—139] и ссылки, цитированные в них). Поскольку это те же параметры, которые используют для объяснения растворяющей способности растворителей по отношению к данному соединению, то, очевидно, что элюирующая сила и растворимость тесно связаны. Не обращаясь к сложным теориям и таблицам параметров, хроматографист часто может на основе знаний растворимости и взаимодействий функциональных групп предсказать элюирующую силу подвижной фазы и селективность в данной системе разделения.

Классифицируя растворители или смеси растворителей в соответствии с возрастающей элюирующей силой на данной не-

Таблица 17. Свойства некоторых растворителей, рекомендуемых для ЖХ^а

Растворитель	k'	$T_{\text{кип}}$	η	ρ	n	УФ	ПДК	ОС
<i>n</i> -Гексан	0,00	69	0,31	0,66	1,375	195	100	1,5
2,2,4-Триметилпентан (изооктан)	(0,0)	99	0,50	0,69	1,391	215	500	1,8
Циклопентан	(0,05)	49	0,44	0,74	1,406	200	600	2,1
1,1,2-Трихлоро-1,2,2-трифторэтан	(0,1)	48	0,71	1,56	1,356	231	1000	3,3
Толуол	1,20	111	0,59	0,87	1,497	284	100	1,3
Дихлорометан (метиленхлорид)	1,30	40	0,44	1,33	1,424	233	100	1,1
Этилацетат	87,3	77	0,45	0,90	1,372	256	400	1,7
Метил-трет-бутиловый эфир	(90)	55	0,27	0,74	1,369	210	(400)	2,1
Ацетон	156	56	0,36	0,79	1,359	330	750	1,2
Тетрагидрофуран	160	66	0,55	0,89	1,407	212	200	2,8
Ацетонитрил	(170)	82	0,38	0,78	1,344	190	40	2,9
Изопропанол (2 пропанол)	193	82	2,4	0,79	1,377	205	400	1,3
Этанол (этиловый спирт)	377	78	1,2	0,79	1,361	(195)	1000	1,4
М-танол (метиловый спирт)	546	65	0,55	0,79	1,328	205	200	1,0
Вола	1146	100	1,0	1,0	1,333	190	—	1,1
Уксусная кислота	8430	118	1,2	1,1	1,372	—	10	—

^а k' — коэффициент емкости в гептане на силикагеле [136] $T_{\text{кип}}$ — температура кипения (°С); η — вязкость (сП при 20 °С), ρ — плотность (г/мл при 20 °С), n — показатель преломления при 20 °С. УФ — длина волны, при которой поглощение равно 1 для оптического пути 1 см. ПДК — предельное пороговое значение концентрации в воздухе (10⁻⁶%), безопасное для ежедневной работы в течение 8 ч (установлено Национальным институтом профессиональной безопасности и здравоохранения США). ОС — стоимость растворителя квалификации «для ВЭЖХ» по отношению к стоимости метанола.

Значения, приведенные в скобках, носят оценочный характер и могут быть не точны. Проверки указывают, что отсутствует доступная информация. Данные взяты из различных источников, см. например, [137].

1.6. Выбор препаративной системы разделения

89

подвижной фазе, получают так называемые элюотропные ряды. Список, приведенный в табл. 1.7, образует элюотропный ряд для силикагеля. Растворители расположены в порядке возрастающей величины их k' на силикагеле; в качестве подвижной фазы использован гептан. Это служит мерой их относительного сродства к неподвижной фазе [136]. Так как силикагель является полярным материалом, способным к образованию водородных связей и ионообменным взаимодействиям, последовательность в этом элюотропном ряду отражает также возрастающую полярность и гидрофильность перечисленных растворителей от алкилуглеводородов через сложные эфиры к спиртам и воде и т. д. В зависимости от метода, использованного для определения элюотропного ряда, может происходить некоторое изменение в положении растворителей [50]. Важным является то, что существует относительное сродство подвижной фазы к растворенному веществу и неподвижной фазе; никакой единственный элюотропный ряд не учитывает при всех условиях оба обстоятельства одновременно.

Сила элюента — важный фактор при объемной перегрузке (ср. разд. 1.4.3.2 и 1.5.1.1.4 и работы [24—26, 141—143]). В сочетании с данной неподвижной фазой она определяет массовый коэффициент распределения (D_m) или коэффициент емкости k' компонентов образца. Так как ЖХ является динамическим процессом, миграция образца начинается с момента входа молекул образца в хроматографический слой в процессе ввода пробы. Если при соответствующей концентрации (см. разд. 1.5.1.1.4) необходимо ввести большой объем раствора, чтобы загрузить весь образец на колонку, то более быстрое движение компонентов с низким значением k' будет давать много большую ширину полосы внутри слоя, чем они могли бы дать в случае большей концентрации образца и меньшего его объема. Это приводит к расширению полосы и меньшей разделительной эффективности (см. рис. 1.9).

Эффекты, аналогичные эффектам объемной перегрузки, могут дать два других обстоятельства. Во-первых, к ним может привести препаративное ЖХ-разделение в случае, когда вводимый образец растворен в другой смеси растворителей, более сильной, чем подвижная фаза (см. разд. 1.6.2.2.6). Во-вторых, аналогичный эффект может иметь место при проведении грубого выделения с помощью ступенчатого градиента следовых компонентов из матрицы образца. В случае *обогащения примесей* возможная проблема заключается не в потере разделительной эффективности, так как механизм разделения больше напоминает фронтальное вытеснение, чем элюотропное проявление. Трудность скорее заключается в том, что полоса расширяется до такой степени, что проскок образца, т. е. появление компонен-

та на выходе из колонки, происходит прежде, чем весь образец будет введен в колонку [42, 144] (см. также разд. 1.7.4).

Нет простого правила, которому можно следовать при предсказании объемной перегрузки, поскольку масса образца, его концентрация, коэффициенты емкости, используемые в данной системе разделения, а также природа растворителя, в котором вводится образец, — все влияет на разделительную эффективность. Если $k' \leq 5$, попытайтесь, чтобы объем вводимого раствора не превышал примерно 10–20% мертвого объема колонки, как рекомендовано в разд. 1.5.1.1.4. Если k' больше 5, то можно ввести пропорционально больший объем образца и (или) меньшую концентрацию образца. За пределами $k' \approx 10$ можно вводить много большие объемы, но наиболее вероятно, что при этих условиях разделение будет протекать в варианте градиентной твердофазной экстракции или обогащения следовых компонентов.

1.6.2.1.3. Различие в селективности подвижных фаз, обладающих одинаковой элюирующей силой. Для данной комбинации компонента и неподвижной фазы имеются различные подвижные фазы, которые будут элюировать компонент с одним и тем же значением k' . Такие подвижные фазы называют *эквивалентными* (или *изоэлюотропными*) по отношению к данному веществу, так как они идентичны по элюирующей силе. Однако такие элюотропные фазы не будут одинаково селективны по отношению к данной паре разделяемых соединений. Если α измерили в одной подвижной фазе и нашли, что оно меньше, чем оптимальное, то следует испытать другую эквивалентную фазу. Этот подход иллюстрируется диаграммой Неера [140], показанной на рис. 1.28.

При выборе подвижной фазы зачастую эффективен следующий ряд приоритетов:

1) Начинайте, если возможно, с индивидуального растворителя. Это упрощает разделительную систему и позволяет регенерировать растворитель.

2) Если такой растворитель не позволяет получить разрешения, то попытайтесь испытать смесь, состоящую из двух равных частей двух растворителей различного типа (например, на силикагеле попытайтесь попробовать смесь из углеводорода и галогенуглеводорода для разделения довольно неполярных веществ, из углеводорода и простого эфира для умеренно полярных соединений и т. д.). Это упрощает приготовление подвижной фазы и приведение колонки в равновесие.

3) Если α все-таки не является удовлетворительным, попытайтесь использовать бинарную смесь, в которой растворители сильно различаются по индивидуальной элюирующей силе, при-

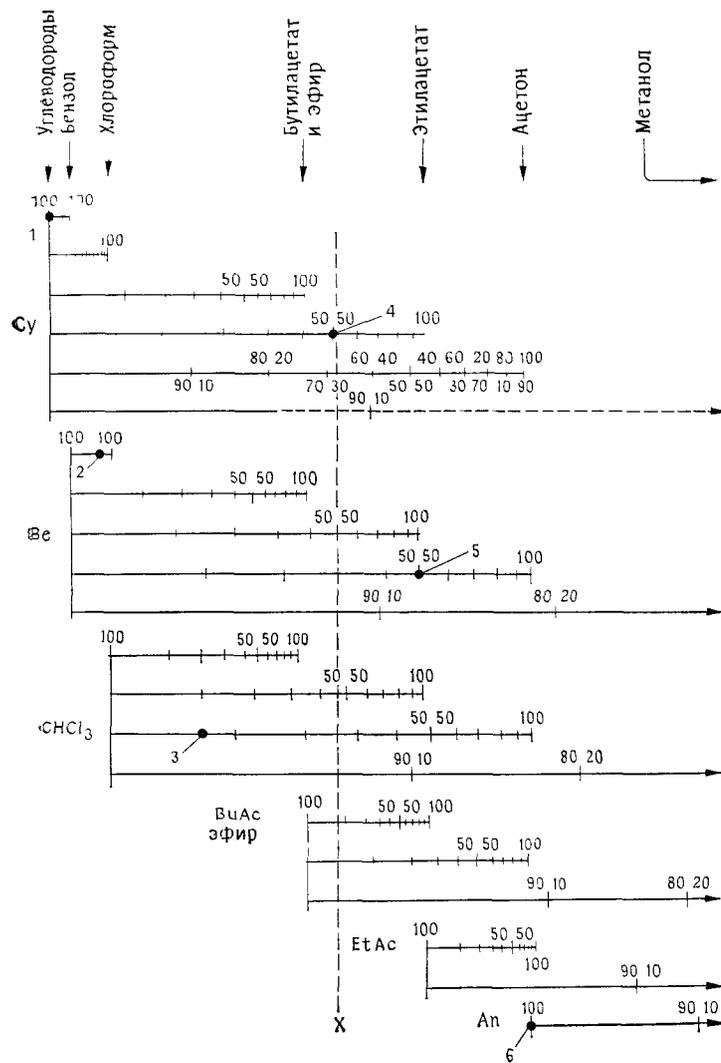


Рис. 1.28 Эквивалентные ряды растворителей по Нееру, полученные из данных по удерживанию в ТСХ для 20 стероидов. Показанные бинарные смеси растворителей нанесены на логарифмической шкале на горизонтальные линии с отмеченными инкрементами 10%. Положение 100% концентрации второго компонента в каждой смеси указано в верхней части таблицы стрелками; точка 100%-ной концентрации первого растворителя на каждой шкале указана вертикальной линией в левой части каждой группы шкал бинарных смесей; 100%-ный метанол находится за пределами правой границы рисунка. Вертикальная штриховая линия, обозначенная x , указывает возможный набор эквивалентных смесей, имеющих состав, соответствующий точке пересечения штриховой линии с соответствующей горизонтальной шкалой [140].

чем один растворитель должен быть взят в большем количестве (>80%). (Например, при разделении на силикагеле попытаться использовать смесь углеводорода с небольшой концентрацией спирта.) Когда концентрация минорного компонента в растворителе уменьшается, особенно когда она становится ниже 5%, требуется особая аккуратность при приготовлении подвижной фазы и приведении колонки в равновесие.

4) Если с помощью бинарной смеси не удастся получить достаточного разделения, попытайтесь использовать тройную систему, используя знания природы образца и (или) методов оптимизации системы для того, чтобы сэкономить время в поисках наилучшей системы [106].

Отметим некоторые общие дополнительные моменты:

□ В адсорбционной и распределительной хроматографии наилучшую селективность обычно достигают при использовании смесей растворителей, резко различающихся по природе, которые по-прежнему взаимодействуют с разделяемыми веществами.

□ Наилучшую селективность часто достигают с подвижными фазами, в которых разделяемые компоненты образца имеют ограниченную растворимость, как, например, в обращенно-фазной ЖХ. Часто это не допускает больших нагрузок, желательных в препаративной ЖХ.

□ В силовой хроматографии дополнительная эффективность может быть достигнута при использовании неподвижной фазы, которая может изменять эффективный размер одного или большего числа компонентов образца в растворе. Например, спирт и алкилгалогенид одной и той же геометрии и молекулярной массы, которые совместно элюируются в толуоле на колонке, заполненной поли(стиролдвинилбензолом), можно разделить в тетрагидрофуране, поскольку гидроксильная группа будет сольватироваться за счет образования водородных связей [145].

□ При поиске оптимальной разделительной системы одним из наиболее мощных из имеющихся в распоряжении средств служит знание химической природы образца. Например, при разделении на обращенной фазе стеринов, различающихся только положением изолированных двойных связей, многие из испытанных бинарных систем оказались неудовлетворительными. Было найдено [146], что оптимальной для разделения на фазе C_{18} является тройная система, состоящая из воды, ацетонитрила и тетрагидрофурана. Логика поиска была простой. Надо использовать в обращенно-фазной системе:

а) гидрофобное взаимодействие между неполярной основой стеринов и углеводородной поверхностью неподвижной фазы;

б) изменение в эффективной геометрии молекул, обусловленное *in situ* сольватацией полярной спиртовой функциональной группы с тетрагидрофураном и ассоциацией ацетонитрила с

л-электронами двойной связи. Таким образом, с помощью интуитивного знания свойств образца и механизма разделения менее чем за час было достигнуто большое значение α . В настоящее время такой результат можно было бы получить с помощью методов рутинной оптимизации с помощью компьютеров, которые становятся коммерчески доступными. Такие рутинные программы будут помогать тем, кто не имеет достаточно опыта хроматографических разделений для того, чтобы найти подходящие условия разделения без большей затраты времени на эмпирические эксперименты.

1.6.2.2. Практические советы

1.6.2.2.1. Чистота растворителя. Ни один из используемых сегодня растворителей не имеет 100% чистоты. Наиболее общей примесью во многих органических растворителях является вода. В дополнение к этому каждый растворитель в зависимости от источника его получения и химической стабильности может содержать различные типы других загрязнений. Например, алифатический углеводород гексан может содержать кроме воды различные количества изомеров C_6 (таких, как метилциклопентан или триметилпентан), ненасыщенные соединения (такие, как 1-гексен или 2-метил-2-пентен), C_5 - и C_7 -алифатические углеводороды и олефины, ароматические углеводороды (такие, как бензол и толуол) и даже более тяжелые ароматические углеводороды (такие, как нафталин) и т.д. [147]. Эти различные соединения, хотя они присутствуют в небольших количествах, могут значительно влиять на некоторые применения ЖХ. Наличие олефинов и ароматических углеводородов в гексане увеличивает как поглощение в УФ-области, так и показатель преломления и поэтому влияет на характеристики детектора. Более высокие концентрации изомеров C_5 и C_6 могут изменить значение k' для неполярных соединений, разделяемых на неподвижных фазах, таких, как оксид алюминия или силикагель. Аналогичным образом вода будет влиять на удержание, не только дезактивируя неподвижную фазу, но и также изменяя природу двух распределительных фаз в ЖХ-системе.

Очистка гексана довольно простая. Олефины и ароматические углеводороды удаляют с помощью обработки концентрированной серной кислотой. При перегонке и сушке удаляются многие другие алифатические соединения и вода. Остается смесь насыщенных C_6 -углеводородов, обычно называемая «гексаны», содержащая определенное количество *n*-гексана (больше 95%, что типично для гексана «валификации «для ЖХ»). Для других важных растворителей, таких, как метанол [148], ацетонитрил [149, 150] и тетрагидрофуран (ТГФ), методы очистки

сложнее [147]. Относительная стоимость (см. табл. 1.7) растворителей квалификации «для ЖХ» отражает различные факторы:

□ сложность методов очистки, которые могут включать одну или более химических стадий до перегонки, удаления воды, фильтрации и стабилизации;

□ стоимость исходного сырья, которая определяется легкостью выделения или синтеза данного растворителя, объемом производства, уровнем потребностей на рынке;

□ время и стоимость проведения различных анализов контроля качества для каждой серии на каждой стадии процесса очистки для обеспечения соответствия спецификации продукта и соответствие его публикуемым рекомендациям, таким, как «Стандарты реактивов Американского химического общества» [151], а также дополнительным требованиям, специфичным для применения в хроматографии.

Можно сэкономить значительные средства, если покупать растворители из разных коммерческих источников, анализируя и подбирая для своих специфических нужд соответствующую марку доступного растворителя, качество которого соответствует техническим условиям данной партии и требованиям к таре. Для микропрепаративных и препаративных ЖХ-разделений подвижные фазы могут быть приготовлены из коммерчески доступных растворителей с достаточной чистотой (реагенты «для ЖХ», «для ВЭЖХ», для синтеза пестицидов, используемые в электронике, спектрометрии, реагенты Американского химического общества, для фармакопии и т. д.). Если разделение выполняется редко и нет времени, желания или возможности очистить растворитель в достаточном количестве, может быть оправдана дополнительная плата за высокое качество растворителя. Экономика крупных препаративных и макропрепаративных ЖХ-разделений может потребовать, чтобы хроматографист купил менее дорогой растворитель в большом объеме и, если необходимо, далее обработал его, перегнав или отфильтровав подходящим образом (см. табл. 1.6). Во многих случаях качество таких растворителей, как «для фармакопии» и «реагенты Американского химического общества», вполне удовлетворительно. Надо иметь в виду, что технические условия для реактивов квалификации «для анализа» (реагент) или «для спектроскопии» должны соответствовать техническим стандартам, установленным такими организациями, как Американское химическое общество (ACS) или Американская фармакопея (USP), однако не существует общих стандартов растворителей с обозначением «для ЖХ», «для ВЭЖХ», «для пестицидов» и т. д. Таким образом, каждый производитель свободен устанавливать свои собственные технические условия для растворителя, обозначен-

ного таким образом. Конкретное обозначение может быть или не быть основано на характеристиках, важных в препаративной ЖХ. Например, квалификация «для пестицидов» обычно включает проверку на наличие соединений, влияющих на отклик электрозахватного детектора в газохроматографическом анализе, что не важно в препаративной ЖХ. Квалификация «для ЖХ» имеет различные значения в случае различных растворителей. Для водорастворимых растворителей, используемых в обращенно-фазной ЖХ, проверяется уровень поглощения в УФ-области или наличие флуоресцирующих загрязнений, которые дают фоновый шум или становятся видны при градиентном элюировании. В случае других органических растворителей более важными факторами, определяющими их маркировку для жидкостной хроматографии, могут быть тип, наличие или отсутствие конкретных стабилизаторов, содержание воды, показатель преломления, особые загрязнения и т. д.

Обычным испытанием чистоты растворителя является газохроматографический анализ. Однако часто эти результаты могут ввести в заблуждение, так как методики газохроматографического разделения не принимают во внимание присутствие некоторых типов нелетучих или высококипящих загрязнений (например, 1,4-бутандиола — продукта гидролиза пероксида, присутствующего в ТГФ). Стандарты Американского химического общества часто рекомендуют определять уровень кислотных или щелочных материалов, присутствующих в растворителе, с помощью титрования. Кислотно-основное титрование не является достаточно чувствительным, например, для контроля низкого уровня примеси аминов в метаноле (образующихся в одном из промышленных процессов, используемом для получения метанола), которая, однако, легко детектируется по характерному запаху. В этом и других случаях важно то, что при использовании больших объемов растворителя в препаративной ЖХ загрязнения, присутствующие в небольших концентрациях, могут концентрироваться на неподвижной фазе и вследствие этого изменять характеристики удерживания и форму полосы различных растворенных веществ в процессе использования насадки колонки (см. также разд. 1.6.1.1).

Одним из технических условий, приведенных в табл. 1.6, которое более существенно для препаративной, чем для аналитической хроматографии, является требование к остатку после испарения. Так как полученное соединение часто выделяют из элюата путем упаривания растворителя из разбавленных растворов, то летучие остатки, присутствующие в подвижной фазе или элюированные из неподвижной фазы, всегда вызывают затруднения. Вероятно, наиболее чистый в этом отношении растворитель, который можно купить, — это 1,1,2-трихлор-1,2,2-

трифтороэтан. Материал квалификации «реагент» по существу не содержит детектируемых остаточных веществ и значительно-го количества загрязнений. Он также нелетуч, относительно-нетоксичен и имеет низкую температуру кипения, т. е. все свойства, подходящие для препаративной ЖХ [152, 153]. Растворители квалификации «реагент» часто можно закупить по более низкой цене оптом, затем для удаления нелетучего остатка подвергнуть однократной перегонке, при этом можно получить подходящий для препаративной ЖХ растворитель по цене, более низкой, чем растворитель квалификации «для ЖХ». В настоящее время растворители, очищенные таким способом, можно купить в больших количествах по подходящей цене.

1.6.2.2.2. Приготовление подвижной фазы. Для того чтобы обеспечить воспроизводимость, подвижные фазы лучше всего готовить путем отдельного взвешивания каждого компонента и последующего количественного смешивания. В некоторых случаях объемное дозирование может быть более удобным, но требует больше тщательности и внимания для достижения воспроизводимых результатов [154]. В прошлом взвешивания больших количеств растворителей было более удобно производить на промышленных весах не в лабораториях, а в заводских помещениях. В настоящее время, в связи с широким распространением и доступностью по умеренной цене многокилограммовых электронных весов, весовой способ приготовления подвижных фаз стал не только желательным, но и более простым, как в препаративной, так и в аналитической ЖХ.

Из-за различия объемных свойств, таких, как показатель преломления в разных партиях растворителя, желательно начинать препаративное ЖХ-разделение, имея *достаточно большой* резервуар для того, чтобы он мог содержать объем подвижной фазы (даже, если она состоит из одного компонента), достаточный для того, чтобы смочить колонку, привести ее в равновесие и полностью элюировать необходимые компоненты образца из колонки. Важно также обеспечить постоянное перемешивание подвижной фазы в резервуаре с тем, чтобы не образовывался градиент состава или объемных свойств, вызывающих непрерывное изменение в разделительной системе в процессе данного разделения. Следует выполнять смешивание таким образом, чтобы не увеличить заметно концентрацию растворенного газа в подвижной фазе.

Необходимость удаления растворенных газов зависит от характеристик системы подачи растворителя и детектирующей системы. В случае необходимости обычно желательно дегазировать индивидуальные растворители до их смешивания при приготовлении раствора подвижной фазы. Некоторые обычные ла-

бораторные методы дегазирования подвижной фазы могут привести к изменению ее состава, происходящего обычно в результате селективного испарения растворителей с более низкой точкой кипения. Это может значительно изменить разделительную систему. Часто такое происходит с обычными фазами в обращенно-фазной хроматографии. Для нескольких литров и меньшего количества любого растворителя удобно использовать комбинацию вакуума и ультразвукового озвучивания в течение короткого периода времени. Это приводит к быстрому удалению больших количеств растворенного газа в растворе. Для больших количеств может быть более удобно пропускать быстро растворитель через устойчивые к растворителю микропористые мембраны, тонкие фильтры или малые отверстия под давлением; быстрая декомпрессия растворителя на выходе из малых каналов обычно приводит к дегазации, достаточной для последующего использования подвижной фазы в препаративной ЖХ. Особой проблемой является дегазирование воды, которая легко растворяет газы. Ее следует тщательно дегазировать заранее, особенно при использовании в смеси с другими органическими растворителями в обращенно-фазных системах. Газы больше выделяются при смешивании воды со спиртом, чем с ацетонитрилом, имеющим отрицательную теплоту растворения в воде, в результате чего смесь охлаждается. Подвижная фаза должна находиться при достаточно постоянной температуре. Это требование становится более критичным для распределительных ЖХ и ионообменных систем, а также при использовании чувствительных к изменению температуры детекторов. Следует помнить, что первоначальное смачивание в колонке сухого слоя, содержащего активные гидрофильные насадки (например, оксид кремния, оксид алюминия, ионообменные материалы, ионообменные смолы), может привести к значительному выделению тепла, обусловленному адсорбцией следов воды неподвижной фазой. Это количество тепла достаточно для дегазирования, даже закипания некоторых растворителей, таких, как хлорометан. С помощью постоянно протекающей подвижной фазы теплота будет вскоре отведена, но потребуются достаточно большое время для того, чтобы привести систему в равновесие как по составу, так и по температуре. Следует также предусмотреть при необходимости отвод выделяющегося газа и воздуха, вытесняемого из системы, заполненной первоначально сухой насадкой.

1.6.2.2.3. Уравновешивание колонки. Так как первоначальное введение элюента в хроматографический слой обычно приводит к некоторому изменению физико-химического состояния как неподвижной, так и подвижной фаз, то прежде, чем приступить к разделению, следует предусмотреть меры для того, чтобы две

взаимодействующие фазы достигли стабильных условий, при которых они будут работать. Не всегда, чтобы получить хороший результат, необходимо достижение истинного термодинамического равновесия. Фактически для получения воспроизводимых хроматографических разделений в некоторых случаях нет даже необходимости полной пропитки всего объема пор насадки подвижной фазой или полного смачивания слоя. При использовании детектора стабильный сигнал (нулевая линия) при подходящей чувствительности обычно указывает на равновесие между элюентом и насадкой (см. разд. 1.6.2.2.4). При отсутствии детектора для того, чтобы определить, когда система готова для проведения препаративного опыта, обычно полагаются на эмпирические соотношения между методикой уравнивания и полученными ранее успешными разделениями.

Достижение равновесия может занимать от нескольких минут до нескольких часов в зависимости от многих факторов, включая состав подвижной фазы, скорость потока, природу неподвижной фазы, размер слоя в колонке и метод разделения. На основе опыта [66] получены следующие общие рекомендации, пригодные для различных ситуаций, встречающихся в уравнивании разделительной системы:

а) если подвижная фаза состоит из одного или большего числа компонентов, причем каждый из них присутствует в количествах, больших или равных примерно 10% смеси, то обычно равновесие достигается очень просто. После первоначального смачивания колонки отбрасывают 3—4 мертвых объема элюата. Затем рециркулируют растворитель из резервуара через колонку до наступления равновесия в системе;

б) если используют смешанную подвижную фазу, содержащую минорный компонент(ы) на уровне, много меньшем чем 10% общего содержания, и колонка имеет сродство к этим компонентам (например, спирт в нормально-фазной системе для адсорбционной ЖХ на активном силикагеле), то сначала обрабатывают сухую насадку растворителем, в котором содержание минорного компонента увеличено примерно до 5—10%. Отбрасывают 5—10 мертвых объемов или, если необходимо, большее количество эфлюента и затем переключают систему на подачу желаемой подвижной фазы. Отбрасывают 3—4 мертвых объема и рециркулируют до наступления равновесия;

в) если насадка содержит небольшие поры, которые участвуют в процессе разделения, то необходимо достаточно большое время для того, чтобы подвижная фаза диффундировала в эти поры в процессе уравнивания системы. Это лучше всего сделать при условии остановленного потока. Промойте слой колонки 3—4 мертвыми объемами подвижной фазы и отбросьте элюат. Остановите поток на несколько часов или на ночь и

позвольте подвижной фазе диффундировать в микропоры. После восстановления потока отбросьте 1—2 мертвых объема и рециркулируйте элюент до установления равновесия. Эта процедура может быть изменена в зависимости от требований конкретной системы;

г) если насадка была предварительно смочена фазой меньшей элюирующей силы, чем используемая потом подвижная фаза, то подходящими являются рекомендации (а) или (б). Однако может оказаться невозможной полная замена одного типа минорного компонента подвижной фазы на другой. В этом случае может оказаться необходимой замена неподвижной фазы на новую;

д) если насадка была предварительно смочена подвижной фазой с большей элюирующей силой, чем используемая потом, то можно воспользоваться рекомендацией (г). Однако в некоторых случаях, чтобы вернуть насадке первоначальную активность, может потребоваться для элюирования большое число колоночных объемов растворителя (50—100 или больше). В отдельных случаях это может оказаться вообще невозможным. Иногда может помочь химическая обработка неподвижной фазы. Например, для того чтобы удалить адсорбированную воду из силикагеля, можно использовать 2,2-диметоксипропан [155]. Однако стоимость материалов и рабочей силы, необходимых для регенерирования насадки, может оказаться больше, чем стоимость замены;

е) некоторые виды насадок, например полимеры для ситовой гелепроникающей или ионообменной хроматографии, могут изменять объем при начальном смачивании подвижной фазы, при изменении состава подвижной фазы, изменении ионной силы и т. д. Небольшое изменение объема (1—5%) при изменении растворителя в некоторых случаях терпимо. Однако большее набухание или значительное сжатие может потребовать либо механического изменения объема колонки для размещения измененного слоя, либо предварительного уравнивания насадки с новой подвижной фазой в соответствующей емкости и последующего заполнения или перезаполнения колонки полученным уравновешенным материалом.

1.6.2.2.4. Выбор детектора. Некоторые общие положения, связанные со свойствами растворителя и использованием УФ- и рефрактометрических детекторов, приведены в табл. 1.6. Следует обсудить некоторые дополнительные моменты.

□ Если сравнительная ячейка детектора должна содержать подвижную фазу, ее следует промыть перед началом проведения разделения элюентом после уравнивания колонки.

□ УФ-детектирование в случае использования элюентов с хорошим пропусканием не позволяет установить действительное уравнивание колонки. Рефрактометрические детекторы намного более чувствительны к небольшому дрейфу в составе растворителя и поэтому могут дать лучшую информацию о состоянии разделительной системы в процессе уравнивания колонки. Сигнал рефрактометрического детектора может быть обусловлен не только элюированием образцов, но и также изменением состава в распределительной системе жидкость — жидкость (ср. разд. 1.4.4.2), происходящим в результате элюирования образца. В таких случаях рекомендуется собирать весь элюат во фракции нужного размера. Соответствующие фракции могут быть объединены после дальнейшего анализа методом «офф-лайн» (вне потока) на присутствие компонентов образца. Фракции, содержащие только растворитель, могут быть отброшены или подвергнуты соответствующей регенерации.

1.6.2.2.5. Использование ступенчатых градиентов. Как отмечено в разд. 1.2.3 и на рис. 1.3, препаративную ЖХ можно использовать как быстрое средство выделения или обогащения классов соединений в условиях ступенчатого градиента. Иногда для простых смесей на этом может быть закончена необходимая очистка (см. пример на рис. 1.27). В других случаях для разделения сложного образца с компонентами, сильно отличающимися по полярности, может быть необходимо использовать многоступенчатую последовательность. Если оставить в стороне вопросы, связанные с растворимостью образца (см. разд. 1.6.2.2.6), то в адсорбционной ЖХ с помощью комбинации только четырех растворителей можно создать последовательность восьми градиентных ступеней и быстро разделить образец на фракции, которые затем можно индивидуально очистить в изократическом режиме. В каждой фракции спектр компонентов будет перекрывать диапазон k' примерно только на 5—10 единиц. При скорости 1 мертвый объем в минуту процесс разделения, показанный в табл. 1.8, потенциально может быть закончен менее чем за 20 мин. Размер колонки может быть выбран в соответствии с имеющимся в наличии образцом. Для быстрого фракционирования образца можно аналогичным образом достаточно эффективно использовать градиентные схемы и в других методах разделения (ионный обмен, аффинная хроматография, распределение и т. д.). Классическая колоночная хроматография на открытых колонках часто выполнялась с использованием ступенчатого градиента, создаваемого элюотропным рядом, подходящим для используемой неподвижной фазы. Однако, поскольку приготовление хорошей препаративной ЖХ-колонки требовало искусства и длительного времени,

Таблица 1.8. Предлагаемые ступени градиентной последовательности для использования в колонках, заполненных силикагелем квалификации «для препаративной ЖХ»^а

Ступени градиента	Состав подвижной фазы (объем/объем)
1	1,1,2-Трихлоро-1,2,2-трифторэтан (ТХТФЭ)
2	ТХТФЭ/дихлорометан (75 : 25)
3	Дихлорометан
4	Дихлорометан/метил-трет-бутиловый эфир (75 : 25)
5	Метил-трет-бутиловый эфир
6	Метил-трет-бутиловый эфир/метанол (80 : 20)
7	Метил-трет-бутиловый эфир/метанол (55 : 45)
8	Метанол

^а Методика. Образец вводят в количестве 0,1—0,5 г/г силикагеля (см табл. 1.5) в одном мертвом объеме ТХТФЭ. Фракции элюируют в ступенях 2—8, используя 1—2 мертвых объема каждого растворителя или смеси растворителей. Затем каждая фракция может быть разделена в изократическом режиме на силикагеле с использованием в качестве подвижной фазы элюента из предыдущей ступени (например используют дихлорометан в качестве подвижной фазы при анализе фракции со ступени 4 и т. д.). Если требуется, следует провести дальнейшую оптимизацию коэффициента разделения интересующих компонентов, используя другие комбинации подвижной и неподвижной фаз.

в последовательность ступенчатого градиента добавляли участки изократического элюирования до тех пор, пока все компоненты с подходящим k' при данной элюирующей силе не вымывались. Такие методы разделения, требовавшие много часов или дней, были неэффективной попыткой соединить функции тонкого и грубого разделений. Используя современную технологию заполнения колонок и легко доступные, предварительно заполненные ЖХ-колонки для препаративного разделения, возможно использовать многостадийные многомерные разделения, приведенные в разд. 1.2.3, для достижений максимального выхода.

1.6.2.2.6. Растворимость образца. Как отмечено в разд. 1.6.2.1.3, получение максимального α может вступить в противоречие с растворимостью образца в элюенте. В аналитической ЖХ иногда необходимо ввести образец, растворенный в растворителе, ином, чем подвижная фаза. В препаративной ЖХ такая ситуация приведет к тому, что большой объем такого растворителя может помешать разделению, по крайней мере по трем существенным причинам.

Во-первых, он может хорошо детектироваться, и сигнал от растворителя наложится или полностью замаскирует сигнал от элюируемого важного компонента образца в начале хроматограммы.

Во-вторых, так как вводимый растворитель, чтобы растворять образец, по необходимости имеет элюирующую силу, большую, чем элюирующая сила подвижной фазы, то он может элюиро-

вать молекулы образца на значительное расстояние в слое, прежде чем произойдет достаточное растворение и установится равновесие. Это приводит к расширению полосы и уменьшению эффективности разделения, типичному для *объемной перегрузки*.

В-третьих, при более высоких концентрациях образца, используемых в препаративной ЖХ, он может выпасть в осадок в насосе, узле ввода пробы, трубопроводах или в голове колонки, как только вводимый раствор станет достаточно разбавленным подвижной фазой. Это может потребовать демонтажа узлов системы и (или) перепайки части или всей препаративной ЖХ-колонки, если образец нельзя будет растворить *in situ*. Для того чтобы избежать этих проблем, исследуйте, как влияет на раствор образца разбавление подвижной фазой, с помощью пробного эксперимента *до проведения* препаративного разделения.

В связи с этими тремя потенциальными источниками затруднений можно дать следующие рекомендации, которые помогут в ситуациях, когда образец плохо растворим или не может быть растворен непосредственно в элюенте.

□ Если подвижной фазой является смесь двух или большего числа растворителей, растворить образец в одном из растворителей и затем разбавить этот раствор другими растворителями настолько, насколько это возможно для того, чтобы максимально затем приблизиться или воспроизвести подвижную фазу по составу и элюирующей силе.

□ Если должен быть использован иной растворитель или иная смесь растворителей, чем используемый элюент, необходимо принять следующие меры предосторожности:

а) введите в колонку объем растворителя или смеси растворителей, равный тому, который будет введен при вводе образца, чтобы посмотреть, насколько большую часть хроматограммы закроет введенный растворитель при его элюировании;

б) измените хроматографическую систему таким образом, чтобы k' интересующих компонентов позволили элюировать их за хвостом полосы введенных растворителей;

в) в адсорбционной системе попытайтесь использовать растворитель с лучшей растворяющей способностью, но с равной или меньшей элюирующей силой. Например, используйте дихлорометан вместо простого эфира;

г) в обращенно-фазных ЖХ-системах на привитом силикагеле попытайтесь использовать ТГФ или этанол вместо ацетонитрила или метанола. Первые растворители могут быть разбавлены водой в большей степени и все-таки содержать больший процент органического компонента в растворе, чем последние.

Результаты использования последних трех рекомендаций показаны на рис. 1.17. Смесь изоандростадиенолов имела пло-

хую растворимость в подвижной фазе для ЖХ-препаративной хроматографии ацетонитрил—вода (9:1). Даже первоначальное растворение смеси в ацетонитриле и последующее разбавление водой не помогли. Было использовано минимальное количество ТГФ для растворения образца. Затем раствор ТГФ был разбавлен подвижной фазой и некоторым количеством воды для того, чтобы раствор образца имел примерно ту же элюирующую силу, что и подвижная фаза. Чтобы убедиться, что образец не выпадает в осадок при введении предполагаемой концентрации, была приготовлена тройная смесь при выбранной концентрации. Для проверки величины пика растворителя в начале хроматограммы провели пробный опыт с введением растворителя. На этой основе подвижную фазу, используемую в аналитической ЖХ, ослабили путем увеличения содержания воды до 3—5%. Это позволило увеличить k' изоандростадиенолов до такой степени, что они стали вымываться позади пика растворителя; этим избежали перекрытия и сделали возможной циркуляцию с отбором пика. Таким путем было очищено несколько сотен миллиграммов образца с использованием разделительной системы, которая первоначально, по-видимому, была непригодна для использования из-за плохой растворимости [75, 156].

В особо трудных случаях, или когда компоненты образцов сильно отличаются по полярности и растворимости (требуется ступенчатый градиент), может стать необходимым преадсорбировать их на части неподвижной фазы. Для этого растворяют образец в хорошем растворителе, обычно намного более сильном, чем растворитель, который может быть использован в качестве подвижной фазы. Затем полностью адсорбируют этот раствор на достаточном количестве неподвижной фазы. Путем тщательной сушки, например с помощью роторного испарителя под вакуумом и осторожного нагревания, удаляют все следы растворителя, чтобы покрыть насадку образцом. При этом надо быть осторожным и не допустить разложения образца. Затем сухой материал помещают на вход препаративной ЖХ-колонки или в отдельную колонку, подсоединенную к входу первой колонки. Затем через колонку пропускают подвижную фазу или проводят элюирование с помощью ступенчатого градиента. Такая методика достаточно хороша для фракционирования образца при условиях градиента, однако не дает хороших разделений в изократических системах. Медленное растворение компонентов образца приводит к интенсивному расширению полосы, размыванию фронта пика (ср. разд. 1.4.42), и результаты редко бывают удовлетворительными. В таких случаях попытайтесь найти лучшее средство разделения (например, ситовую хроматографию с использованием подходящего растворителя в качестве подвижной фазы).

1.6.2.3. Техника безопасности

Все химикалии и растворители, используемые в лаборатории, следует рассматривать как опасные, независимо от того, насколько велики предельные пороговые концентрации (см табл. 1.7) или как низка токсичность. Токсичность таких растворителей, как дихлорометан, который считали «безопасным», в свете более современных исследований [157] должна быть подвергнута переоценке. Имеется обширная доступная литература по свойствам растворителей и мерам предосторожности при работе с ними [147, 158—168]. Пожалуйста, прежде чем приступить к работе с большими количествами растворителей в лаборатории или на заводе, ознакомьтесь с этими источниками. Фирмы-изготовители по требованию могут предоставить список данных по безопасности материалов и другую соответствующую информацию. Познакомьтесь также с местными положениями и инструкциями, касающимися транспортировки, хранения, обращения и уничтожения потенциально горючих, корродирующих, токсичных, канцерогенных, тератогенных или мутагенных веществ. Позаботьтесь, чтобы все емкости с растворителями и транспортные системы были заземлены для предотвращения загорания от разряда статического электричества. Используйте достаточно вентиляцию и следуйте правилам работы все время. Нельзя пренебрегать вопросами безопасности, работая с растворителями, особенно в масштабах препаративной ЖХ.

1.7. Системы для препаративной ЖХ

В предыдущих разделах этой главы мы рассмотрели «программное обеспечение» препаративной ЖХ, т.е. физико-химические средства, с помощью которых выполняется разделение. Теперь мы рассмотрим некоторые наиболее важные вопросы и рекомендации для выполнения «программы» препаративной ЖХ — компоненты оборудования, которые должны быть собраны в ансамбль, способный выполнять программу разделения. Независимо от того, собирает хроматографист отдельные компоненты и создает хроматографическую систему сам или покупает полностью готовый инструмент, приведенные здесь положения помогут правильно оценить основные характеристики этой системы, важные для успеха препаративного ЖХ-разделения. Каждая препаративная ЖХ-система содержит определенные ключевые компоненты:

- резервуар для подвижной фазы;
- систему подачи элюента;
- систему ввода образца;

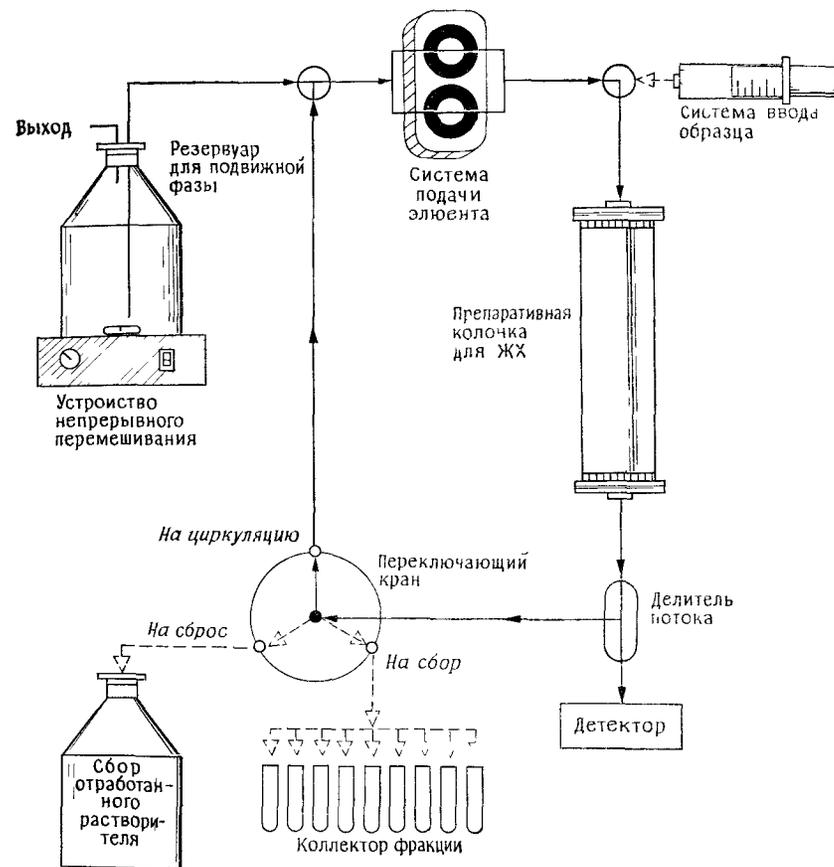


Рис 1.29 Схематическое изображение элементов типичной системы для препаративной ЖХ. Стрелки указывают поток элюента в циркуляционном методе

- а) колонку, заполненную неподвижной фазой;
- б) детектирующую систему, работающую в системе реального времени (он-лайн) или сф-лайн;
- в) систему сбора компонентов образца;
- г) систему выделения образца и удаления остатков;
- д) краны для эффективного переключения жидких потоков, управляемые вручную или автоматически.

Большинство из этих компонентов показано на рис. 1.29. Элементы конструкции и вся система зависят от масштаба разделения, типа используемых колонок и элюента и источника получения оборудования (самодельное или изготовленное про-

Таблица 1.9. Американские отделения фирм — изготовителей систем для крупномасштабной ЖХ

Название компании ^a	Адрес	Телефон
Amicon Div. of W. R. Grace & Co	24 Cherry Hill Dr., Danvers, MA 01923	(617) 777-3622
Beckman Instruments, Inc.	2500 Harbor Blvd., Fullerton, CA 94583	(714) 871-4848
Millipore Systems Division Millipore Corporation	Ashby Road, Bedford, MA 01730	(617) 275-9200
Pharmacia, Inc.	800 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854	(201) 457-8000
Separation Technology, Inc.	P.O. Box 63, 2 Columbia St., Wakefield, RI 02879	(401) 789-5660
Varex, Inc	12221 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852	(301) 984-7760
Waters Chromatography Division, Millipore Corp.	34 Maple St., Millford, MA 01757	(617) 478-2000
YMC, Inc.	P.O. Box 492, Mt. Freedom, NJ 07970	(201) 895-2155

^a Сведения о других поставщиках можно найти в других источниках, например [179].

мышленностью). Детальное описание оборудования и рекомендации по созданию установок для препаративной ЖХ выходят за рамки этой главы. Для получения подробной информации читатель может обратиться к другим работам, в которых обсуждаются компоненты ЖХ-систем и методы их изготовления [41—43, 47, 52, 53, 56, 57, 104, 169—178], и к различным фирмам — изготовителям хроматографических систем для препаративной ЖХ (табл. 1.9).

1.7.1. Колонка для препаративной ЖХ

1.7.1.1. Конструкция колонки

Обычно препаративная колонка имеет геометрию удлиненного цилиндра с жесткими стенками, изготовленного из труб таких материалов, как сталь, стекло или органические полимеры. Сталь имеет наибольшую прочность, но когда работают с определенными подвижными фазами, биоактивными образцами и т. д., могут оказаться предпочтительнее стеклянные или полимерные колонки из-за высокой химической стойкости и адсорбционной инертности. Тщательно подобранная насадка помещается в колонку либо непосредственно, либо в «картридж» с мягкими стенками, который затем вставляется в колонку [73]. Для того чтобы закрыть каждый конец цилиндра и удерживать

насадку, используют пористые пластинки («фритты»); они должны быть легко заменяемыми на случай загрязнения колонки. Крышки на концах колонки должны обеспечивать ее герметичность при обычных рабочих давлениях и обеспечивать соединения с трубопроводами, используемыми для подачи раствора образца и элюента через ЖХ-систему. Имеется большое число конструкций, используемых при изготовлении колонок. Механически неустойчивыми или сжимающимися насадками (например, ионообменниками на основе целлюлозы) заполняют короткие колонки, причем необходимые емкость и эффективность достигают путем соединения коротких колонок большого диаметра последовательно в серии, создавая секционную колонку [180, 181]. Более жесткие насадки могут быть упакованы в более длинные слои. Размеры слоя ограничиваются геометрией, которая позволяет легко заполнять колонки: например, отношение длины слоя к диаметру слоя составляет обычно примерно 10—15 для слоев диаметром свыше 20 мм.

В различных примерах ЖХ- препаративных разделений, показанных в этой главе (см., например, рис. 1.14, 1.17, 1.27), емкость и эффективность колонок увеличивали путем последовательного соединения двух или большего числа колонок в серию. Для того чтобы эффективность каждой секции колонки была аддитивной, т. е. чтобы удвоить эффективность путем удваивания длины колонки и т. д., собственная эффективность каждой секции колонки должна быть идентична эффективности каждой другой колонки в серии [182]. Это необходимо, так как общее число тарелок N_T для всей составной колонки рассчитывают по уравнению (1.15), используя стандартное отклонение или меру узости пика $\sigma_{\text{полн}}$ для всей составной колонки как целого. В свою очередь σ_T рассчитывают как корень квадратный из суммы дисперсии для каждой колонки в серии:

$$\sigma_{\text{полн}} = (\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + \dots)^{0,5} \quad (1.15)$$

На практике, когда планируют собрать все секции вместе для создания составной колонки, каждую секцию проверяют независимо на собственную эффективность, и только колонки с соответствующей эффективностью собирают в серию. Аналогично, если в процессе использования одна из секций колонки теряет эффективность, ее следует заменить. Так как обычно первой теряет эффективность колонка на входе серии, то обычно ее удаляют и затем вставляют заменяющую секцию в конец серии колонок. Таким образом достигают максимального времени жизни каждой секции колонки.

В то время как оптимизации структуры насадки в препаративных ЖХ-колонках уделялось много внимания, конструкции концевой арматуры (фитингов) посвящено мало исследований.

Как отмечалось в разд. 1.4.3.2, собственная эффективность колонки определяется в значительной степени конструкцией колонки. Конструкция концевой арматуры колонки, особенно на входе в колонку, в большой степени определяет как форму полосы, так и ее длину в конце хроматографического процесса. При изократической элюентной ЖХ полоса, образовавшаяся при входе, никогда не станет уже, а может только расширяться. Градиентное элюирование может уменьшить ширину полосы, но не может полностью скорректировать искаженную форму полосы, обусловленную неправильно сконструированным вводом в колонку.

Влияние конструкции ввода на форму полосы было экспериментально исследовано с помощью ввода небольших количеств красителя в препаративную картриджную ЖХ-колонку, имевшую тонкую полиэтиленовую стенку [183]. В различных точках хроматографического процесса поток останавливали, затем картридж удаляли из его камеры, стенку картриджа надрезали вдоль бритвой. Силикагель аккуратно соскребали, пока не становилось видно полное внутреннее сечение хроматографического слоя. Таким образом наблюдали и фотографировали реальные формы полос образца. Некоторые из результатов многих экспериментов схематично показаны на рис. 1.30.

Можно сделать некоторые общие заключения. При вводе через одно центральное отверстие в колонке (рис. 1.30, а) поток элюента, выходящий из небольшого отверстия при условиях, близких к турбулентным, пронесет на значительное расстояние в слой значительную часть образца через центр фритты, установленной на входе в колонку. В результате образуется полоса, имеющая параболический профиль в поперечном сечении, причем большая часть образца сконцентрирована в центре пораболы. Существенная часть образца пронесется через всю колонку, контактируя при этом *менее чем с половиной* общего объема насадки. Даже при чрезвычайно малых нагрузках ($1,2 \cdot 10^{-5}$ г/г силикагеля) эффект бесконечного диаметра колонки, предсказанный теорией, не наблюдался [44, 45]. Фактически в момент, когда вершина параболы была готова выйти из колонки, боковые ее ветви вытягивались в направлении стенок и простирались назад, ко входу в колонку.

При добавлении одной ступени распределения (рис. 1.30, б) импульс потока элюента был значительно уменьшен, и полоса стала значительно более узкой. Центр «параболического кольца» соответствовал кольцеобразной форме выхода из распределительной пластины, давая более концентрированную полосу образца с бинадальным профилем поперечного сечения. Дальнейшее улучшение было получено путем использования трех стадий распределения (рис. 1.30, в). В этом случае была получена

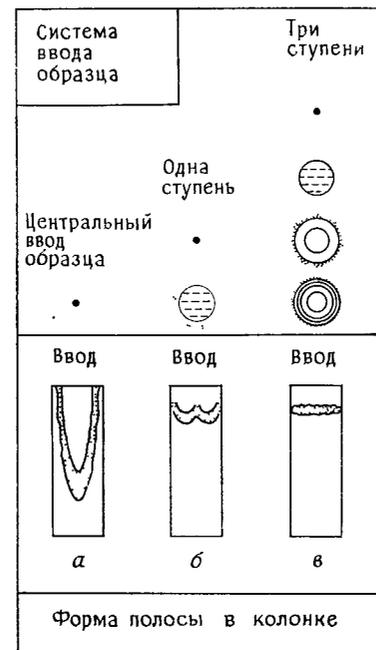


Рис. 1.30 Влияние системы распределения потока на форму полосы. Колонка силикагелевый картридж с радиальным сжатием, $d_{\text{внут}} = 5,7$ см, $l = 30$ см. Подвижная фаза дихлорометан. Объемная скорость: 150 мл/мин. Образец: судан красный; 4 мг, растворенные в 1 мл дихлорометана, $k' = 3$. Конструкция ввода: а — одноточечный центральный ввод, из отверстия $d = 1,5$ мм на пористый фильтр (20 мкм) толщиной 1,6 мм; б — то же устройство, за исключением того, что поток из центрального ввода распределяется по концентрическому кольцу в распределительной пластине; концентрическое кольцо расположено так, что делит площадь поперечного сечения колонки пополам; в — та же конструкция, за исключением того, что поток жидкости делится далее двумя дополнительными распределительными пластинами, причем вторая пластина содержит два концентрических кольца и третья — четыре кольца; кольца расположены относительно точки, из которой вытекает элюент, так что делят площадь поперечного сечения соответственно на четыре и восемь частей. Другие размеры и особенности конструкции не опубликованы [183]

на почти идеальная плоская форма полосы. При прохождении ее через колонку реализовывалась доступная емкость всего объема силикагеля — идеальные условия для препаративной ЖХ. Сходные эксперименты при малых нагрузках для менее удерживаемого (метилорый желтый, $k' = 1$) и более сильно удерживаемого (индофенол голубой, $k' = 7$) красителей дали сопоставимые результаты. Как ожидалось из соответствующих коэффициентов емкости, полосы в первом случае на колонке были более размытыми, но элюировались, конечно, в меньшем объеме

элюата; в случае последнего образца полосы на колонке были более узкими, но они были элюированы в большем общем объеме [183].

Из описанных экспериментов становится понятна важность требований к конструкции концевых соединений:

□ Входная арматура должна уменьшать скорость потока входящего элюента до того, как он попадает на насадку, и должна распределять образец в возможно более узкую и однородную полосу по всему внутреннему поперечному сечению колонки для получения максимальной емкости и собственной эффективности колонки.

□ Арматура на выходе должна рефокусировать однородную форму полосы в узкий поток с минимальным смещением разделенных зон.

□ Поперечные сечения каналов всех коммуникаций должны быть небольшими, и все пустые объемы должны быть минимальными. В конструкции должны отсутствовать мертвые объемы или зоны смещения, поскольку они вносят потенциально чрезвычайно большое ухудшение собственной и разделительной эффективности колонки и уменьшают выход.

□ Концевые коммуникации должны иметь удобную конструкцию для замены в ситуациях, когда они закупориваются посторонними компонентами.

Вход в колонку вносит особенно большой вклад в успех препаративного ЖХ-разделения.

1.7.1.2. Структура насадки

1.7.1.2.1. Колонки большего диаметра. Задолго до того как теоретически было описано блуждание молекул образца через отдельные лабиринты насадки, многие исследователи интуитивно осознали важность гомогенности насадки для успешного препаративного ЖХ-разделения, а также важность искусства и мастерства, необходимых для получения такой структуры. Плотнупакованное квадратное или гексагональное расположение частиц легко получить на бумаге, но трудно реализовать по всему объему хроматографической колонки. При увеличении объема колонки могут появиться некоторые компенсирующие эффекты:

1) объем наполнителя вблизи стенок становится намного меньшим по отношению к общему объему насадки; пустые места и каналы, обусловленные неспособностью частиц расположиться близко друг к другу или близко к твердым стенкам колонки, становятся менее важным, хотя и значительным вкладом в общий средний профиль потока всего слоя;

2) с увеличением диаметра становится менее вероятным образование мостиков из частиц в поперечном сечении колонки.

Образование мостиков происходит, когда аксиальное давление, прикладываемое к насадке для увеличения плотности слоя передается от частицы к частице наружу в радиальном направлении, более или менее перпендикулярном стенкам колонны. Эти мостики препятствуют передаче давления ниже лежащим частицам и препятствуют удалению небольших пустых пространств в слое при его формировании;

3) в процессе заполнения может происходить распределение частиц по размерам как в направлении поперечного сечения, так и вдоль длины колонки. Это вызывает неоднородность скорости потока через колонку и приводит к расширению пика, потере эффективности и уменьшению выхода в препаративной ЖХ.

Явление образования мостиков может быть использовано для объяснения наблюдаемого уменьшения эффективности в случае колонок меньшего диаметра. При тщательном заполнении сферическими частицами силикагеля диаметром 50 мкм колонок длиной 30 см и внутренним диаметром 2, 11, 20 и 57 мм измеренное число тарелок приблизительно удваивалось от одного размера к следующему по мере увеличения диаметра колонки [184, 185]. Поэтому, если минимизированы пристеночные каналы и предотвращено разделение частиц по размерам, выгодно заполнять колонки большего диаметра.

1.7.1.2.2. Методы заполнения колонок. Для заполнения препаративных ЖХ-колонок пригодны два метода: заполнение сухими частицами и суспензией. Первый способ используют в случае, когда размеры частиц больше 25—30 мкм. Суспензионный метод предпочтителен для частиц, имеющих размер меньше 20—25 мкм. Суспензионный метод заполнения при низком давлении может также потребоваться при использовании неподвижной фазы, имеющей частицы большего диаметра, когда колонка должна быть заполнена предварительной набухшей смоченной насадкой, например полимерным ионообменником.

Более ранние методы заполнения колонок для препаративной ЖХ часто основывались на комбинации процессов заполнения трубки с применением силы для придания слою плотноупакованной конфигурации. Вероятно, наилучшим из методов сухого заполнения является процедура, предложенная в работах [186, 187]. При медленном вращении колонки и непрерывной подаче сухой насадки в центр колонки по стенке трубки постукивают только на верхнем уровне насадки. На поверхности частицы насадки ведут себя как жидкость, тогда как частицы ниже оседают в плотноупакованную конфигурацию так же, как уплотняется песок на берегу под влиянием волн. Если заполнение не происходит непрерывно, появляются видимые разрывы в слое, влияющие на эффективность. Постукивание или вибрация ко-

лонки (как это принято делать при приготовлении колонок в газовой хроматографии) скорее разрушает структуру слоя насадки, чем способствует ее образованию; при этом уменьшаются гомогенность и эффективность насадки. В качестве средства повышения эффективности колонок большого диаметра предлагали вводить в них перегородки с целью уменьшения радиального перемешивания зон образца, но так как это затрудняло упаковку слоя, то потенциальный выигрыш эффективности от введения перегородок обычно нейтрализовался негомогенностью насадки [188].

Хотя методы сухого заполнения более дешевы, более удобны и менее опасны для больших колонок, обычно сухое заполнение не позволяет получать слои, отвечающие по плотности и эффективности насадки, получаемым с использованием суспензионного метода при прочих равных условиях [186]. Обычно суспензионный метод заполнения комбинируют с осаждением частиц с применением давления в аксиальном направлении, параллельном направлению потока через слой. Давление может быть создано с помощью внешнего насоса (см. [42] и цитированные там ссылки) или поршня, являющегося составной частью колонки [189, 190].

Более современная техника комбинирует более эффективный процесс заполнения сухим наполнителем с давлением на гибкую стенку колонки (картриджа) в направлении, перпендикулярном оси потока, для получения однородного слоя в поперечном сечении, исключая пристеночные каналы, мостики и пустоты внутри структуры упакованного слоя [73, 121, 191, 192]. Этот процесс, названный *радиальным сжатием*, по мнению изготовителей, удобен, позволяет получать воспроизводимые гомогенные слои для препаративной ЖХ, а также удалять пустоты, образующиеся в процессе работы, увеличивая тем самым время жизни колонки. Более того, использование картриджей позволяет быстро перепаковать колонки или соединять колонки с различной селективностью для последовательных ступеней в методе ЖХ-разделения. Сравнение колонок, упакованных радиальным и аксиальным методами сжатия при контролируемых условиях, продемонстрировало, что метод радиального сжатия имеет преимущества при приготовлении эффективных колонок, обеспечивающих более высокий выход препаративных ЖХ-разделений при меньших затратах времени и труда [193].

1.7.2. Система подачи элюента и введения образца

Желательно, чтобы система подачи подвижной фазы и введения растворов образца в хроматографический слой включала следующие компоненты:

□ *Инертный насос*, имеющий возможность подавать растворители при соответствующем давлении и достаточно постоянной скорости потока в пределах до одного колоночного объема в минуту, позволяющий работать без осложнений с образцами, растворителями, колонками и детекторами и производить разделение за время, сравнимое с соответствующим аналитическим разделением. Насос должен иметь небольшой внутренний объем, позволяющий создавать циркуляционный режим хроматографии (см. разд. 1.7.2.3), быть простым в эксплуатации и обслуживании. Он должен иметь возможность подавать растворитель из резервуара любого объема.

□ *Инертную систему ввода образца*, способную выдерживать достаточные давления в системе, подавать количественно образец и иметь объем вплоть до 20% мертвого объема колонки. Для крупномасштабных препаративных ЖХ-систем обычно конструируют комбинацию подходящих кранов, насоса и резервуара для образца. При проведении многократных разделений желательно иметь автоматический контроль повторных введений пробы, сбора фракций и системы подачи растворителя.

□ *Инертный резервуар для подвижной фазы* объемом 20—40 колоночных объемов, дающий возможность подать количество подвижной фазы, необходимое для уравнивания колонок, разделения и сбора по крайней мере интересующих компонентов ($k' = 5—10$). Резервуар должен давать возможность организации непрерывного перемешивания.

В вышеприведенном описании слово «инертный» означает, что образец или используемые растворители не приводят к порче оборудования, его ослаблению, коррозии или аварии, а также к загрязнению образца или потока элюента. Разумеется, инертными должны быть только те материалы и детали оборудования, которые контактируют с жидкой фазой или образцом. Может оказаться невозможным или даже нежелательным создать жидкостный тракт из материалов, устойчивых ко всем возможным образцам или подвижным фазам, из-за необходимости поддерживать на должном уровне другие важные характеристики, такие, как устойчивость к давлению, легкость в обработке и изготовлении, механическая прочность и подходящая стоимость. Например, пластиковые насосы могут работать хорошо в контакте с биологическими образцами и водными буферами, но «заедают» в результате набухания, изменения размеров или химических изменений, обусловленных органическими растворителями.

Если противодействие ΔP в препаративной ЖХ-системе увеличивается на порядок величины, например от 0,7 до 7 МПа, то в такое же число раз возрастают трудности, связанные с уплотнениями, соединениями, устойчивостью к износу и механической

прочностью компонентов системы. Ключевыми параметрами, определяющими ΔP , являются: размер частиц неподвижной фазы, плотность слоя, размеры колонки, вязкость подвижной фазы, объемная скорость потока. После выбора указанных параметров в пределах, обеспечивающих решение задачи разделения (разд. 1.2.2), можно установить требования к ЖХ-системе и подобрать подходящие компоненты системы для ее сборки.

Компоненты системы подачи жидкой фазы при конструировании препаративных ЖХ-систем большей емкости обычно выбирают прежде всего на основе конструкционных материалов, возможного перепада давления ΔP и диапазона скоростей потока. Постоянство подачи раствора и пульсация потока после этого часто становятся вторичными, компромиссными характеристиками. Достаточно постоянная скорость потока ($\pm \sim 5\%$) является важной, если разделение будут повторять в тех же условиях и (или) в условиях автоматического режима. Это требование несколько менее критично, если собирают много фракций и затем их анализируют «офф-лайн». Пульсации насоса так же, как в аналитической системе, должны быть минимальны, если используется «он-лайн»-детектор с делением или без деления потока, чувствительный к пульсациям, поскольку это может помешать анализу эфлюента. При использовании промышленных насосов возможны чрезмерно большие пульсации, которые могут привести к преждевременному разрушению слоя насадки в препаративных колонках и ухудшению качества системы. В таких случаях следует использовать демпфирующие устройства, соответствующие ΔP и скоростям потока, создаваемым насосом. К сожалению, характеристики размывания большинства демпферов пульсаций не позволяют использовать их в схемах циркуляционной хроматографии, таких, как показанная на рис. 1.29 (см. разд. 1.7.2.2). В таких случаях лучше всего получить консультацию изготовителей оборудования для препаративной ЖХ (см. табл. 1.9).

1.7.2.1. Сопоставление турбулентного и ламинарного потоков

Внутри каналов слоев насадки как аналитических, так и препаративных ЖХ-колонок поток растворителя является ламинарным, и перепад давления прямо пропорционален скорости потока. В ламинарном режиме потока силы вязкости велики по отношению к силам инерции, движущим жидкость через каналы, что обуславливает характерный параболический профиль потока с меньшей скоростью потока вблизи стенок и большей скоростью в центре канала. Если диаметр канала и скорость жидкости увеличиваются, то возможен переход к турбулентному потоку, в котором доминирующими являются силы инерции.

Результирующий профиль потока намного более плоский, с лучшим радиальным перемешиванием, однако перепад давления увеличивается чрезвычайно сильно, поскольку в турбулентном потоке он экспоненциально пропорционален скорости потока [41]. Каков характер потока — турбулентный или ламинарный, — можно предсказать с помощью критерия Рейнольдса (R_e), безразмерного параметра, который равен произведению диаметра канала, линейной скорости потока и отношения плотности к вязкости:

$$R_e = [\rho \text{ (г/см}^3\text{)} / \eta \text{ (пуаз)}] \cdot [\text{линейная скорость (см/с)}] \times [\text{внутренний диаметр трубки (см)}] \quad (1.16)$$

Если $R_e < 2000$, доминирует ламинарный поток. Переход к турбулентному потоку происходит при значениях R_e 2000–5000.

Турбулентный поток становится значительным в препаративной ЖХ-системе в местах, где внутренний диаметр транспортных трубок больше, чем в аналитической ЖХ-системе. Например, в случае дихлорометана ($\rho/\eta \approx 300$) поток является турбулентным при 100–500 мл/мин в трубке диаметром 2,4 мм ($R_e = 13\,560$ при 500 мл/мин, 2712 при 100 мл/мин). Вода ($\rho/\eta = 100$) не имеет турбулентного потока в трубке такого внутреннего диаметра до скорости потока почти 500 мл/мин ($R_e = 4490$ при 500 мл/мин, 900 при 100 мл/мин). Преимуществом турбулентного потока в транспортных трубках является уменьшение размывания полосы, недостатком — более высокое рабочее давление. Поэтому при проектировании препаративной ЖХ-системы желательнее предусмотреть в системе: 1) транспортные трубки минимальной длины, в которых поток турбулентен, 2) колонки, всегда работающие в ламинарном режиме, и 3) насосы, способные работать при дополнительном противодавлении.

1.7.2.2. Циркуляционные системы

Для того чтобы реализовать преимущества циркуляционной хроматографии с отбором пика в препаративных ЖХ-разделениях, проиллюстрированных в разд. 1.4.3.4, можно использовать систему, аналогичную показанной на рис. 1.29. Ключевой особенностью системы является переключающий кран, который позволяет направить поток элюента, вытекающий из колонки, опять через насос в колонку для рецикла или в устройство для сбора фракций. При конструировании такой системы должны быть предусмотрены средства промывки различных участков трубопроводов в тот момент, когда они не используются, с тем чтобы не произошло загрязнения предыдущей фракции, когда в следующий раз она будет направлена опять в эту часть тру-

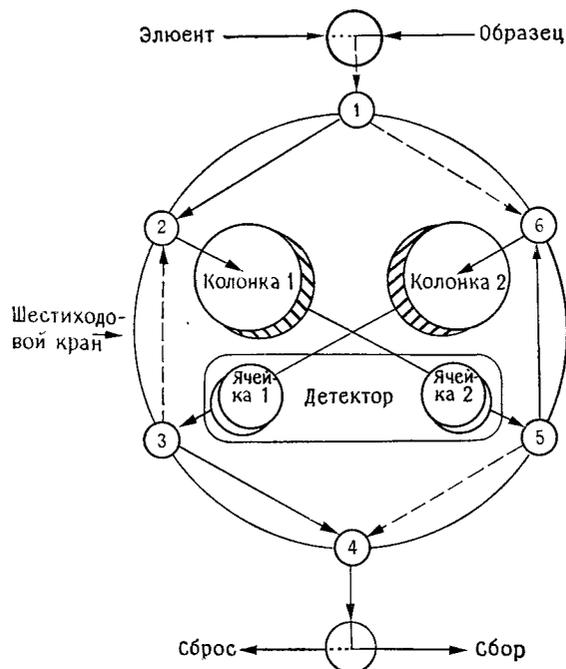


Рис. 1.31. Схематическое представление системы препаративной ЖХ, разработанной для метода попеременной циркуляции через колонки. После того как порция элюата, которая должна быть рециркулирована, поступает в колонку 2, кран переключают в положение, указанное стрелками. Затем, если необходима дальнейшая циркуляция, полосу переводят опять в колонку 1, и кран опять переключают в начальное положение. В каждом положении часть элюата, которую не подвергали рециклу, можно направить в коллектор фракции или на сброс с помощью другого крана, подсоединенного к выходу 4.

бопровода. Это можно сделать, например, с помощью воздушного компрессора. Другая система для циркуляции, первоначально использованная для ситовой (гельпроникающей) хроматографии [194, 197], показана на рис. 1.31. Она менее удобна для препаративных ЖХ-систем больших масштабов, так как нужны по меньшей мере две колонки. Они должны соответствовать друг другу по эффективности и характеристикам, чтобы реализовать преимущества метода. Это трудно сделать в колонках очень большого масштаба, особенно после того, как они несколько раз использовались. Другим потенциальным недостатком этой системы является то, что непрерывно расходуется растворитель, тогда как в системе, показанной на рис. 1.29, в период рецикла растворитель сохраняется. Можно оценить число возможных циклов с рециклом в конкретной ЖХ-системе,

если использовать простое эмпирическое правило. Полагая, что при максимальном размывании пика, которое можно допустить до того, как хвост будет достигнут фронтом полосы, объем элюирования относится к ширине пика у нулевой линии, как 3:1, и, используя уравнение (1.6) на рис. 1.5, получают минимальное число тарелок, необходимое для одного цикла: $N = 16 (3/1)^2 = 144$ тарелки. Деля общее число тарелок (см. разд. 1.4.2, особенно табл. 1.4) на 144, оценивают число циклов, возможных без отбора или сбора фракций. Например, если колонка имеет собственную эффективность 500 тарелок, то возможны примерно три цикла. При селективном отборе массы в соответствующих циклах ширина пиков уменьшается и число возможных циклов можно увеличить.

1.7.3. Детектирование

Если бы существовал идеальный детектор для препаративной ЖХ, он бы имел следующие характеристики.

□ Способность детектировать универсально все компоненты с равной чувствительностью к массе или молярному количеству присутствующих компонентов (а) или детектировать только представляющие интерес компоненты (б) при последовательном включении с другим детектором, который имеет характеристики (а).

□ Широкий динамический диапазон с высокой чувствительностью, требуемой для следовых компонентов и небольших количеств, присутствующих после нескольких рециклов с отбором пика, и уменьшенную чувствительность для того, чтобы детектировать большие концентрации, введенные в колонку при большой нагрузке. Нечувствительность к шуму потока, изменению давления, изменениям температуры и состава растворителя при больших скоростях потока.

□ Длительная стабильность нулевой линии для продолжительных разделений.

□ Отсутствие ограничений по совместимости с растворителем, подвижной фазой и образцом.

□ Нечувствительность к пузырькам, небольшим частицам и т. д.

□ Легкое обслуживание, надежность, отсутствие требований к настройке.

□ Конструкция ячейки подходит для использования «он-лайн» при высоких скоростях потока и типичных рабочих давлениях системы.

Следует отметить, что в настоящее время отсутствует детектирующая система, которая могла бы удовлетворить всем этим требованиям. Традиционно, в качестве детектора для препара-

тивной ЖХ выбирали рефрактометрический детектор, поскольку он имеет примерно универсальный отклик на большинство классов соединений и широкий динамический диапазон, который позволяет использовать его с низкой чувствительностью. Спектрофотометрический детектор для работы в ультрафиолетовой и видимой области можно использовать, если он имеет возможность устанавливать нужную длину волны, отличающуюся от длины волны максимального поглощения для данного соединения или соединений. Часто также используют ячейку с более коротким оптическим путем, чтобы можно было работать с высокими концентрациями компонентов образца, имеющих высокий коэффициент поглощения.

Следует помнить, что любой детектор может стать перегруженным при больших концентрациях образца, и давать нелинейный отклик и искаженные пики (см. рис. 1.23). Если одно и то же разделение, но в большем масштабе, проводят на препаративной колонке с достаточной собственной эффективностью, хотя и меньшей, чем эффективность колонки меньшего диаметра, то концентрация образца в каждой точке элюируемого пика будет меньше в результате большей ширины пика, и отклик детектора может оставаться линейным на протяжении всей хроматограммы. Пример этого явления показан на рис. 1.24 (ср. с рис. 1.23).

УФ-детекторы помогают следить за градиентными разделениями, однако они ограничивают выбор растворителей для подвижных фаз достаточно прозрачными в УФ-области компонентами. Последовательные включения таких детекторов, как УФ-детектор и рефрактометр, иногда может дать больше информации о составе образца, чем это может сделать один детектор. Например, сильно поглощающие в УФ-области следовые загрязнения могут быть детектированы УФ-детектором, а главные, представляющие интерес соединения детектируют с помощью низкочувствительного рефрактометра.

Ячейки как УФ-, так РФ-детекторов имеют ограничение по скорости потока и перепаду давления, который они могут выдержать. Поэтому в крупномасштабных препаративных системах ЖХ, в которых используют высокие объемные скорости, часто устанавливают делитель потока, как показано на рис. 1.29. При правильной настройке делитель отводит небольшую часть ($\leq 1\%$) общего потока элюента в пределах, типичных для аналитической хроматографии, в ячейку детектора, что позволяет проводить детектирование в реальном времени, и решение о том, когда собирать фракции и т. д., может быть принято в процессе разделения. Делитель позволяет также использовать нормальную аналитическую ячейку, делает минимальным падение давления на ячейке и фитингах и дает возможность не изменять

отклик детектора на концентрацию образца в элюате. Если требуется полное выделение образца, то эфлюент из детектора может быть собран и (или) соединен с главной частью эфлюента из колонки до того, как он поступит на вход коллектора фракций.

Иногда не используют ни «ин-лайн»-детектор, ни комбинацию детектора с делительным потоком. В таких случаях собирают фракции и анализируют их «офф-лайн» подходящим методом, например с помощью биоанализа, жидкого сцинтиллятора или реакцией с подходящим визуализирующим агентом (часто выполняется после нанесения аликвоты на пластинку для ТСХ). Конечно, если метод анализа является деструктивным, то жертвуют только частью каждой фракции, а оставшаяся часть обрабатывается подходящим способом для выделения образца.

1.7.4. Сбор образцов и их извлечение

В препаративной ЖХ, выполняемой с использованием аналитической ЖХ-системы, часто можно использовать полуавтоматические системы сбора фракций, содержащие пробирки или иные приемники. Система большого масштаба требует использования устройств для сбора, которые могут отводить поток в большие емкости с помощью автоматического механизма делителя потока типа воронки и отрезков трубки. Этот тип коллектора имеет больше частей, которые необходимо очищать, но может быть приспособлен для размещения контейнеров любого подходящего размера. Вспомним, что выгодно собирать много небольших фракций в течение всего процесса разделения и затем, после подходящего анализа, объединять их. В противном случае препаративное разделение, может быть, придется повторить.

Устройство для роторного испарения и однократной перегонки наиболее часто используют для выделения компонентов очищенного образца из подвижной фазы. Не забудьте принять соответствующие предосторожности, чтобы сделать минимальной потерю лабильных или летучих соединений. Твердофазную экстракцию в колонке или в статических условиях можно также использовать для выделения образца. Ее хорошо использовать при работе с водными элюатами, из которых удаление больших количеств воды путем испарения или сушки вымораживанием является медленным, а также с элюатами, содержащими дополнительные соли или компоненты-буферы, которые следует удалить из образца.

Для того чтобы начать типичное выделение с помощью твердофазной экстракции, прежде всего уменьшите элюирующую силу объединенных фракций элюата (например, раствора гидрофобного компонента соединения в водно-органической по-

движной фазе, содержащей буфер) путем разбавления их большим количеством воды, не допуская осаждения нужного компонента. Затем пропустите смесь через слой гидрофобной насадки, такой, как модифицированный C_{18} силикагель, предварительно смоченный органическим растворителем и промытый чистой водой. При прохождении через слой забуференной жидкой фазы компонент адсорбируется. Вымойте все оставшиеся полярные соединения с помощью воды или разбавленного водно-органического раствора, эквивалентного по составу жидкой фазе, но не содержащего буферных компонентов. Затем используйте смешивающийся с водой органический растворитель (такой, как метанол) для того, чтобы вымыть желаемый компонент из слоя в небольшом объеме (1—2 мертвых объема). Этот раствор затем можно легко отфильтровать, упарить и (или) перекристаллизовать для выделения образца. Такой процесс выделения образца аналогичен технике обогащения примесей, часто используемой для концентрации органических веществ из водных растворов в голове колонки, содержащей гидрофобную или обращенную фазу [42, 144].

1.7.5. Автоматизация

Полное обсуждение вопросов автоматизации препаративных ЖХ-систем выходит за рамки этой главы. Имеются коммерческие системы, которые позволяют автоматизировать подачу растворителя, создание градиента, введение образца, контроль разделения и сбор фракций (в том числе и компаний, перечисленных в табл. 1.9). Была проведена большая работа по масштабированию ЖХ-систем, особенно в областях конструирования непрерывных хроматографических процессов, перекрывающегося дозирования и других альтернативных систем (для более детального ознакомления см. [31, 188, 198—212], гл. 3 в этой книге и приведенные в ней ссылки). Следующее поколение мощных персональных компьютеров и компьютерных станций, несомненно, даст мощный толчок развитию методов управления и контроля препаративным ЖХ-системам, включая извлечение образца и регенерацию растворителя, и даже приведет к дистанционному управлению из мест, удаленных от опасной среды, лабораторий и заводов, аналогично полному управлению приборами аналитических лабораторий, которое сейчас становится обычным.

1.8. Заключение

Хочется надеяться, что предыдущее обсуждение основных положений, а также приведенные рекомендации и советы по достижению успешных препаративных ЖХ-разделений станут ос-

Таблица 1.10. Некоторая литература по препаративной ЖХ

Тема	Литература (номер ссылки)
Общая литература по ЖХ	39—49, 52, 53, 55—59, 106, 173, 213—215
Обзоры по препаративной ЖХ	9—13, 16, 20—25, 28, 30, 32—36, 284
Теория препаративной ЖХ	8, 18, 19, 26, 27, 29, 37, 38, 50, 60, 68—70, 86, 87, 89, 91, 92, 95, 141—143, 177, 210, 211, 268—279, 286
Устройство и приготовление колонок	61, 73, 120, 121, 182, 184, 186, 187, 189—193, 212, 279—289, 296
Неподвижные фазы	7, 50, 51, 112—114, 117, 123, 125—127, 135, 155, 184, 245, 259, 287, 288, 290—296, 303
Подвижные фазы и растворители	137—139, 147—155, 157, 160, 163, 297
Адсорбционная ЖХ	50, 51, 54, 61, 95, 109, 285, 306
Обращенно-фазная ЖХ	54, 101, 110, 111, 154, 229
Жидко-жидкостная распределительная ЖХ	62, 107—109, 250
Ситовая (гель-проникающая) ЖХ	78, 130—134, 180, 181, 194, 196, 251—256, 294, 306
Ионообменная ЖХ	101, 228, 257—259, 294, 305
Аффинная ЖХ	101, 204, 206, 260—264
ЖХ с градиентным элюированием	99—105, 229, 294
Обогащение примесей	144, 230
Микропрепаративная ЖХ	299—301
Макропрепаративная ЖХ	31, 180—181, 188, 198—205, 207, 210, 212
Тонкослойная хроматография	93—95, 98, 266, 267, 304
Устройство приборов	169—172, 174—176, 178, 179, 194—197, 289
Модифицирование образцов	265
Циркуляция в препаративной ЖХ	72—87, 194—197
Применение препаративной ЖХ в:	
науке о жизни	58, 75, 83, 100, 101, 105, 121, 125, 175, 181, 201, 206, 211, 216—230, 244, 256, 259, 294, 305
органическом синтезе	2, 6, 17, 72, 73, 77, 79, 80, 82, 84, 95, 96, 226, 231, 232, 284, 306
фармацевтике	10, 176, 233—235
химии природных продуктов	71, 77, 85, 109, 227, 235—245, 250
анализе загрязнений	247
разделении оптических изомеров	246, 295, 303
химии нефти и природных топлив	248, 249, 302
технике безопасности	157—168
Библиография по препаративной ЖХ	14, 15

новой для чтения последующих глав этой книги и позволят читателю использовать всю мощь крупномасштабной ЖХ для проведения конкретных, важных и интересных разделений.

Публикуемые в этой главе ссылки и дополнительная литература по истории, перспективам развития препаративной ЖХ, а также предлагаемым моделям ее будущего применения распределены по категориям в табл. 1 10.

Литература

- 1 Woodburn J H Taking Things Apart and Putting Things Together, American Chemical Society, Washington D C 1976
- 2 Woodward R B, Pure Appl Chem, 333, 145—177 (1973)
- 3 Ref 2, p 151
- 4 Ref 2, pp 165—166
- 5 Ref 2, pp 175—176
- 6 Eschenmoser A, Wintner C E Science 196, 1410—1420 (1977)
- 7 Unger K K, Janzen R J Chromatogr 373, 227—264 (1986)
- 8 Knox J H, Pyper H M, J Chromatogr, 363, 1—30 (1986)
- 9 Sitrin R, DePhillips P, Dingerdissen J, Erhard K, Flan J, LC-GC 4, 530—532, 534—536, 538, 540, 542, 544, 546—550 (1986)
- 10 Hairsine P, Lab Pract, 35, 37—39 (1986)
- 11 Boman S A, Anal Chem, 57, 998A—1004A (1985)
- 12 Majors R E LC 3, 862, 864, 866 (1985)
- 13 Verzele M, Dewaele C, LC, 3 22—26, 28 (1985)
- 14 Cazes J (Ed), Preparative-Scale HPLC, A Bibliography Publication V 100 Vorex Corporation, Rockville, Maryland, 1985
- 15 Preparative LC Bibliography, Publication T78, Waters Associates, Milford, Massachusetts 1984
- 16 V Cavano Chim Oggi, (9), 27—29 (1983)
- 17 Denney R C Spec Chem, 3, 4—5 9 (1983)
- 18 Gareil P, Rosset R, Analisis, 10, 397—408 (1982)
- 19 Gareil P, Rosset R, Analisis, 10, 445—459 (1982)
- 20 Nettleton D E, J Liq Chromatogr, 4 (Suppl I), 141—173 (1981)
- 21 Nettleton D E, J Liq Chromatogr, 4 (Suppl II), 359—398 (1981)
- 22 Bundle D R, Iversen T, Josephson S, Amer Lab (10), 93—94, 96—98 (1980)
- 23 Rabel F M, Am Lab, 12, 126, 128 131—132 (1980)
- 24 Verzele M, Geeraert E J Chromatogr Sci, 18, 559—570 (1980)
- 25 Haywood P A, Munro G, in C E H Knapman (Ed), Developments in Chromatography, Vol 2, Applied Science Publishers, London, 1980, pp 33—68
- 26 Coq B, Creter G, Connet C, Rocca J L Chromatographia, 12, 139—146 (1979)
- 27 Geeraert E, Verzele M Chromatographia, 11, 640—644 (1978)
- 28 Rosset R Analisis, 5, 253—264 (1977)
- 29 Scott R P W, Kucera P, J Chromatogr, 119, 467—482 (1976)
- 30 Grushka E Chromatographia, 8, 53 (1975)
- 31 Rendell M, Process Engineering, (4), 66—70 (1975)
- 32 Wehrl A, Fresenius' Z Anal Chem, 277, 289—302 (1975)
- 33 De Stefano J J, Kirkland J J, Anal Chem, 47(12), 1103A—1104A, 1106A—1108A (1975)
- 34 DeStefano J J, Kirkland J J, Anal Chem, 47(13), 1193A—1195A (1975)
- 35 Fallick G J, Adv Chromatogr 12, 61—97 (1975)
- 36 Virucel M, Lamotte A, Bull Soc Chim France, No 7—8, 1346—1350 (1974).
- 37 Fallick G Amer Lab, 5, 19—20 22, 24, 26—27 (1973)
- 38 Waters J L, J Chromatogr Sci, 9, 428—431 (1971)
- 39 Giddings J C Dynamics of Chromatography, Marcel Dekker, New York, 1965
- 40 Scott R P W Contemporary Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York, 1976
- 41 Karger B L, Snyder L R, Horvath C, An Introduction to Separation Science, Wiley, New York, 1973
- 42 Snyder L R, Kirkland J J, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd edn, Wiley Interscience 1979
- 43 Энгельгард Х Жидкостная хроматография при высоких давлениях — М Мир, 1980
- 44 Knox J H High Performance Liquid Chromatography Columbia University Press, New York 1981
- 45 Done J J, Knox J H, Loheac J Applications of High Speed Liquid Chromatography, Wiley Interscience, New York 1975
- 46 Horvath C (Ed), High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives, Vols 1 and 2, Academic Press, New York, 1980, Vol 3, 1983
- 47 Хроматография Практическое применение метода В 2 х томах/Под редакцией Э Хефтмана — М Мир, 1986
- 48 IUPAC Analytical Chemistry Division Commission on Analytical Nomenclature Pure Appl Chem, 37(4), 459 (1974)
- 49 Bidlingmeyer B A, Warren, Jr, F V, Anal Chem, 56, 1583A—1596A (1984)
- 50 Snyder L R, Principles of Adsorption Chromatography The Separation of Nonionic Organic Compounds, Marcel Dekker, New York, 1967
- 51 Unger K, Porous Silica Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1979
- 52 Simpson C F Practical High Performance Liquid Chromatography, Wiley Heyden, New York, 1976
- 53 Simpson C F, Techniques of Liquid Chromatography, Wiley-Heyden, New York, 1982
- 54 Krstulovic A M, Brown P R, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Theory, Practice, and Biomedical Applications, Wiley-Interscience, New York, 1982
- 55 Pryde A, Gilbert M T, Application of High Performance Liquid Chromatography, Methuen, New York 1979
- 56 Perry S G, Practical Liquid Chromatography, Plenum Press, New York, 1972
- 57 Жидкостная колоночная хроматография В 3 х томах/Под ред Э Дейла и др — М Мир, 1978
- 58 Brown P R High Pressure Liquid Chromatography Biochemical and Biomedical Applications, Academic Press New York, 1973
- 59 Hamilton R J, Sewell P A, Introduction to High Performance Liquid Chromatography Methuen, New York, 1982
- 60 Snyder L R, J Chromatogr Sci, 10, 210 (1972)
- 61 Reichstein T, Shoppee C W, Discussions Faraday Soc, 7, 305—311 (1949)
- 62 Martin A J P, Synge R L M Biochem J 35, 1358 (1941)
- 63 Ref 50, p 94
- 64 Ref 50, p 162 236
- 65 Ref 51, pp 63—76
- 66 McDonald P D, unpublished experiments (1974)
- 67 Waters J L, personal communication (1974)
- 68 Eisenbeiß F., Ehlerding S, Wehrl A, Huber J F K, Chromatographia, 20, 657—663 (1985)
- 69 Mann A F, Chromatogr Int (13), 14—15, 18 (1986)

- 70 DeJong A W J, Poppe H Kraak J C J Chromatogr, **209**, 432—436 (1981)
- 71 Woodward R B in Ultra Resolution in Liquid Chromatography Publ AN 72—103, Waters Associates Milford, Massachusetts, 1972, p 3
- 72 Redel J, J Chromatogr, **168** 273—276 (1979)
- 73 Little J N Cotter R L, Prendergast J A, McDonald P D J Chromatogr **126**, 439—445 (1976)
- 74 Bidlingmeyer B A in A Better Way to Isolate and Purify, Publication B24, Waters Associates, Milford, Mass., 1979, p 14
- 75 Hochberg R B McDonald P D Ponticorvo L Lieberman S J Biol Chem, **251**, 7336—7342 (1976)
- 76 Bombaugh K J Levangie R F J Chromatogr Sci, **8** 560—566 (1970)
- 77 Pettei M J Pilkiewicz F G, Nakanishi K, Tetrahedron Lett, (**24**), 2083—2086 (1977)
- 78 Lesec J, Quvuron C, J Liq Chromatogr, **2**, 467—484 (1979)
- 79 Mohanraj S Herz W J Liq Chromatogr, **4**, 525—532 (1981)
- 80 Johnson W M P, O'Keefe D F, Rihs K, J Chromatogr, **291**, 449—452 (1984)
- 81 Conroe K E Chromatographia, **8** 119—120 (1975)
- 82 Yoshida T Shu C Theimer E T J Chromatogr, **137**, 461—464 (1977)
- 83 Grant D A W Cliffe S J Chromatogr Sci, **20**, 83—96 (1982)
- 84 Mohanraj S, HRC CC, J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun, **7** 46—47 (1984)
- 85 Risk M Lin Y Y, Ramanujan V M S, Smith L L, Ray S M, Trieff N M, J Chromatogr Sci, **17** 400—405 (1979)
- 86 Martin M, Verillon F Eon C Guochon G J Chromatogr, **125**, 17—41 (1976)
- 87 Coq B, Cretier G Rocca I L J Liq Chromatogr **4**, 237—249 (1981)
- 88 Ref 50, pp 77—97
- 89 DeJong A W J Kraak J C Poppe H Nootgedacht F J Chromatogr, **193**, 181—195 (1980)
- 90 Quinn H unpublished experiments 1978
- 91 Horvath C, Nahum A, Frenz J H J Chromatogr **218** 365—393 (1981)
- 92 Horvath C, Frenz J El Rassi Z J Chromatogr **255** 273—293 (1983)
- 93 Fried B Sherma J Thin Layer Chromatography Techniques and Applications, Marcel Dekker New York 1982
- 94 Gasparic J Churocek J Laboratory Handbook of Paper and Thin Layer Chromatography Halsted Press, New York, 1978 esp refs on pp 84—87
- 95 Hara S J Chromatogr **137** 41—52 (1977)
- 96 McDonald P D in A Better Way to Isolate and Purify Publication B24, Waters Associates Milford, Mass 1979 p 7
- 97 Neuring I unpublished experiments, 1978
- 98 Rahn P C Woodman M Beserung W Heckendorf A TLC to Prep Preparative Liquid Chromatography and Its Relationship to Thin Layer Chromatography Publication B62, Waters Associates Milford, Mass., 1979
- 99 Jandera P Churacek J, Gradient Elution in Column Liquid Chromatography Theory and Practice Elsevier, Amsterdam, 1985
- 100 Lottspeich F Henschen A Hupe K P (Eds), High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry de Gruyter Berlin, 1982
- 101 Hancock W J Handbook of HPLC of Biological Compounds Marcel Dekker, New York 1983
- 102 Armstrong D W Boehm R E J Chromatogr Sci, **22**, 378—385 (1984)
- 103 Snyder L R, Stadalus M A Quarry M A Anal Chem **55**, 1412—1414, 1418A, 1421—22A 1424A 1429—30A (1983)
- 104 Litanu C Gocan S Gradient Liquid Chromatography, Halsted Press New York, 1974

- 105 Stacey C, Brooks R, Merton M, J Anal Purif, **3**, 52—56 (1987)
- 106 Schoenmakers P J, Optimization of Chromatographic Selectivity, Elsevier, Amsterdam, 1986
- 107 Martin A J P, in L S Ettre and A Zlatkis (Eds), 75 Years of Chromatography—A Historical Dialogue, Elsevier, Amsterdam, 1979, pp 285—296
- 108 Suteri P K Steroids **2** 687—712 (1963)
- 109 Neher R, Steroid Chromatography, 2nd edn, Elsevier, Amsterdam, 1964
- 110 Majors R E, in C Horvath (Ed), High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives, Vol 1, Academic Press, New York, 1980, pp 75—111
- 111 Melander W R, Horvath C in C Horvath (Ed), High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives, Vol 2, Academic Press, New York, 1980 pp 113—319
- 112 Bidlingmeyer B A Korpi J Little J N, Chromatographia, **15**, 83—85 (1982)
- 113 Richardson H, Bidlingmeyer B A, J Pharm Sci, **73**, 1480—1482 (1984)
- 114 Adamovics J, Unger S J Liq Chromatogr, **9**, 141—155 (1986)
- 115 McDonald P D, unpublished experiments, 1973
- 116 Speier J L, Indust Res Dev, **20**, 131—134 (1978)
- 117 Iler R K, The Chemistry of Silica, Wiley Interscience, New York, 1979 chap 6
- 118 McDonald P D, unpublished experiments, 1972
- 119 Pidacks C, private communication, 1975
- 120 Dewaele C Verzele M, J Chromatogr, **260**, 13—21 (1983)
- 121 Jordi H C, Neue U D, Quinn H M, Rausch C W, in G L Hawk, P B Champlin R F Hutton C Mol (Eds), Biol/Biomed Appl Liq Chromatogr, III, 3rd Intl Symp, Boston, MA, Oct 11—12, 1979, Marcel Dekker, New York, 1981, pp 327—346
- 122 Ref 51, chap 2
- 123 Hansen L C, Gilbert T W J Chromatogr Sci, **12**, 464—472 (1974)
- 124 McDonald P D Vivilecchia R L unpublished work, 1974
- 125 Engelhardt H Muller H, Chromatographia, **19**, 77—84 (1985)
- 126 Unger K K Julge G Janzen R Giesche H Kinkel J N Chromatographia, **22**, 379—380 (1986)
- 127 Unger K K Julge G, Kinkel J N, Heam M T W J Chromatogr, **359** 61—72 (1986)
- 128 Schultz H S, Murphy M, private communication, 1984
- 129 McDonald P D in Waters Sourcebook for Chromatography Columns and Supplies, Waters Chromatography Division, Millipore Corporation, Milford, MA, 1985, p 6
- 130 Yay W W, Kirkland J J Bly D D, Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography, Wiley Interscience New York, 1979
- 131 Бельский Б Г, Виленчик Л Э Хроматография полимеров — М химия, 1978
- 132 Dubin P L (Ed) Aquacois Size Exclusion Chromatography Elsevier, Amsterdam 1987
- 133 Kremmer T Boross L Gel Chromatography, Theory Methodology Applications Wiley Interscience New York 1979
- 134 Janca J (Ed), Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers, Marcel Dekker, New York, 1984
- 135 Warren F V Jr, Bidlingmeyer B A Anal Chem **56**, 950—957 (1984)
- 136 Ref 40, pp 240—241
- 137 Przybytek J T (Ed), High Purity Solvent Guide, 2nd edn, Burdick and Jackson Laboratories, Inc, Muskegon, MI, 1982

- 138 Snyder L R, Glajch J L, Kirkland J J, *J Chromatogr*, **218**, 299—326 (1981)
- 139 Glajch J L, Kirkland J J, Snyder L R, *J Chromatogr*, **238**, 269—280 (1982)
- 140 Ref 109, p 249
- 141 Barford R A, McGraw R, Rothbart H L, *J Chromatogr*, **166**, 365—372 (1978)
- 142 Coq B, Cretier G, Rocca J, *Anal Chem*, **54**, 2271—2277 (1982)
- 143 Poppe H, Kraak J C J, *J Chromatogr*, **255**, 395—414 (1983)
- 144 Bidlingmeyer B A, *LC*, **2**, 578, 580 (1984)
- 145 McDonald P D, unpublished experiment, 1980
- 146 McDonald P D, unpublished experiment, 1973
- 147 Riddick J A, Bunger W B, Sakano T K, *Organic Solvents Physical properties and methods of purification* 4th edn, Wiley-Interscience, New York, 1986
- 148 Spingam N E, Garvie-Gould C T, Vuolo L L, *Anal Chem*, **53**, 565—566 (1981)
- 149 Carlsen L, Egsgaard H, Andersen J R, *Anal Chem*, **51**, 1593—1595 (1979)
- 150 Kiese's H, *Anal Chem*, **52**, 2230—2232 (1980)
- 151 Reagent Chemicals, 7th edn, American Chemical Society, Washington D C, 1986
- 152 Glajch J L, Kirkland J J, Schundel W G, *Anal Chem*, **54**, 1276—1279 (1982)
- 153 Bartlett P L, *Chemtech*, **10**, 354 (1980)
- 154 Engelhardt H, Ahr G, *Chromatographia*, **14**, 227—233 (1981)
- 155 Bredeweg R A, Rothman L D, Pfeiffer C D, *Anal Chem*, **51**, 2061—2063 (1979)
- 156 McDonald P D, unpublished experimental details, 1973
- 157 Karstadt M, Harvard Med School Health Letter, **11**, 5—7 (August, 1986)
- 158 ACS Committee on Chemical Safety, *Safety in Academic Chemistry Laboratories*, 3rd edn, American Chemical Society, Washington, D C, 1979
- 159 Bretherick L (Ed), *Hazards in the Chemical Laboratory*, 3rd edn, The Royal Society of Chemistry, London, 1981
- 160 Mellan I, *Industrial Solvents Handbook*, Noyes Data, Park Ridge New Jersey, 1977
- 161 Manufacturing Chemists Association, *Guide for Safety in the Chemical Laboratory*, 2nd edn, Van Nostrand Reinhold, New York, 1972
- 162 Sax N J, *Dangerous Properties of Industrial Materials* 6th edn, Van Nostrand Reinhold, New York, 1984
- 163 Collings A J, Luxon S G (Eds), *Safe Use of Solvents* Academic Press, Orlando, 1982
- 164 Freeman N T, Whitehead J, *Introduction to Safety in the Chemical Laboratory* Academic Press, Orlando, 1982
- 165 Proctor N H, Hughes J P, *Chemical Hazards of the Workplace*, Lippincott, Philadelphia, 1978
- 166 Fuscaldo A A, Erluck B J, Hindman B (Eds), *Laboratory Safety, Theory and Practice*, Academic Press, New York, 1980
- 167 National Research Council, *Committee on Hazardous Substances in the Laboratory, Prudent Practices for Handling Hazardous Chemicals in Laboratories*, National Academy Press, Washington, D C, 1981
- 168 National Research Council, *Committee on Hazardous Substances in the Laboratory, Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories*, National Academy Press, Washington, D C, 1983
- 169 Huber J F K (Ed), *Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1978

- 170 Scott R P W, *Liquid Chromatography Detectors*, 2nd edn, Elsevier, Amsterdam, 1986
- 171 Vickrey T M, *Liquid Chromatography Detectors*, Marcel Dekker, New York, 1983
- 172 Parris V A, *Instrumental Liquid Chromatography A Practical Manual on High Performance Liquid Chromatography Methods*, 2nd edn, Elsevier, Amsterdam, 1984
- 173 Poole C F, Schuette S A, *Contemporary Practice of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984
- 174 Baptista J, Gupta I, Krepinsky J J, *Chromatographia*, **20**, 117—119 (1985)
- 175 Matlin S A, Chan L J, *High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, **7**, 570—576 (1984)
- 176 Matlin S A, Chan L J, *High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun*, **8**, 23—27 (1985)
- 177 Cretier G, Rocca J L, *Chromatographia*, **16**, 32—38 (1982)
- 178 Meiris R B, in C E H Knapman (Ed), *Developments in Chromatography*, Vol 2, Applied Science Publishers London, 1980, pp 1—32
- 179 1986—1987 Lab Guide, *Anal Chem*, **58** (Issue 10, 1986)
- 180 Curling J, *Amer Lab*, **47**, 49—50, 52—58 (May 1976)
- 181 Curling J, *Amer Lab*, **31**—34, 36, 38—39 (June 1976)
- 182 Kwok J, Snyder L R, Sternberg J C, *Anal Chem*, **40**, 118—122 (1968)
- 183 McDonald P D, Russo M, unpublished experiments (1975)
- 184 DeStefano J J, Beachell H C, *J Chromatogr Sci*, **10**, 654—662 (1972)
- 185 McDonald P D, unpublished experiments (1974—1975)
- 186 Sie S T, van den Hoed N, *J Chromatogr Sci*, **257**—266 (1969)
- 187 Hazelton H R, *Lab Pract*, **178**—179 (April 1974)
- 188 Timmins R, Mur L, Ryan J M, *Chem Eng (N Y)*, **170**—178 (May 19, 1969)
- 189 Godbille E, Devaux P, *J Chromatogr Sci*, **12**, 564—569 (1974)
- 190 Godbille E, Tondu L, U S Patent 3, 966, 609 (1976)
- 191 McDonald P D, Rausch C W, U S Patent 4, 250, 035 (1981)
- 192 Fallick G J, C W Rausch, *Amer Lab*, **11**, 87, 89—90, 92, 94, 97 (1979)
- 193 McDonald P D, Rausch C W, Quinn H M, Dauchy J D, Poster No C16, 14th Intl Symp on Chromatogr, London, September 13—17, 1982, manuscript in preparation
- 194 Biesenberger J A, Tan M, Duvdevanu I, Maurer T, *J Polymer Sci, Polymer Lett*, **B9**, 353—357 (1971)
- 195 Biesenberger J A, Duvdevanu I, Tan M, U S Nat Tech Inform Serv, AD Rep, No 732780 (1971), Avail NTIS, from Govt Rep Announce (U S), **72**(1), 50 (1972)
- 196 Duvdevanu I, Biesenberger J A, Tan M, *J Polymer Sci, Polymer Lett*, **B9**, 429—434 (1971)
- 197 Henry R A, Byme S H, Hudson D R, *J Chromatogr Sci*, **12**, 197—199 (1974)
- 198 Barker P E, Deeble R E, *Chromatographia*, **8**, 67—79 (1975)
- 199 Sussman M V, Rathore R N S, *Chromatographia*, **8**, 55—59 (1975)
- 200 Barker P E, *Dev Chromatogr*, **1**, 41—86 (1978)
- 201 Curling J. M., in E Hofmann, W Pfeil, and H Aurich (Eds), *FEBS Proc 12th Mtg, Vol 52, Symp S3 and S4, Colloq C5, Protein Structure, Function, and Industrial Applications*, Dresden, 1978, Pergamon Press New York, 1979, pp 45—58
- 202 Dwyer J L, *Bio/Technology*, **2**, 957—958, 961, 963—964 (1984)
- 203 Dwyer J L, *Kem-Kem*, **12**, 247—251 (1985)
- 204 Chase H A, *J Biotechnol*, **1**, 67—80 (1984)
- 205 Heckendorf A H, Ashare E, Rausch C, *ACS Symp Ser*, **271**, 91—103 (1985)

- 206 *Calton G J*, in *I M Chaiken M Wilchek and I Parikh* (Eds), Proc 5th Int Symp Affinity Chromatogr Biol Recognit Academic Press Orlando 1983, pp 383—391
- 207 *Barker P E, Deeble R L* Anal Chem, **45**, 1121—1125 (1973)
- 208 *Szepesy L, Sebastyen Zs Feher I Nagy Z* J Chromatogr **108**, 285—297 (1975)
- 209 *Waters J I* J Chromatogr **55** 213—219 (1971)
- 210 *Conder J R Shungari M K* J Chromatogr Sci, **11**, 525—534 (1973)
- 211 *Mazsaroff I Regnier F E* J Lq Chromatogr **9** 2563—2583 (1986)
- 212 *Vuhelm A M Riba J P Muratei G Peyrouset A, Precnner R* J Chromatogr **363**, 113—123 (1986)
- 213 *Martin M Eon C Guocchon G* J Chromatogr **108** 229—241 (1975)
- 214 *Lim C K* (Ed) Hplc of Small Molecules, a Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1986
- 215 *Braithwaite A Smith F J* Chromatographic Methods 4th edn, Chapman and Hall London 1985
- 216 *Christie W W* Lebensm Unters Forsch A, **181**, 171—182 (1985)
- 217 *Ferreri L F* Lab Res Methods Biol Med **10**, 133—56 (1984)
- 218 *Gohring W, Gemeiner M Moroder L Nyfelder R Wunsch E* in *W Vo' tcr E Wunsch and Y Ovchurnikov* (Eds) Proc 3rd USSP—FRG Symp Chem Pept Proteins 1980 de Gruyter Berlin 1982 pp 359—365
- 219 *Gabriel T F Michalewsky J Meienhofer J* in *A N Eberte R Geiger and T Wieland* (Eds), Perspect Pept Chem, Karger, Basel, 1981 pp 195—206
- 220 *Smith J A McWilliams R A* Am Lab, **12**, 25—26, 28 (1980)
- 221 *Curling J M* Protides Biol Fluids, 27th, 833—838 (1980)
- 222 *Edgell M H Weaver S, Naigwood N Hutchison C A* III Genet Eng, **1** 27—49 (1979)
- 223 *Cohn W E*, in *E Heftmann* (Ed), Chromatography, 3rd edn Van Nostrand—Reinhold New York, 1975, pp 714—743
- 224 *Rivier J McClintock R, Galyean R, Anderson H*, J Chromatogr **288** 303—328 (1984)
- 225 *Bishop C A Harding D R K, Meyer L J Hancock W S Heam M T W* J Chromatogr **192** 222—227 (1980)
- 226 *Patel K M, Morrisett J D, Sparrow J T*, J Lipid Res, **20**, 674—677 (1979)
- 227 *Shaw R, Elliott W H* J Chromatogr, **177**, 289—295 (1979)
- 228 *Schmuck M N Gooding K M Gooding D L*, J Liq Chromatogr, **7**, 2863—2874 (1984)
- 229 *Heam M T W* J Liq Chromatogr, **3**, 1255—1276 (1980)
- 230 *Dixon R Evans R Crews T* J Liq Chromatogr, **7**, 177—190 (1984)
- 231 *Oleman C Voskamp D Verhage M* in *G L Hawk* (Ed) 4th Symp Biological/Biomedical Appl Liq Chromatogr Amsterdam April 28—29 1981, Marcel Dekker, New York, 1982, pp 1—12
- 232 *Meyer V R* J Chromatogr, **316**, 113—124 (1984)
- 233 *Iconomou N G* Pharm Delt, Epistem Ekdo, sis **9**, 31—42 (1983)
- 234 *Waner I W* (Ed) Liquid Chromatography in Pharmaceutical Development An Introduction, Aster Pub Corp, New York, 1985
- 235 *Wall M E, Wanu M C, Taylor H* Cancer Treat Rep, **60** 1011—1030 (1976)
- 236 *Kubeczka K H* in *A Baerheim Svendsen and J J C Schejfer* (Eds) Proc 15th Int Symp Essent Oils Aromat Plants, 1984, Nijhoff/Junk, Dordrecht, Netherlands 1985, pp 107—126
- 237 *Tittel G, Wagner H* in Stud Org Chem (Amsterdam) **11**, 299—310 (1982)
- 238 *Dong M, Schmeltz I, Hoffmann D*, J Chromatogr, **150**, 269—272 (1978)

- 239 *Shenbagamurthi P, Naider F, Becker J M, Steinfeld A S*, J Chromatogr, **256**, 117—125 (1983)
- 240 *Shenbagamurthi P, Smith H A, Becker J M, Naider F*, J Chromatogr, **245**, 133—137 (1982)
- 241 *Tiebach R K, Schramm M*, Chromatographia, **13**, 403—407 (1980)
- 242 *Hupe K P, Lauer H, Zech K* Chromatographia, **13**, 413—420 (1980)
- 243 *Warthen, Jr, J D*, J Liq Chromatogr, **3**, 279—286 (1980)
- 244 *Patel K M, Sparrow J T*, J Chromatogr, **150**, 542—547 (1978)
- 245 *Lam L K T, Yee C, Chung A, Wattenberg L W* J Chromatogr, **328**, 422—424 (1985)
- 246 *Davankov V A, Kurganov A A, Bochkov Al S*, Adv Chromatogr (N Y), **22**, 71—116 (1983)
- 247 *Giger W, Ahel M, Schaffner C*, Comm Eur Communities, Rep EUR, EUR 8518, Anal Org Micropollut Water, 91—109 (1984)
- 248 *Schundlbauer H, Zander M*, Erdoel Kohle, Erdgas, Petrochem, **37**, 206—211 (1984)
- 249 *Pei P, Britton, Jr, J Hsu S*, J Liq Chromatogr, **6**, 627—645 (1983)
- 250 *Hostettman K, Hostettmann-Kaldas M, Nakanishi K*, J Chromatogr, **170**, 355—362 (1979)
- 251 *Boni K A*, in *R R. Myers and J S. Long* (Eds), Treatise Coat, Vol 2(2), Marcel Dekker, New York, 1976, pp 67—121
- 252 *Cooper A R, Hughes A J Johnson J F*, J Appl Polymer Sci, **19**, 435—450 (1975)
- 253 *Chuang J-Y, Johnson J F*, Separation Sci, **10**, 161—165 (1975)
- 254 *Kato Y, Kametani T, Furukawa K, Hashimoto T*, J Polymer Sci, Polymer Phys Edn, **13**, 1695—1703 (1975)
- 255 *Cooper A R, Hughes A. J, Johnson J. F*, Chromatographia, **8**, 136—142 (1975)
- 256 *Mikes O* High Performance Liquid Chromatography of Biopolymers and Biologomers, Parts A and B, Elsevier, Amsterdam, 1987
- 257 *Naden D, Streat M* (Eds), Ion Exch Technol, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1984
- 258 *Walton H F* (Ed), Ion Exchange Chromatography, Halsted Press, New York, 1976
- 259 *Chase H A* in *D Naden and M Streat* (Eds), Ion Exch Technol, Horwood, Chichester, UK 1984, pp 400—406
- 260 *Dean P D C, Walker J N B*, Biochem Soc Trans, **13**, 1055—1058 (1985)
- 261 *Chase H A*, J Chromatogr **297**, 179—202 (1984)
- 262 *Туркова Я* Аффинная хроматография — М Мир 1980
- 263 *Chaiken I M, Wilchek M, Parikh I*, (Eds), Affinity Chromatography and Biological Recognition, Academic Press, Orlando, 1983
- 264 *Schott H*, Affinity Chromatography, Template Chromatography of Nucleic Acids and Proteins, Marcel Dekker, New York, 1984
- 265 *Lawrence J F Frei R W* Chemical Derivatization in Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1976
- 266 *Canale M Bistarini S Merler M* Arch Toxicol, **37**, 143—147 (1977)
- 267 *Jost W, Hauck H E, Eisenbeil B F*, Fresenius' Z Anal Chem, **318** 300—301 (1984)
- 268 *Cretier G, Rocca J L* Chromatographia, **20**, 461—465 (1985)
- 269 *Hupe K P, Lauer H* J Chromatogr, **203** 41—52 (1981)
- 270 *Meyer V R*, poster paper, 10th Int Symp Column Liq Chromatogr, San Francisco, May 1986
- 271 *DeJong A W J Smut J C, Poppe H, Kraak J C* Anal Proc (London), **17**, 508—512 (1980)
- 272 *Cretier G, Rocca J L* Chromatographia, **18** 623—627 (1984)
- 273 *Geeraert E, Verzele M*, Chromatographia, **12**, 50—51 (1979)

274. *Larmann J. P., Williams R. C., Baker D. R.*, *Chromatographia*, **8**, 92—96 (1975).
275. *Wehrli A., Hermann U., Huber J. F. K.*, *J. Chromatogr.*, **125**, 59—70 (1976).
276. *Bombaugh K. J., Almquist P. W.*, *Chromatographia*, **8**, 109—118 (1975).
277. *Pei P., Ramachandran S., Henly R. S.*, *Amer. Lab.*, 37—40 (Jan. 1975).
278. *Done J. N.*, *J. Chromatogr.*, **125**, 43—57 (1976).
279. *DeJong A. W. J., Poppe H., Kraak J. C.*, *J. Chromatogr.*, **148**, 127—141 (1978).
280. *Halasz I.*, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **277**, 257—266 (1975).
281. *Baker D. R., Henry R. A., Williams R. C., Hudson D. R., Parris N. A.*, *J. Chromatogr.*, **83**, 233—243 (1973).
282. *Reese C. E., Grushka E.*, *Chromatographia*, **8**, 85—91 (1975).
283. *Guillemin C. L.*, *J. Chromatogr.*, **30**, 222—225 (1967).
284. *Bidlingmeyer B. A., Melli J.*, *Chem.-Tech.*, **8**, 169—175 (1979).
285. *Still W. C., Kahn M., Mitra A.*, *J. Org. Chem.*, **43**, 2923—2925 (1978).
286. *Verzele M., Dewaele C., Van Dijck J., Van Haver D.*, *J. Chromatogr.*, **249** (1982), 231—238.
287. *Beachell H. C., DeStefano J. J.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 481—486 (1972).
288. *DeStefano J. J., Beachell H. C.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 434—438.
289. *Matissek R., Haeussler M.*, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.*, **81**, 50—52 (1985).
290. *Pietrzyk D. J., Cahill, Jr., W. J.*, *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 781—796 (1982).
291. *Thiem J., Stevers A.*, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **304**, 369—373 (1980).
292. *Chow H.-C., Caple M. B., Strouse C. E.*, *J. Chromatogr.*, **151**, 357—362 (1978).
293. *Pietrzyk D. J., Stodola J. D.*, *Anal. Chem.*, **53**, 1822—1828 (1981).
294. *Sasaki H., Sakamoto K., Matsubara K., Matsuda T., Kato Y.*, *Toyo Soda Kenkyu Hokoku*, **29**, 77—100 (1985).
295. *Rimbock K.-H., Kastner F., Mannschreck A.*, *J. Chromatogr.*, **329**, 307—310 (1985).
296. *Beck W., Halasz I.*, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **291**, 340—348 (1978).
297. *Hara S., Hirasawa M., Miyamoto S., Ohsawa A.*, *J. Chromatogr.*, **169**, 117—127 (1979).
298. *Griffin G. F., Bennett S. C., Chu F. S.*, *J. Chromatogr.*, **280**, 363—370 (1983).
299. *Kucera P.* (Ed.), *Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1984.
300. *Scott R. P. W.* (Ed.), *Small Bore Liquid Chromatographic Columns: Their Properties and Uses*, Wiley, New York, 1984.
301. *Sagaliano, Jr., N., Shish-Hsien H., Floyd T. R., Raglione T. V., Hartwick R. A.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 238—246 (1985).
302. *Suatoni J. C.*, *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 121—136 (1979).
303. *Okamoto Y.*, *Chemtech*, **17**, 176—181 (1987).
304. *Hamilton R., Hamilton S., Kealey D.*, *Thin-Layer Chromatography*, John Wiley, New York, 1987.
305. *Самсонов Г. В., Меленевский А. Т.* Сорбционные хроматографические методы в физико-химической биотехнологии. — Л.: Наука, 1986.
306. *Glockner G.*, *Polymer Characterization by Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1987.

2

Препаративная тонкослойная хроматография

И. Шерма, Б. Фрайд

2.1. Введение

Препаративная тонкослойная хроматография ПТСХ используется для разделения и выделения материалов в количествах, больших чем в обычной аналитической ТСХ. Величина пробы может меняться от 10 мг до более чем 1 г. В препаративной ТСХ разделяемые материалы часто наносятся на пластинку не в виде пятен, а в виде длинных полосок. После проявления конкретные компоненты могут быть выделены путем соскабливания слоя сорбента с пластинки в нужной области и последующего вымывания разделенного материала с сорбента с помощью сильного растворителя. Материал, выделенный из слоя, может требовать дальнейшей очистки методом ТСХ или другими хроматографическими методами, если его чистота недостаточна для идентификации и определения структуры с помощью элементного анализа или спектрометрии, для изучения биологической активности или применения в химическом синтезе или для использования в качестве стандартного материала при сравнении с неизвестными образцами.

Методики ПТСХ и аналитической ТСХ обычно аналогичны. Главное различие заключается в использовании в ПТСХ толстых слоев. Разделение в ТСХ быстрее, она удобнее классической колоночной хроматографии, намного дешевле и менее сложна, чем высокоэффективная колоночная жидкостная хроматография. Оборудование и приемы работы просты, ими проще овладеть, и их проще использовать. Определенными преимуществами ПТСХ являются: использование малых количеств растворителя, легкая оценка параметров разделения с помощью аналитической ТСХ, возможность многомерного проявления для получения более четких разделений, прямое детектирование на слое, простое удаление разделенных зон с пластинки, возможность одновременного проявления соединения сравнения при идентичных условиях разделения, что помогает определить местоположение на пластинке интересующих соединений. Разрешение на слоях и в колонке должно быть сопоставимым, если используют эквивалентные нагрузки (отношение массы образца к массе сорбента). Возможными недостатками ПТСХ являются: разложение лабильных соединений при контакте с воздухом и

светом на незащищенной (наружной) поверхности слоя, наличие в выделенном соединении экстрагированных загрязнений или мелких частиц сорбента.

В 1962 г. Риттер и Мейер [1] привели данные по ПТСХ на слоях толщиной 1 мм. Более ранняя препаративная работа (например, [2]), хотя и была обозначена как ТСХ, в действительности выполнена на стержнях адсорбентов, использованных в качестве колонок, или на аналитических слоях после колоночной хроматографии [3, 4]. ПТСХ проводили также на конических [5] и цилиндрических [6] слоях, на покрытых слоем лентах [7], в слоях, нанесенных на конструкции из нержавеющей стали [8], и с использованием другой специальной аппаратуры и форм слоев. Однако чаще всего препаративные работы по ПТСХ выполняют на регулярных плоских тонких слоях с увеличенной толщиной, и в этой главе будет рассмотрена главным образом именно эта разновидность ТСХ. Следующие разделы посвящены экспериментальным методам, используемым в ТСХ при работе с большими образцами, а также вопросам, связанным с масштабированием аналитической ТСХ.

2.2. Слои для ПТСХ

Слои для ПТСХ готовят в лаборатории или покупают готовые пластинки с нанесенным слоем. Для самодельных слоев обычно используют специальные сорбенты, поставляемые некоторыми фирмами для ПТСХ. Наиболее популярные пластинки для ПТСХ имеют толщину слоя 0,5—2 мм (500—2000 мкм) и размеры 5×20, 10×20, 20×20, 20×40 или даже 20×100 см. Условиями успешного разделения на препаративных пластинках являются: гомогенный слой, регулярно нанесенный образец и хорошо насыщенная камера для проявления. Последнее обстоятельство важно, поскольку вещества двигаются в слое с изменяющейся скоростью в соответствии со скоростью испарения растворителя. Они быстрее двигаются на поверхности слоя и более медленно на части слоя, находящейся ближе к пластинке. Эта разность скоростей меньше в полностью насыщенной камере.

Препаративные пластинки изготавливают с помощью устройств для нанесения, или аппликаторов, предпочтительно с устанавливаемой шириной щели. Количество наносимого сорбента от случая к случаю меняется. Для силикагеля оно составляет 20—25 г на пластинку с размерами 20×20 см со слоем толщиной 1 мм. Имеется опасность, что толстые слои могут растрескаться при сушке. Поэтому количество воды в суспензии сорбента или пасты должно быть уменьшено, количество связывающего материала (гипса) увеличено; сушку проводят более

медленно с использованием инфракрасного излучения, направленного сверху [9]. Для того чтобы исключить возникающую при этом неоднородность поверхностных слоев, некоторые исследователи оставляют пластинки на ночь и последующую сушку проводят при 80 °С [10].

Различные исследователи спорят об оптимальной толщине слоя для ПТСХ. В общем увеличение толщины ведет к большей емкости образца, но уменьшает разрешение зон. Шталь и сотр. [11] предсказывают неоднородную скорость проявления, связанную с толщиной слоя, и плохое разделение на слоях, имеющих толщину больше чем 0,5—1 мм, тогда как Хонеггер [9] считает, что оптимальные толщины слоев находятся в пределах 1—3 мм. По мнению Халпаапа [12], можно использовать слой толщиной 2 мм, однако при больших толщинах разделение ухудшается. Важно, что разрешение, сложность образца, нагрузка и толщина слоя взаимосвязаны, поэтому нагрузка и толщина должны быть выбраны таким образом, чтобы при разделении между зонами интересующих веществ с каждой стороны было по крайней мере 3 мм чистого пространства. Толстые слои содержат большее количество подвижной фазы и требуют более длительной сушки при многомерных проявлениях. Было найдено, что слои толщиной 5—10 мм, приготовленные из частиц силикагеля с увеличенным количеством связующего, пригодны только для грубых разделений [12].

Свободные слои силикагеля и оксида алюминия без связующего толщиной 1—3 мм использовали на горизонтальных или слегка наклонных пластинках [13, 14]. Из-за экспериментальных проблем, связанных с нанесением на такие свободные слои образцов и детектированием зон, большинство исследователей предпочитают связанные слои.

Для приготовления препаративных слоев продаются порошки силикагеля и оксида алюминия, содержащие для улучшения адгезии мелкие частицы без добавления постороннего связующего, а также сорбенты, содержащие в качестве связующего сульфат кальция (Р-серии). Для детектирования зон с помощью гашения флуоресценции сорбенты могут содержать люминофоры на 254 или 254 и 366 нм. Следует тщательно следовать инструкциям производителей по нанесению суспензий порошка, их сушке и активированию, чтобы избежать растрескивания и шелушения слоев. В настоящее время для препаративной хроматографии широко используют слои из силикагеля или оксида алюминия. Детальные указания и предостережения по нанесению препаративных слоев различной толщины можно найти в книге Халпаапа [12].

В продаже имеются пластинки со слоями силикагеля толщиной 500, 1000, 1500 и 2000 мкм, закрепленные либо органи-

ческими соединениями («жесткие пластинки»), либо гипсом в качестве связующего, содержащие или не содержащие флуоресцентные индикаторы. Пластинки с нанесенными слоями удобны в работе, и поэтому их используют в настоящее время в ПТСХ наиболее широко. Доступны препаративные пластинки различных размеров, причем наиболее популярны пластинки 10×20, 20×20 и 20×40 см. Преимуществом более широких пластинок является их большая емкость, более длинных — увеличенное расстояние проявления. Однако из-за большого времени проявления и большого размывания зон при увеличении длины пластинки обычно предпочитают многомерное проявление на 20-см пластинке. Доступны также препаративные пластинки с нанесенным слоем оксида алюминия, микрокристаллической целлюлозы, волокнистой целлюлозы и обращенной фазы C_{18} , однако пока наиболее широко используется силикагель.

Для улучшения результатов, получаемых в ПТСХ, были разработаны две уникальные пластинки. Линейная препаративная пластинка фирмы Whatman содержит полосу преадсорбента; это должно упрощать нанесение образца вдоль нижнего края слоя силикагеля или химически связанной C_{18} -обращенной фазы. Конусные пластинки фирмы Analtech содержат клинообразный слой силикагеля с переменной толщиной от 30 мкм у основания до 1700 мкм у вершины с примыкающим преадсорбирующим слоем толщиной 700 мкм для нанесения образца. Как утверждают, на таких пластинках лучшее разрешение зон по сравнению с обычными пластинками для препаративной ТСХ связано с тем, что растворитель и зона мигрируют при проявлении аналогично тому, как это происходит в радиальной (циркуляционной) ТСХ. Площадь поперечного сечения слоя при прохождении фронта растворителя увеличивается на клинообразных слоях так, что линейная скорость потока является наивысшей у основания слоя и уменьшается по направлению движения фронта растворителя. В результате тыл зоны движется быстрее, чем фронт, приводя к фокусированию или концентрированию зоны при проявлении и уменьшению размывания полосы.

2.3. Нанесение образца

На аналитическую пластинку размером 20×20 см наносят до 5 мг образца, и если этого количества достаточно для дальнейшего использования, то нет необходимости использовать более толстые препаративные слои.

Перегрузка аналитической пластинки будет очевидна из появления размытой на хвосте или каким-либо другим способом нарушенной зоны. На аналитические пластинки с инертным преадсорбентом или распределяющей площадью Whatman

Linear-K или Analtech можно без потери разрешения нанести большие количества образца, чем на пластинки со стандартным адсорбентом.

Согласно эмпирическому правилу, емкость ПТСХ-пластинки увеличивается как корень квадратный из толщины, без потери или с небольшой потерей разрешения; поэтому слой толщиной 1000 мкм имеет вдвое большую емкость, чем слой 250 мкм. Нагрузка может быть увеличена сверх этого количества, если допустимо ухудшение разрешения. Действительное количество, которое можно нанести, зависит от размера пластинки, толщины слоя, используемого сорбента и конкретно разделяемого образца. Например, Хонеггер [9] наносил 5—25 мг образца на 1 мм толщины слоя для пластинки размером 20×20 см со слоем силикагеля G. До проведения препаративного разделения может быть экспериментально подобрана оптимальная емкость слоя: раствор смеси, подлежащий разделению, наносят на пластинку в различных концентрациях. После проявления и детектирования смотрят, при какой наибольшей концентрации наблюдается требуемое разделение.

Образец растворяют в как можно более неполярном летучем растворителе при концентрациях, которые позволяют адсорбировать компоненты образца на слое без выпадения кристаллов. Перегрузка до появления кристаллов может дать очень сильно искаженные полосы или пятна, так как лимитирующим фактором становится скорость растворения компонентов в движущемся растворителе [15]. Наиболее типична концентрация 2—10%.

Рекомендуется до нанесения образца предварительно промывать пластинки путем проявления растворителя, чтобы уменьшить загрязнения, которые могут быть затем выделены вместе с интересующим компонентом в процессе ступенчатого элюирования. Пластинки с силикагелем обычно предварительно промывают смесью хлороформ—метанол (1 : 1 по объему) или этиловым эфиром, содержащим 1% аммиака или уксусной кислоты в зависимости от того, будет последующая подвижная фаза кислой или щелочной. Для этого предварительного проявления пластинки могут быть оставлены в баке на ночь. Затем пластинки сушат в печи или в вакуумном эксикаторе.

Образцы обычно наносятся в виде узкой полосы 3—5 мм шириной вдоль пластинки на расстоянии 2,5 см от нижнего края. Нанесение образца в виде полосы удобно для нанесения больших количеств образца на слой, к тому же и разрешение при нанесении полос обычно превосходит разрешение, получаемое при нанесении пятен. Образец объемом до 10 мл можно нанести вручную, используя шприц или простую пипетку и линейку с нескошенным краем в качестве направляющей.

Полоса должна быть как можно более прямой и узкой, должна отстоять по крайней мере на 1—3 см от каждого края пластинки во избежание «краевых эффектов», из-за которых растворитель движется быстрее или медленнее (обычно быстрее) по краям, чем в центре (14—18 см для пластинки 20×20 см). Для получения однородной полосы образца необходим тщательный контроль скорости движения и потока из пипетки. Часто для нанесения требуемого количества раствора операцию повторяют несколько раз. При этом, прежде чем нанести полосу следующий раз, очень важно полностью удалить растворитель. Если растворитель образца не полностью удален, то будут образовываться широкие полосы, неоднородные по концентрации в вертикальном направлении [15]. По этой же причине используемый метод нанесения полос не должен давать царапин или разрушать слой адсорбента. Царапины будут мешать правильному регулярному движению носителя, затрудняя последующее выделение компонента [15, 16]. Если при нанесении образца полоса становится чрезвычайно широкой (высокой), ее можно сделать более узкой с помощью предварительного проявления на расстоянии 1—2 см очень полярным растворителем. После этого растворитель тщательно выпаривают и проявление осуществляют с помощью подходящей хроматографической подвижной фазы [17]. Хонеггер [9] наносил образцы в V-образную канавку шириной 1—2 мм, высотой в половину слоя. В этом методе следует позаботиться, чтобы не удалить весь адсорбент, вплоть до стеклянной пластинки, поскольку это могло бы помешать движению подвижной фазы. Наносят также небольшие круглые пятна плотно друг к другу вдоль пластинки, для того чтобы получить полосу, однако эта операция трудоемка, занимает много времени и может приводить к неоднородности, которая будет вредить разделению компонентов с близкими значениями R_f .

При использовании ПТСХ-пластинок с зоной инертного преадасорбента при нанесении полосы допускается меньшая осторожность. Преадасорбированный слой готовят из инертного неадсорбирующего материала, который служит в качестве «удерживающей зоны» для компонентов образца до начала проявления. Растворенные компоненты мигрируют с фронтом растворителя через слой преадасорбента, улучшая таким образом разрешение. Хотя на пластинках с преадасорбентом при нанесении образца допускается меньшая осторожность, не следует упускать из виду возможность образования высоких концентраций и эффектов перегрузки, особенно в случаях неочищенных образцов. Можно ожидать, что оптимальные результаты будут в тех случаях, когда тщательное нанесение образца делается даже в случае использования пластин с преадасорбентом. До-

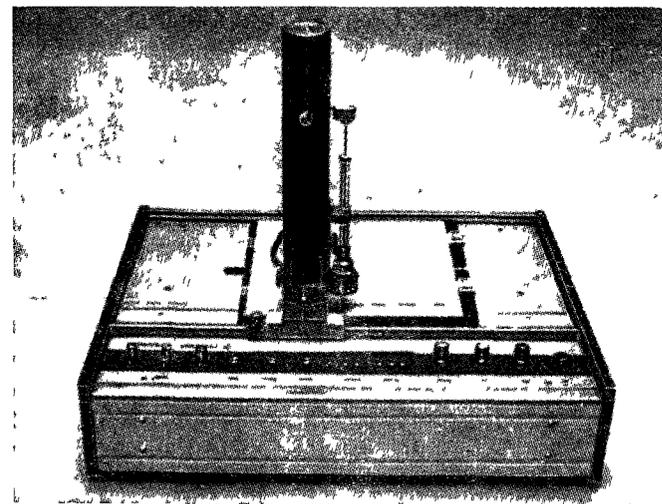


Рис. 2.1. Прибор для автоматического нанесения проб фирмы Camag.

полнительными преимуществами этих пластин является то, что на них может быть достигнута некоторая предварительная очистка благодаря осаждению нерастворимых веществ из образца на преадасорбенте.

Описаны конструкции ряда аппликаторов для ПТСХ [18, 20], и можно купить пипетки и более или менее автоматизированные устройства для нанесения образца. На рис. 2.1 показан прибор фирмы Camag, с помощью которого можно наносить путем распыливания до 495 мкл образца из предварительно заряженного шприца емкостью 500 мкл в виде полосы 1—3 мм шириной и до 199 мм длиной. Движение поршня цилиндра и пластинки, а также поток газа—азота регулируется автоматически, что позволяет наносить предварительно заданный объем образца на полосу заданной длины. В аналитической ТСХ 2—99 мкл можно нанести из 100-мкл шприца в виде более коротких полос. На незакрепленные слои образцы наносят в виде капель, расположенных близко друг к другу, или образец разбрызгивают через подходящую маску. Трудность нанесения образца без разрушения слоя — главная причина, препятствующая широкому использованию незакрепленных слоев.

2.4. Проявление

Проявление обычно выполняют методом восходящего потока так же, как в аналитической ТСХ. Используют оптимальную систему растворителей (подвижную фазу), предварительно вы-

бранную для данного разделения. Потенциально имеется возможность найти в литературе по ТСХ подходящую систему растворителей для широкого круга соединений. Для конкретных соединений Цвейг и Шерма [21] и Кирхнер [22] приводят обширный список подвижных фаз и подобранных сорбентов. Прежде чем использовать ПТСХ, следует испытать растворители с помощью аналитических пластинок или покровных стекол для микроскопа. Возможно, понадобится методом проб и ошибок модифицировать систему, которая первоначально была оптимальной для аналитических ТСХ-разделений. Это особенно справедливо в тех случаях, когда используют многократные проявления. Более толстые слои ПТСХ-пластинок быстрее, чем аналитические пластинки, исчерпывают растворитель в камере. Поэтому может возникнуть необходимость добавить дополнительное количество растворителя в камеру в процессе проявления. Для этого в крышке некоторых баков предусматривают отверстие. При добавлении растворителя следует быть осторожным, чтобы не возмутить жидкость, которая уже находится в баке [15]. Так же как в аналитической ЖХ, подвижная фаза должна быть приготовлена из доступных наиболее чистых растворителей. В соответствии с Кирхнером [22], Шталем [23] и Халпапом [12, 17] разрешение сложных смесей может быть улучшено путем проведения многократного проявления растворителями меньшей полярности, что первоначально даст низкое значение R_f . После каждого опыта растворитель должен быть испарен. Следующие разделения выполняют в том же направлении с использованием той же или другой подвижной фазы. Для некоторых разделений для заметного улучшения требуется провести до 10 проявлений. Практически обычно проводят 2—3 восходящих проявления.

После детектирования и элюирования неполностью разделенные фракции с препаративной пластинки можно рехроматографировать на более тонких аналитических слоях. Халпап [12] провел обширные табличные и графические данные, показывающие преимущества многократного восходящего проявления в ПТСХ. Пластины размером 20×20 см в ПТСХ проявляют каждую отдельно в обычной прямоугольной или типа «сэндвич» камерах. Имеются ПТСХ-камеры для размещения больших (20×40) пластинок. Одновременное проявление многих пластинок можно выполнить в специальном баке или мультисандвичевой камере. На рис. 2.2 показана камера для препаративных разделений фирмы Desaga со штативом той же фирмы. В этом аппарате можно разместить до 10 пластинок размером 20×40 см или 20 пластинок 20×20 см. Камера закрывается стеклянной крышкой с приспособлением для заполнения растворителем.

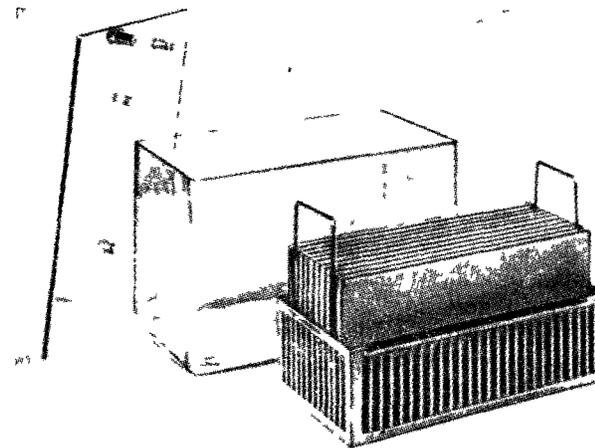


Рис. 2.2 Камера для препаративного разделения со штативом для одновременного проявления нескольких пластинок фирмы Desaga

Вопреки рекомендациям Халпапа [12] по проведению многократного восходящего проявления современный технический бюллетень по ПТСХ [24] предлагает использовать только одно проявление. Рекомендация Халпапа была основана на использовании самодельных пластинок, тогда как технический бюллетень ссылается только на коммерческие пластинки. Однако независимо от типа используемой пластинки процедура проявления диктуется прежде всего сложностью и количеством хроматографируемого образца.

Хотя преимущественным методом проявления в ПТСХ служит восходящее элюирование, Хоробин [25] использовал непрерывное нисходящее элюирование в бак с верхним расположением резервуара.

2.5. Детектирование зон

Если интересующие компоненты окрашены, то их положение легко определить визуально при дневном свете. Аналогично флуоресцирующие соединения можно детектировать визуально в ультрафиолетовом свете. На пластинках с добавкой флуоресцентного материала (на коммерческих пластинках имеется маркировка «F» или «UV») разделенные вещества будут видны как темные зоны на светлом фоне при рассмотрении в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 или 366 нм, если эти соединения поглощают эти или близкие к ним длины волн (гашение флуоресценции). Флуоресцентные вещества, которыми пропитаны

продажные пластинки, такие, как силикат цинка, обычно нерастворимы в растворителях, используемых для элюирования соединений, и не загрязняют в значительной степени разделяемые вещества.

Вероятно, наилучшей методикой химического детектирования в ПТСХ является использование паров иода в закрытой камере. Эта процедура позволяет сделать видимыми соединения многих классов в форме светло- или темно-коричневых зон на светлом рыжевато-коричневом фоне. Обычно пары иода можно испарить без какого-либо изменения интересующих компонентов. До того как иод испарится и вещества станут невидимыми, следует обвести зоны карандашом, иголкой или скальпелем. Используя этот метод, следует помнить, что может произойти изменение некоторых соединений. Например, Нихаман и сотр. [26] показали, что наблюдается уменьшение ненасыщенных липидов при использовании иода в качестве детектирующего реагента, что, вероятно, обусловлено иодированием двойных связей. Барретт [27] сделал отличный обзор по использованию иода наряду с другими обратимыми или неструктурирующими реагентами для детектирования.

Испытание с помощью флуоресцеинбромида позволяет детектировать ненасыщенные и другие соединения, которые легко реагируют с бромом [28]. В этой методике свободную от растворителя пластинку опрыскивают раствором 0,05 %-ного флуоресцеина в воде. Пластинку затем выдерживают в парах брома, флуоресцеин превращается в эозин, за исключением тех мест, где расположены соединения, которые поглощают бром, не изменяя таким образом исходной желтой окраски флуоресцеина.

В другой методике в качестве реагента для опрыскивания применяют воду [29, 30]. Силикагель опрыскивают водой до тех пор, пока слой не станет полупрозрачным; водонерастворимые соединения проявляются как белые опаловые пятна на темном фоне. Зоны можно сделать более острыми, оставляя насыщенную пластинку высушиваться до тех пор, когда зоны станут более ясными. Положение радиоактивных соединений может быть определено с помощью ауторадиографии или счетчика Гейгера [31].

В случае незакрепленных слоев на слой наносят узкую полосу смоченной бумаги [32]. Полоска удаляется, и адгезированные частицы сорбента опрыскивают подходящим реагентом. В другом методе узкая полоска пластинки, покрытой силикагелем, прижимается к краю препаративного слоя для получения «отпечатков», которые затем детектируют обычным способом [33].

Для идентификации компонентов, разделенных с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии, были предложены

многочисленные специфические детектирующие реагенты [21—23]. Большинство этих реагентов можно использовать в ПТСХ следующим образом: если для детектирования необходимо использовать деструктивно или необратимо действующий реагент, то следует нанести маленькие пятна образца на внешних полях пластинки. Затем поля опрыскивают требуемым реагентом, предварительно покрывая или экранируя главную часть пластинки, на которой была нанесена полоса, стеклом, картоном или фольгой и прочерчивая между полосами и пятнами вертикальный канал. Тогда интересующие компоненты становятся видны на каждой стороне пластины, указывая, где надо провести горизонтальные линии через центр пластинки, чтобы выделить площади, содержащие интересующие соединения. Альтернативным приемом является нанесение образца поперек большей части слоя и использование затем боковых краев полосы, не закрытых экраном, для опрыскивания. Фирма Analtech продает препаративные пластинки, которые с каждой стороны имеют надрезанные полоски размером 25 мм. Полоса образца наносится на всю пластину, и после проявления боковые части отламываются. После детектирования боковые полоски кладут рядом с центральной частью и отмечают площади для извлечения нужных компонентов. В этом случае исключают попадание опрыскивающего реагента на центральную часть пластинки, а также любые нежелательные эффекты, которые могут произойти при нагревании пластинки, если оно необходимо в процессе обнаружения (визуализации) полос [15]. Описанная процедура применима при работе с любыми пластинками, если имеется хроматографическом процессе, чтобы получить выделенные соединения в неизменном виде.

2.6. Удаление веществ из слоя

Материал, расположенный на очерченной площади пластинки, выделяют путем удаления зоны адсорбента с последующим элюированием веществ с адсорбента с помощью подходящего растворителя и отделения оставшегося адсорбента. На окончательной стадии раствор концентрируют обычно с помощью упаривания.

Обведенные участки слоя, содержащие интересующие компоненты, соскабливают с помощью шпателя, скальпеля, бритвы или специальных, имеющих в продаже скребков. Освобожденный адсорбент переносят на листок фильтровальной бумаги для взвешивания и после этого помещают в пробирку или в пробирку для центрифугирования. Можно добавить несколько капель воды на пластинку, чтобы облегчить вытеснение компонента из

адсорбента. Для уменьшения потери мелких частиц силикагеля в процессе соскабливания и переноса на бумагу пластинку можно опрыскивать мелкораспыленным метанолом. Используемый для элюирования компонент растворитель должен быть адекватно полярным и смешиваемым с компонентом. Не рекомендуется использовать метанол, так как силикагель и некоторые его примеси растворимы в этом растворителе. В качестве растворителей для выделения вещества можно использовать ацетон, хлороформ, этанол или растворитель, использованный для проявления в ТСХ. Не следует применять воду, поскольку она создает трудности при выпаривании на стадии концентрирования. Если для элюирования выбирают подвижную фазу, используемую в ТСХ-разделении, то для определения требуемого объема растворителя можно использовать следующую формулу:

$$(\text{Объем растворителя}) = (1,0 - R_f) \times 10 \times \\ \times (\text{Объем соскобленного материала})$$

Выбранный растворитель добавляют в пробирку с соскобленным силикагелем, и пробирку взбалтывают на мешалке или вручную в течение примерно 5 мин. Содержимому пробирки дают осесть или пробирку помещают в центрифугу. После этого отстоявшийся раствор удаляют с помощью декантации, фильтрования или с помощью пипетки. Для того чтобы полностью избежать попадания мелких частичек силикагеля в раствор, фильтры должны задерживать частицы размером 2 мкм (большинство силикагелей для ТСХ имеют размер частиц 5—20 мкм). Можно добавить дополнительное количество растворителя к адсорбенту и повторить экстракцию, затем растворы соединяют.

В другом методе, используемом для удаления с пластинки соскобленной адсорбционной зоны, используют принцип вакуумного всасывания. Мотье и Поттера [34] использовали вакуумное всасывание для удаления пятен с пластинок с незакрепленным слоем. Они подсоединяли вакуум к одному концу стеклянной трубки диаметром 6—8 мм, на конце которой имелось сужение, куда была помещена пробка из ваты. Адсорбент засасывался в трубку и удерживался пробкой из ваты. Вместо пробки из хлопковой ваты может быть использована пробка из стеклянной ваты [35] или асбестовый фильтр, помещенный на мелкую сетку из нержавеющей стали [36]. Другие исследователи использовали стеклянные фильтры для удерживания адсорбента [37, 38]. Недавно Деккер [39] описал прибор для выделения соединений из слоев с помощью элюирования и фильтрования на фильтре Миллипор. Плат [40] сконструировал коллектор, который с помощью вакуума переводит выделенные зоны

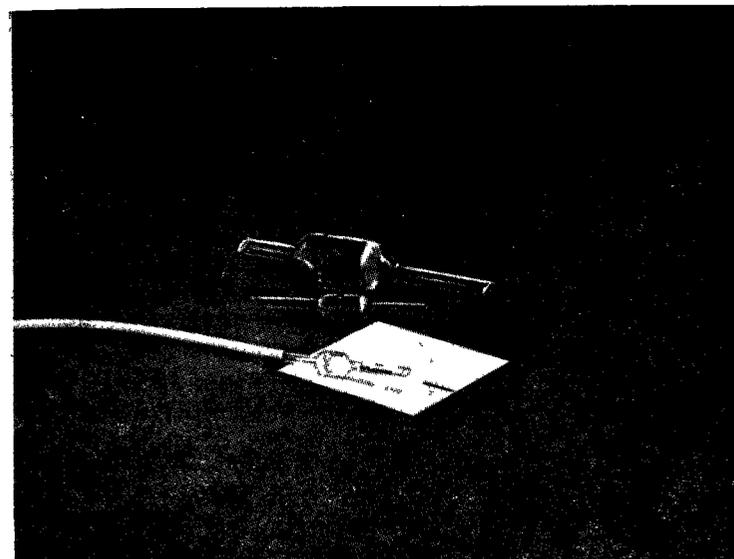


Рис. 23. Трубки для удаления адсорбента со слоя и выделения компонентов образца фирмы Whatman.

с тонких слоев непосредственно в пробирки для жидких сцинтилляторов.

Самодельные комбинации скребок — коллектор можно изготовить из пипетки Пастера 225 мм × 0,7 мм (внешн. диам.). Пипетка отрезается напильником на 60 мм сверху и на 65 мм со стороны наконечника; при этом получают пипетку длиной 100 мм, в которую помещают тампон стеклянной ваты. Конец пипетки подсоединяют к вакуумному насосу или пылесосу, а верхнюю часть используют как скребок для соскабливания слоя в зоне, содержащей интересующий компонент. Таким образом, соскабливание и сбор производят одновременно. Вакуум отсоединяют и пипетку используют как колонку. Колонку помещают в небольшую пробирку ($l=60$ мм, $d_{\text{внутр}}=10$ мм, внутренний объем 8 мл). Пробирку закрывают алюминиевой фольгой, и колонку продавливают через фольгу. Растворитель пропускают через колонку. Если тампон из ваты в колонке достаточно плотный, то большая часть силикагеля остается в колонке.

В продаже имеются различные устройства для удаления адсорбента со слоя. Некоторые из таких устройств, выпускаемых фирмой Whatman, показаны на рис. 2.3. Такие устройства имеют различные размеры и содержат стеклянные фильтры со средней и грубой пористостью.

После получения раствора материала, свободного от адсорбента, растворитель упаривают, чтобы сконцентрировать образец. Эту операцию следует повторять при низкой температуре и предпочтительно в потоке инертного газа, например азота, чтобы предотвратить разложение или другие изменения образца.

2.7. Применение ПТСХ

ПТСХ широко используется в фармацевтической промышленности. Изготовители пластинок для ТСХ информировали нас, что значительная часть препаративных пластинок поступает фармацевтическим компаниям. Использование ПТСХ в промышленности часто составляет секрет фирм, и современная литература по ПТСХ не дает представления о распространении этого метода.

В большинстве применений ПТСХ в конце 70-х и 80-х годов используются доступные, имеющиеся в продаже ПТСХ-пластинки. Ряд изготовителей сообщили, что стоимость продаваемых ПТСХ-пластинок составляет до 15% от общей продажи ТСХ-пластинок. У нас есть также информация, что менее чем 5% (вероятно, 1—2%) специалистов, использующих ПТСХ, готовят свои собственные пластинки. Обычно это происходит в тех случаях, когда невозможно купить необходимые для разделения смеси сорбенты.

Наш обзор литературы по ПТСХ является скорее селективным, чем исчерпывающим. Большинство применений связано с разделением лиофильных соединений на силикагельных слоях. Информация о ПТСХ гидрофильных соединений менее обильна; встречается информация о важных примерах разделения в этой области. Так как ряд изготовителей поставляют препаративные пластинки, покрытые сорбентами, иными, чем силикагель, включая различные типы целлюлозы, то в дальнейшем, вероятно, будут разделять более гидрофильные соединения.

2.7.1. Жиры и липиды

До 20 мг липидов можно нанести в виде полосы на пластинку размером 20×20 см, покрытую силикагелем G с толщиной слоя 0,5 мм [41]. В тех случаях, когда липиды состоят главным образом из триглицеридов, на силикагелевую пластинку со слоем толщиной 0,5 мм можно нанести до 50 мг [41]. В качестве систем растворителей для разделения наиболее часто встречающихся нейтральных (простых) липидов в ПТСХ обычно используют смеси гексан—диэтиловый эфир—муравьиная кислота (80 : 20 : 2 по объему) или бензол—диэтиловый эфир—эти-

лацетат—уксусная кислота (80 : 10 : 10 : 0,2 по объему) [41]. Обычно используемая подвижная фаза петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (80 : 20 : 1 или 70 : 30 : 1 по объему) является эффективной для разделения часто встречающихся нейтральных липидов в тканях животных и растений. Более полные сведения по разделению нейтральных липидов можно найти в гл. 14 книги Фрайда и Шерма [42].

Так как в приведенных выше системах растворителей не получают четкого отделения диглицеридов от свободных стеринов, то важное значение в ПТСХ приобретает следующая методика [43]. До 20 мг нейтральных липидов можно разделить на пластинке размером 20×20 см со слоем силикагеля G толщиной 0,5 мм, используя систему двух растворителей Скипского и сотр. [44]. В этой методике первоначально проводят восходящее проявление с использованием в качестве подвижной фазы смеси изопропиловый эфир—уксусная кислота (96 : 4 по объему). Затем, после высушивания пластинки, второе восходящее проявление осуществляют с помощью смеси петролейный эфир—диэтиловый эфир—уксусная кислота (90 : 90 : 1 по объему). Нейтральные эфиры визуализируют с помощью иода. Порядок элюирования (от низких к высоким R_f) — диглицериды, свободные стеринны и триглицериды.

Триглицеридные фракции тканей животных (в частности, беспозвоночных) могут содержать простые эфиры глицерина. Путем выделения триглицеридной фракции с помощью препаративной ТСХ и ее рехроматографирования смесью гексан—диэтиловый эфир (95 : 5 по объему) можно обнаружить присутствие простых эфиров глицерина [45].

Современная методика ПТСХ триглицеридов в образцах продажных масел и жиров включает разделение липофильной фракции на силикагеле G с использованием в качестве подвижной фазы смеси петролейный эфир—ацетон (100 : 8 по объему) [46].

В литературе имеются методики по ПТСХ стеринов и других неомыляемых липидов [30]. На пластинках со слоем силикагеля H проявление проводят смесью метиленхлорид—ацетон (9 : 1 по объему). В этой системе подвижность всех свободных стеринов примерно одинакова. Для обнаружения пластинку опрыскивают 0,005%-ным водным раствором родамина-B и рассматривают в ультрафиолетовом свете. Для разделения ненасыщенных стеринов (станолов) использовали ПТСХ на пластинках с силикагелем H, пропитанных 25% нитрата серебра. После восходящего проявления смесью хлороформ—бензол (1 : 1 по объему) получали две отдельные полосы. Имеется сообщение [47, 48] о ПТСХ-разделении на пластинках с флорисилом на три класса кишечных (фекальных) стеринов. В ка-

честве проявителя использовали раствор диэтиловый эфир—гептан (55:45 по объему). Более медленно движется полоса, содержащая холестерин, фитостерин и 5- α -стерины с насыщенными кольцами. Средняя полоса содержала копростанол и производные 5- β -фитостерина с насыщенными кольцами. Наиболее быстро двигалась полоса, содержащая копростанол и 3-кетопроизводные фитостеринов.

До 20 мг метиловых эфиров жирных кислот разделяли на силикагелевых пластинках толщиной 0,5 мм с использованием в качестве подвижной фазы смеси диэтиловый эфир—гексан (4:1 по объему) [41]. Полосы детектировали, используя 2,7-дихлорофлуоресцеин, и вещество выделяли, промывая скобленный адсорбент в колонке диэтиловым эфиром или смесью хлороформ—метанол (9:1 по объему). В другом случае до 10 мг эфиров жирных кислот разделяли на пластинке размером 20×20 см, покрытой 0,5 мм слоем силикагеля, содержащего 10% (масс.) нитрата серебра (тонкослойная хроматография на адсорбенте, покрытом нитратом серебра) [41]. По этой методике можно было разделить смесь эфиров на насыщенные моно-, ди-, три-, тетра-, пента- и гексаэфиры, используя в качестве подвижных фаз смеси гексан—диэтиловый эфир (90:10 по объему) или гексан—диэтиловый эфир (40:60 по объему). Метод визуализации и техника элюирования были такими же, как описанные в методике разделения метильных эфиров жирных кислот. Препаративное разделение свободных жирных кислот и их метильных эфиров может быть также осуществлено с использованием обращенно-фазной ПТСХ. Такие разделения часто проводят на силанизированном силикагеле, беря в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил—метанол—вода [41].

Жирные кислоты и неомыляемые липиды, экстрагированные гексаном из табака, после обработки экстракта диазометаном давали метильные эфиры жирных кислот. Метильные эфиры были выделены из углеводов и стероидов с помощью ПТСХ [49].

Ганглиозиды, представляющие интерес в связи с их ролью в липидном обмене человека, были препаративно разделены на моно-, ди- и трисилоганглиозиды на слоях силикагеля с подвижной фазой хлороформ—метанол—2,5N-аммиак (60:40:9 по объему) [50]. Имеется значительная информация по препаративному разделению фосфолипидов (сложных липидов). Христи [41] указывает, что до 10 мг фосфолипидов можно разделить на пластинках 20×20 см, покрытых слоем силикагеля толщиной 0,5 мм, с различными подвижными фазами, содержащими хлороформ, метанол и воду. Эта методика обычно удовлетворительна для разделения более обычных фосфолипидов из тканей

животных. Для препаративного разделения обычных фосфолипидов из тканей животных на самодельных пластинках с 2-мм толщину слоя силикагеля $PF_{254+366}$ Халаап [12] применял различные подвижные фазы, содержащие смеси хлороформ—метанол—уксусная кислота или хлороформ—метанол—аммиак.

Полезные препаративные методики разделения лизофосфатидилхолина, фосфатидилстерина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и различных цереброзидов были разработаны Фрайдом и Шапиро [51]. Было показано, что успешное проявление в этих разделениях осуществляется на готовых пластинках размером 20×20 см со слоем силикагеля-60 при проявлении в насыщенной атмосфере в баке с растворителем хлороформ—метанол—вода (65:25:4 по объему).

2.7.2. Лекарства и фармацевтические препараты

До 2 г смеси стероидов, растворенных в смеси хлороформ—метанол (98:2 по объему), разделили на слое силикагеля HF_{254} с толщиной слоя 1,5 мм, используя в качестве подвижной фазы раствор хлороформ—метанол (90:10 по объему). Для обнаружения компонентов пластинку просматривали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. После пяти восходящих проявлений в этой подвижной фазе фракция гидрокартизона (верхняя полоса) четко отделилась от преднизолона (нижняя полоса) [12].

Смесь азотсодержащих лекарственных препаратов, состоящую из *n*-аминобензойной кислоты, фенацетина и никотинамида, растворенную в смеси хлороформ—метанол (1:1 по объему), разделили на оксиде алюминия RF_{254} в результате двух отдельных проявлений смесью хлороформ—метанол (95:5 по объему). В дальней УФ-области были видны четко разделенные три фракции [12]. Для препаративного выделения кофеина из экстракта кофе, растворенного в смеси хлороформ—метанол (1:1 по объему), выбрали подвижную фазу гептан—хлороформ (30:70 по объему). В качестве адсорбента был взят силикагель RF_{254} . Кофеин был виден при облучении коротковолновым УФ-светом [12].

До 5 г экстракта алкалоидов опшума в смеси хлороформ—метанол (1:1 по объему) разделили на силикагеле RF_{254} , используя три подвижные фазы: гептан—хлороформ (30:70 по объему), чистый хлороформ и хлороформ—метанол (90:10 по объему). В ультрафиолетовом свете наблюдали разделение папаверина, носкапина, тебаина, кодеина и морфина [12].

5 α -Насыщенные и Δ^5 -ненасыщенные стероиды алкалоидов и сапогенины делили на слоях силикагеля G и оксида алюми-

ния G, пропитанных азотнокислым серебром, используя в качестве проявителя смесь хлороформ—метанол (90 : 10 или 95 : 5 по объему) или хлороформ—этилацетат—уксусная кислота (97 : 2,5 : 0,5 по объему). Для обнаружения стероидов пластинки опрыскивали 10%-ным водным раствором КВг, сушили и затем обрабатывали раствором 0,2 г иода и 0,4 г KI в 100 мл воды [52].

ПТСХ использовали для разделения различных наркотиков и барбитуратов из тканей человека после вскрытия. Использовали пластинки с силикагелем, на которых можно было разделять от 50 до 100 мг образца. В качестве подвижной фазы брали различные составы смеси хлороформа и ацетона [53].

Де Зиов [54] описал ТСХ с программированием паровой фазы для препаративного выделения сульфамида.

2.7.3. Красители и пигменты

Кирхнер [8] использовал ПТСХ для разделения смеси 6 красителей на толстых самодельных слоях силикагеля с 20% гипса, добавленного в качестве связующего. Для того чтобы разделить желтый ОВ, судан-1, судан-3, судан-2, метиловый красный и кристаллический фиолетовый (от высоких к низким R_f), проводили многократные восходящие проявления различными комбинациями смесей бензол—хлороформ и бензола. Краситель судан-2 был также очищен на силикагеле с 20%-ной добавкой гипса в результате двух восходящих проявлений смесью бензол—хлороформ (20 : 1 по объему). ПТСХ-Метод с восходящим непрерывным потоком проявителя в камере типа «сэндвич» использовали для разделения смеси красителей масло желтое, судан красный и индофенон [55].

Фракции хлорофилла из листьев растений, экстрагированные с помощью хлороформа, наносили в виде полос на слой силикагеля PF_{254} толщиной 2 мм [12]. Зоны разделили при многократном проявлении в восходящем направлении; подвижная фаза: смесь петролейный эфир—хлороформ (1 : 1 по объему). После нескольких проявлений отделенные хлорофилловые и нехлорофилловые полосы были видны в дневном свете и в ультрафиолете. Вещества были извлечены из зон обычной процедурой элюирования.

Досс [56] сообщил о ПТСХ метиловых эфиров порфирина. На силикагелевых и покрытых оксидом алюминия пластинках с использованием в качестве элюента смеси бензол—этилацетат—метанол отделили дикарбоксильные эфиры порфирина от прото-, дейтеро- и гематопорфирина IX.

2.7.4. Разные соединения

ПТСХ пуринов была проведена на готовых пластинках со слоем целлюлозы [57]. Голанкиевич и Антковяк [58] применили ПТСХ для разделения синтетических олигонуклеотидов на DEAE-целлюлозе. Эта методика оказалась более эффективной, чем клоначная хроматография, так как она позволяла лучше разделить необходимые продукты и исключить побочные продукты при разделении ди- и тринуклеозидфосфатов. Для очистки деоксирибоолигонуклеотидов использовали ПТСХ на обращенно-фазных пластинках со слоем силанизированного силикагеля [59].

Флавоноиды из листьев зеленого гороха были разделены ПТСХ. Эти разделения проводили на силикагеле G, пропитанном ацетат-, борат-, молибдат- или, предпочтительно, вольфрамат-ионами [60]. Ксантоны, тритерпены и сапонины разделяли с помощью препаративной центрифужной радиальной ТСХ с использованием хроматотрона (модель 7924). Агликоны ксантонов выделили примерно за 0,5 ч из сырых экстрактов корня горечавки с помощью центрифужной ТСХ на силикагеле GF_{254} , используя в качестве элюента хлороформ или смесь хлороформ—метанол с последующим детектированием в ультрафиолетовом свете [61].

Для разделения различных форм витамина B_6 в эмбрионах цыпленка была использована ПТСХ [62]. Обзор применений ПТСХ для разделения углеводов представлен Вингом и БеМиллером [63]. Вангом [64] составлен обзор применений полиамидных слоев в ПТСХ.

2.8. Перенесение результатов ТСХ на препаративную жидкостную хроматографию

Основные вопросы переноса результатов ТСХ в препаративную ЖХ были кратко рассмотрены в разд. 1.5.2. В работе [65] обсуждается вопрос переноса результатов аналитической ТСХ на силикагеле на препаративные ЖХ-разделения на силикагеле с целью выбора подходящей подвижной фазы и нагрузки в представляющих интерес колоночных разделениях. В этом разделе описываются методы такого перехода [65].

1. R_f -значения обозначают в ТСХ миграцию вещества

$$R_f = \frac{\text{Расстояние, пройденное пятном}}{\text{Расстояние, пройденное фронтом растворителя}}$$

Значение R_f увеличивается при увеличении полярности подвижной фазы и уменьшается при ее уменьшении.

2. Оптимальная область удерживания для препаративных колоночных разделений: 3—8 колоночных объемов.

3. Значение R_f и колоночный объем связаны соотношением
Колоночный объем = $1/R_f$

Поэтому диапазону колоночных объемов 3—8 соответствует диапазон $R_f \approx 0,3—0,15$, который является оптимальным для малых нагрузок (рис. 2.4). Это соотношение не точно из-за различия методик колоночной ЖХ и ТСХ и из-за колебаний в свойствах силикагелей для ТСХ и ЖХ. В большинстве случаев колоночные объемы будут равны или меньше тех значений, которые рассчитаны из вышеприведенного уравнения.

4. Объем элюирования также зависит от нагрузки и растворителя, используемого для растворения образца.

5. Величина образца, которая может быть загружена в препаративную колонку, является функцией разделения, достигнутого с помощью ТСХ. Подвижная фаза, обеспечивающая более полное разделение, позволяет вводить большую величину образца в колонку, которая будет проявлена этим растворителем. Например, для $\Delta R_f = 0,15$ можно загрузить 20 г образца, тогда как при $\Delta R_f = 0,1$ можно разделить только 5—10 г.

6. Для больших нагрузок и более трудных разделений ($\Delta R_f < 0,07$) значения R_f должны быть уменьшены до 0,1—0,15.

7. Предпочтительным растворителем для препаративной ЖХ является этилацетат, поскольку он обеспечивает хорошую растворимость для многих образцов, поддерживает длительную эксплуатацию колонки, способствует быстрому уравниванию ее и легко отгоняется от собранных фракций. Количество этилацетата в подвижной фазе для ТСХ подбирается таким образом, чтобы получить полярность, которая позволяет элюировать растворенные вещества в пределах 0,15—0,35 R_f . Наблюдается хорошая корреляция между ТСХ и препаративной ЖХ, если подвижная фаза содержит растворители равной или меньшей полярности, чем этилацетат.

8. В случае более полярных растворителей сродство между силикагелем и растворителем становится большим и корреляция между ТСХ и препаративной ЖХ менее надежна. Для того чтобы была корреляция, смесь растворителей для уравнивания препаративной колонки должна содержать только 10—20% от количества полярного компонента, используемого первоначально в ТСХ-разделениях. Для обеспечения воспроизводимости корреляции в системах растворителей, содержащих спирт, требуется тщательное предварительное кондиционирование разделительной колонки и растворителя.

9. Если в ТСХ пятна имеют хвосты, то их причиной может быть перегрузка или растворенные вещества слишком поляр-

ные, кислые или щелочные. На разделение кислых и щелочных растворов влияет pH. Этот эффект можно обнаружить, если поместить небольшой стакан с аммиаком внутрь камеры в процессе проявления. Если значительно изменится значение R_f или исчезнут хвосты в результате наличия паров NH_3 , то растворенные вещества имеют основной характер и в смесь растворителей для препаративного разделения следует добавить основание для того, чтобы предотвратить адсорбцию этих соединений на силикагеле. Если отсутствуют значительные изменения в R_f , то соединения не являются основными и необходимо использовать нейтральные или кислые растворители для препаративной ЖХ.

10. Для разделения сложных смесей на препаративной ЖХ-колонке может потребоваться ступенчатый градиент. На это будет указывать наличие в тонкослойной хроматограмме некоторых интересных компонентов, R_f которых не может быть поддержан в оптимальном диапазоне $R_f = 0,15—0,35$, в то время как другие компоненты находятся в этом препаративном диапазоне. В этом случае подвижная фаза, которой элюируют менее полярные соединения между R_f 0,15 и 0,35, является начальной подвижной фазой для колонки. Более полярные компоненты будут оставаться вблизи стартовой линии на тонкослойной хроматограмме при использовании этой подвижной фазы. Вторым растворителем для колоночной ЖХ является подвижная фаза, которая в тонком слое элюирует полярные компоненты в диапазоне R_f 0,15—0,35. При большей сложности образца могут потребоваться дополнительные ступени, растворители для которых могут быть определены аналогичным образом.

Разработка подвижных фаз для ТСХ, имеющих конкретную элюирующую силу и разрешающую способность, обсуждена

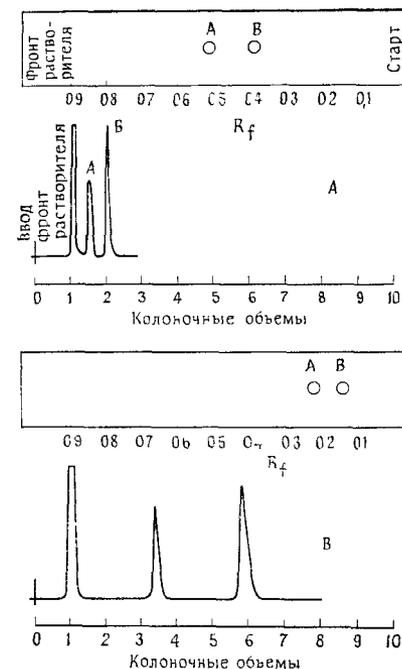


Рис. 2.4. Соотношение между значениями R_f в ТСХ и элюированием в препаративной ЖХ, когда подвижная фаза находится (а) и не находится (б) в диапазоне, оптимальном для препаративной хроматографии.

Фрайдом и Шерма [66]. Подход включает смешивание растворителей с целью получения требуемого значения R_f для интересующих компонентов и последующее замещение их другими растворителями в подходящих количествах, чтобы элюирующая сила оставалась той же, но изменялись взаимодействия в хроматографической системе и увеличивалось разрешение. Работа [65] содержит детальную информацию и много иллюстративных примеров, которые, используя подходы, приведенные в [66], позволяют подбирать для препаративной ЖХ растворители, разработанные на основе ТСХ. Аналогичные рассуждения применимы для препаративной ЖХ на химически связанных обращенных фазах, если помнить, что между полярностью, силой растворителя и порядком миграции имеется обратная зависимость.

Имеются другие исследования по зависимости ТСХ — препаративная колоночная ЖХ, однако ни в одном из них вопрос не рассмотрен так же детально, как в описанных выше. Например, Соживинский и Вавржинович [67] вводили большой объем образца с края тонкого слоя и затем элюировали непрерывно, используя горизонтальную камеру типа «сэндвич» со стеклянным распределителем. В этом случае условия были аналогичны колоночной хроматографии с той же самой системой сорбент-элюент. Эти авторы описали также модифицированную методику проведения двумерных препаративных разделений в ТСХ.

Литература

- Ritter F J, Meyer G M, Nature, 193, 941 (1962)
- Müller J M, Kirchner J G, Anal Chem, 23, 428 (1951)
- Müller J M, Kirchner J G, Anal Chem, 24, 1480 (1952)
- Hahn D, Fuchs H, Helv Chim Acta, 45, 261 (1962)
- Brendel K, Steele R. S., Davidson E A, J Chromatogr, 30, 232 (1967)
- Jordan D M, J Chromatogr, 57, 427 (1971), 63, 442 (1971)
- Visser R, Anal Chim Acta, 38, 157 (1967)
- Kirchner J. G., J Chromatogr, 63, 45 (1971)
- Honegger C G, Helv Chim Acta 45, 1409 (1962)
- Korzun B P, Dorjman L, Brody S M, Anal Chem, 35, 950 (1963)
- Mangold H K, Schmidt H H O, Stahl E, Thin Layer Chromatography, in D. Glück (Ed), Methods of Biochemical Analysis, Vol 12, Interscience p 393, 1964
- Halpaap H, Preparative Thin Layer Chromatography, in I Smith (Ed), Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol 1, 3rd edition, Chapter 34, Interscience p 834, 1969
- Mistryukov E A, J Chromatogr, 9, 311 (1962)
- Davidek J, Blattna J, J Chromatogr, 7, 204 (1962)
- Felton H R, Preparative Thin Layer Chromatography, Analtech Technical Report No 7903, P O Box 7558 Newark, DE 19711, 1978
- Felton H R, Preparative TLC, in J C Thouchstone (Ed), Advances in Thin Layer Chromatography—Clinical and Environmental Applications, Chapter 2, Wiley Interscience, 1982

- Halpaap H, Chem -Ing -Tech, 35, 488 (1963)
- Alhadeff E S, J Chem Educ, 46, 249 (1969)
- Walsh J M, J Chem Educ, 48, 415 (1971)
- Price H C, J Chem Educ, 51, 267 (1974)
- Zweig G, Sherma J Handbook of Chromatography, Vol 1, CRC Press, Boca Raton, FL, p 784, 1972
- Kirchner J G, Thin Layer Chromatography, 2nd edition Wiley-Interscience, New York, p 1137
- Stahl E, Thin Layer Chromatography, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, p 1041
- Quantum Industries Technical Bulletin No 625, Preparative Plate Recovery Techniques, 3 pp., 1977 (Quantum is now part of Whatman, Inc)
- Horobin R W, J Chromatogr, 38, 508 (1968)
- Nichaman Z, Sweeley C C, Oldham N M, Olson R E, J Lipid Res, 4, 484 (1963)
- Barrett G C Adv Chromatogr, 11, 146 (1974)
- Kirchner J G, Müller J M, Keller G J, Anal Chem, 23, 420 (1951)
- Gritter R J, Albers R J J Chromatogr, 9, 392 (1962)
- Tate M E, Bishop C T, Can J Chem, 40, 1043 (1962)
- Schulze P. E, Wenzel M, Angew Chem Int Ed Engl, 1, 580 (1962)
- Mistryukov E A, J Chromatogr, 9, 311 (1962)
- Dobiasova M, J Lipid Res, 4, 481 (1963)
- Mottier M, Potterat M, Anal Chim Acta, 13, 46 (1955)
- Beroza M, McGovern T P, Chemist Analyst, 52, 82 (1963)
- Millett M A, Moore W E., Saemen J F, Anal Chem, 36, 491 (1964)
- Goldrick B, Hirsch J, J Lipid Res, 4, 482 (1963)
- Matthews J S, Pereda-V A L, Aguilera-P A, J Chromatogr, 9, 331 (1962)
- Dekker D, J Chromatogr, 168, 508 (1979)
- Christie W W Lipid Analysis, Isolation Separation Identification and Structural Analysis of Lipids Pergamon Press, Oxford p 338, 1973
- Fried B, Sherma J Thin Layer Chromatography—Techniques and Applications Marcel Dekker, Inc, New York, p 308 1982
- Fried B, Boddorf J, J Parasitol, 64, 174 (1978)
- Skipski V P, Smolowe A F, Sullivan R C, Barclay M, Biochim Biophys Acta, 106, 386 (1965)
- Snyder F In A Niederwieser and G Pataki (Eds), Progress in Thin Layer Chromatography and Related Methods Science Pub, Inc, Ann Arbor, p 105, 1971.
- Chobanov D, Taradziska R, Chobanova R, J Am Oil Chem Soc, 53, 48 (1976)
- Barrett J, Cain G P, Fairbairn D, J Parasitol, 56, 1004 (1970)
- Miettinen T. A., Ahrens E H, Grundy S M, J Lipid Res, 6, 411 (1965)
- Ellington J J, Schlotzhauer P. F., Schepartz A I J Am Oil Chem Soc, 55, 572 (1978)
- Ledeer R, J Amer Oil Chem Soc, 43, 57 (1966)
- Fried B, Shapiro I L J Parasitol, 65, 243 (1979)
- Roensch H, Schreiber K J Chromatogr, 30, 149 (1967)
- Goenechea S, Fresenius' Z Anal Chem, 225 30 (1966)
- De Zeeuw R A, Sep Purif Methods, 6, 129 (1977)
- Hara S, Yamazaki S, Ichikawa H Chem Ind (London) 46, 1657 (1969)
- Doss M, Z Klin Chem Klin, Biochem, 9, 197 (1970)
- Doerner K, Manzke H Z Klin Chem Klin, Biochem 9 57 (1971)
- Golanbiewicz K, Anikowiak J, Acta Biochem Pol, 21, 17 (1974)
- Hsiung H M, Brousseau R, Michniewicz J, Narang S A, Nucleic Acids Res, 6, 1371 (1979)

60. Harper D. B., Smith H., J. Chromatogr., **41**, 138 (1969).
61. Hostettmann K., Hostettmann-Kaldas M., Sticher O., J. Chromatogr., **202**, 154 (1980).
62. Smith M. A., Dietrich L. S., Biochem. Biophys. Acta, **230**, 262 (1971).
63. Wing R., BeMiller J. N., Methods Carbohydr. Chem., **6**, 60 (1972).
64. Wang K.-T., Wang I. S. Y., J. Chromatogr., **24**, 458 (1966).
65. Rahn P., Woodman M., Amer. Lab., **13**(2), **96** (1981).
66. Fried B., Sherma J., Thin Layer Chromatography — Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, Second Edition, 1986, Chapter 6.
67. Soczewinski E., Wawrzynowicz T., J. Chromatogr., **218**, 729 (1981).

3

Увеличение эффективности в крупномасштабной хроматографии

Ф. Ванкат

3.1. Введение

Крупномасштабная хроматография не является новым методом. Например, Спеддинг и сотр. [1] сообщали об использовании препаративной ионообменной хроматографии в Манхеттенском проекте. Широн и Ги [2] разделяли в коммерческих целях каратин, ксантофилл и хлорофилл на слоях активного угля, а Эк [3] описал хроматографическое оборудование, выпускаемое для ситовой (гельпроникающей хроматографии). Несмотря на эти ранние применения, крупномасштабная хроматография не стала стандартным методом разделения. Сообщения о создании крупномасштабных установок и сейчас появляются не часто. В настоящее время имеется несколько сообщений о крупномасштабной жидкостной хроматографии. Например, Сэко и сотр. [4] сообщили о промышленных пилотных экспериментах и конструкции крупномасштабной установки для разделения *пара*-, *мета*- и *орто*-ксилолов и этилбензола с использованием не указанного цеолитного адсорбента и десорбента. Одна из предложенных крупномасштабных систем предназначена для производства 70 тыс. т в год *n*-ксилола с загрузкой адсорбента 270 т. Использована элюентная хроматография с рециклом смеси *n*-ксилол-этилбензол. Для выделения *n*-ксилола из десорбента использована ректификационная колонна. Хейккила [5] сообщил о нескольких действующих системах с использованием ионэкслюзионной хроматографии для разделения сахаров из мелассы. Промышленные колонны имеют высоту от 2 до 12 м и диаметр от 0,5 до 4 м. Типичная установка (фирмы Amipco GmbH) перерабатывает 60 тыс. метрических тонн мелассы в 7 колоннах диаметром 3,6 м и высотой 12 м. В качестве элюента используют воду, установка работает рециклом.

В промышленности имеется много других крупномасштабных применений, о которых, однако, не сообщается в литературе. О многих применениях меньшего масштаба упоминается в других главах этой книги. При разработке таких крупномасштабных систем наиболее важными считаются следующие критерии:

- 1) высокоселективная насадка $\alpha > 1,5$ или предпочтительно $\alpha > 2$ (вероятно, специально приготовленная насадка);

2) высокая емкость насадки;
 3) очень узкое распределение по размерам, предпочтительно твердых сферических частиц. В насадках с широким распределением эффективность (ВЭТТ) определяется частицами большего размера, а противодавление — малыми частицами. Так как $\Delta P/L$ обратно пропорционально d_p^2 и часть ВЭТТ, связанная с массообменом, также пропорциональна d_p^2 , важно иметь узкое распределение частиц;

4) метод заполнения должен обеспечивать однородную упаковку;

5) хорошее распределение жидкости по сечению колонны;

6) ограниченное смешение и расширение зоны вне колонки;

7) контроль извлекаемых продуктов должен основываться на времени или, предпочтительно, на измерении концентрации.

В настоящее время имеются разработки, в которых правильно учтены эти строгие требования. Некоторые полезные рекомендации даны в работах Сэко и сотр. [4] и Хейккила [5].

Несмотря на эти успехи, крупномасштабная хроматография неэффективна. В этой главе мы рассмотрим пути улучшения эффективности путем изменения метода работы. Рассматривая эти новые методы, мы предполагаем, что требования, перечисленные выше, выполнены.

3.2. Неэффективность препаративной элюентной хроматографии

По своей природе элюентная хроматография неэффективно использует и сорбент, и растворитель. В аналитических работах эта неэффективность не имеет большого значения, а при крупномасштабных (тоннажных) разделениях она становится важной и делает элюентную хроматографию сравнительно дорогим методом разделения.

Неэффективность элюентной хроматографии можно объяснить, рассматривая концентрационный профиль в колонне. Этот профиль показан схематично на рис. 3.1 для трех различных времен. Приведен случай подачи трех растворенных веществ, которые мы хотим разделить, но подход может быть расширен на другие ситуации. Некоторые из показанных областей могут отсутствовать в конкретном разделении.

В области, обозначенной цифрой 1, разделяемые вещества отсутствуют. Очевидно, что эта область не участвует в полезном разделении. Однако для заполнения этой области требуются адсорбент и растворитель, которые «хранятся» для использования в более позднее время. Хроматографическая колонна — слишком дорогая емкость для хранения. В области 2 все раз-

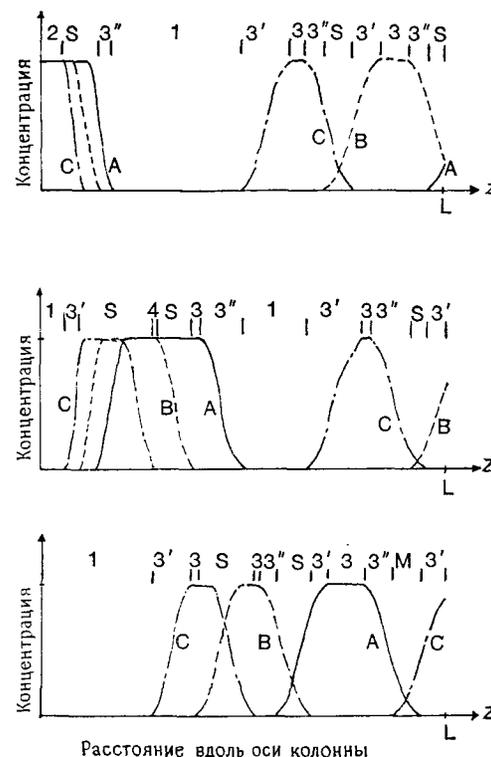


Рис. 3.1. Схематические профили концентраций внутри препаративной хроматографической колонны в процессе элюирования. А——, В-----, С—·—·.

деляемые компоненты находятся при концентрации, с которой они подаются в колонну (концентрация питания), т. е. опять не происходит полезного разделения. В области 4 присутствуют только два разделяемых компонента, но они находятся при их концентрациях питания. Эта область также не производит какой-либо полезной работы разделения.

В областях 3, 3' и 3'' присутствует только один разделяемый компонент плюс сорбент и растворитель. Так как концентрация разделяемого компонента в области 3 равна концентрации питания, то разделение не происходит. В области 3' чистый разделяемый компонент удаляется из сорбента (положительный эффект!). Область 3'' является фронтом волны разделяемого компонента. В рассмотренных областях растворитель или десорбент удаляются из чистого растворенного вещества (также положительный эффект!).



Рис. 3.2. Схематические профили концентраций внутри идеальной препаративной колонны при элюировании. Бесконечное число тарелок (отсутствие размывания зон). Обозначения см на рис. 3.1.

дукта. Проблему обычно решают, позволяя зонам разделения между А и В и между В и С двигаться к выходу колонны. Частично разделенный материал затем подвергают рециклу. Для рецикла зону А—В вводят до момента питания, а зону В—С — после момента питания. Может оказаться полезным далее подразделить рецикл вместо его полного смешения. Однако рецикл уменьшает только область 1 и не влияет на другие неэффективные области 2, 3, 4.

Что можно сделать, чтобы колонна была более эффективной? Любые меры, которые уменьшают дисперсию и ограничения скорости массообмена (увеличение N), в некоторой степени помогут этому. Когда N увеличивается, уменьшаются размеры зоны разделения S , десорбционной зоны $3'$ и адсорбционной зоны $3''$ (меньшее размывание зоны). Тогда следующий импульс питания может быть сделан раньше и область 1 уменьшится в размере. Такой подход включен в наш перечень критериев для крупномасштабной хроматографии. Однако в системах большого размера имеется практический предел уменьшения размера частиц насадки. Перепад давления и стоимость насадки увеличиваются по мере уменьшения диаметра частиц.

Очень большое число ступеней (тарелок) абсолютно необходимо, когда селективность приближается к единице. Если селективность равна 2 или больше, то требуемое число ступеней намного меньше. Тогда можно использовать более дешевую, с большим размером частиц и с меньшим перепадом давления насадку. С увеличением селективности собственные характеристики препаративного элюентного проявления становятся намного менее важными, чем размывание зоны.

Рассмотрим идеальную колонну с бесконечным числом ступеней и, значит, без размывания зоны. Концентрационные профили для идеальной системы, когда наиболее трудным является разделение пары А—В, показаны на рис. 3.2. Поскольку

Желаемая работа разделения растворенных веществ происходит в области S . В области M разделенные вещества А и С повторно смешиваются, что, очевидно, нежелательно. Эту область можно исключить, смещая дальше момент питания, что, однако, будет увеличивать размер области 1.

Размер области 1 будет также возрастать, если необходима высокая чистота про-

размывание зон отсутствует, каждый компонент остается при его концентрации питания. Обратите внимание, что все области S , $3'$ и $3''$ (см. рис. 3.1) стали вертикальными линиями. К сожалению, области, в которых нет полезного разделения, не исчезли. Область 2 не изменилась. Примерно половина областей $3'$ и $3''$ стала областью 3 (чистое разделяемое вещество при концентрации питания). Область разделения S уменьшилась до вертикальной линии, а оставшиеся части стали областями 3 и 4. Можно значительно уменьшить область 1, однако в связи с ростом областей 3 и 4 итог выразится скромным увеличением емкости питания.

Точное время, в течение которого мы можем производить питание, для этого идеального хроматографа легко рассчитать. В условиях отсутствия размывания зоны и идеального разделения каждое вещество будет находиться в колонне в течение времени, необходимого для того, чтобы импульс питания покинул колонну. В случае трех компонентов лучше, что мы можем сделать, — запитывать колонну в течение $1/3$ этого времени. При этом необходимо также, чтобы разделения АВ и ВС были в точности одинаковыми. Для этого должно соблюдаться условие: $K_B = 1/2 (K_A + K_C)$. На рис. 3.2 максимальный период питания будет меньше чем $1/3$. В общем случае N компонентов наибольшая часть времени, в течение которого мы можем вводить питание в колонну и достигать полного разделения, равна $1/N$, но обычно оно бывает меньше. Размывание полосы будет увеличивать как требуемое количество адсорбента, так и растворителя.

Таким образом, можно сделать вывод, что имеются принципиальные ограничения элюентного метода разделения независимо от числа ступеней в колонне. Дополнительное улучшение эффективности разделения требует перехода к совершенно иному методу проведения процесса, который далек от классической элюентной хроматографии.

3.3. Противоточные системы

Если необходимо бинарное разделение, то можно использовать противоточную систему для исключения областей, в которых не происходит разделения (рис. 3.3). Теперь насадка и жидкость двигаются навстречу друг другу. В зонах I и II мы хотим разделить вещества А и В. В зоне III разделяемое вещество В десорбируется с сорбента, и сорбент может быть возвращен в цикл. Зона IV не является обязательной; в ней растворитель удаляют из разделяемого компонента А, и продукт А становится более концентрированным, что уменьшает нагрузку последующих ступеней разделения, в которых растворенные вещества выделяют из растворителя. Предполагается, что усло-

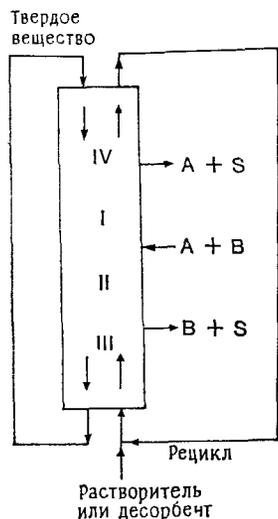


Рис. 3.3. Противоточная система.

вия, приведенные выше в перечне наших 7 критериев, выполнены, и мы имеем возможность без искажений перемещать насадку в виде пробки. Схема ожидаемого разделения показана на рис. 3.4. Так как противоточный процесс осуществляется в стационарном режиме, то эти результаты являются постоянными для всех времен после начального пуска. Это можно представить себе следующим образом. Предположим, мы проводим желаемое разделение в элюентном хроматографе (рис. 3.1) и «замораживаем» его во времени и пространстве путем движения насадки вниз в виде пробки. Если мы это делаем надлежащим образом, то будут отсутствовать «мертвые» области (1, 2, 3 или 4) и область обратного смещения M . Результатом явится более короткая колонка, использующая меньшее количество адсорбента и растворителя. Таким образом, продукты будут менее разбавленными и поэтому последующие установки для разделения продукта и элюента (разделители) — меньшими по размеру. Это позволит сэкономить капитальные и эксплуатационные затраты.

Противоточный процесс можно проанализировать с помощью простых аргументов, получаемых из рассмотрения механизма разделения [6]. Возвращаясь к рис. 3.3 и 3.4, видим, что нам необходимо, чтобы вещество A двигалось в зонах I и II вверх, тогда как вещество B — вниз. При таком условии эти вещества будут разделяться. Для того чтобы рециркулировать насадку,

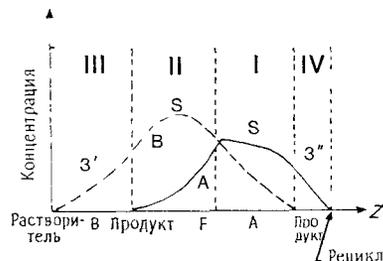


Рис. 3.4. Схематические профили концентраций внутри противоточного разделителя.

необходимо, чтобы происходила десорбция B в зоне III и чтобы вещество B двигалось вверх в этой зоне. Для рецикла растворителя вещество A должно сорбироваться в зоне I и двигаться в этой зоне вниз. Эти условия могут быть записаны в виде соотношений

$$\mu_{A_{cc1}} > \mu_{A_{cc2}} > 0 > \mu_{A_{cc4}} \quad (3.1)$$

$$\mu_{B_{cc3}} > 0 > \mu_{B_{cc1}} > 0 > \mu_{B_{cc2}} \quad (3.2)$$

где $\mu_{A_{cc1}}$ — скорость вещества A в зоне I в противоточной системе (обозначаемой индексом cc) и т. д. Для линейных изотерм эти скорости легко определяют из времен удерживания, полученных в элюентной хроматографии. В элюентной хроматографии скорости разделяемых веществ равны:

$$\mu_j = L/t_{Rj} \quad (3.3)$$

где t_{Rj} — время удерживания и L — длина колонки. Эта скорость должна быть определена при той же самой относительной скорости движения жидкости в промежутках между частицами твердого тела. Соответствующая скорость жидкости может быть определена как

$$V = V_{пов}/\epsilon + V_{нас} \quad (3.4)$$

где V — скорость жидкости в промежутках между частицами твердого тела, ϵ — пористость, $V_{пов}$ — скорость жидкости вне частиц и $V_{нас}$ — скорость насадки. Если известно значение K_j , мы можем также рассчитать скорости разделяемых веществ в элюентной хроматографии из уравнения

$$\mu_j = V / \left(1 + K_j \frac{V_n}{V_{пов}} \right) \quad (3.5)$$

где K_j — коэффициент распределения, V_n — объем неподвижной фазы, V_n — объем подвижной фазы.

Как можно видеть, скорость разделяемого вещества в противоточной системе равна:

$$\mu_{ccj} = \mu_j + V_{нас} \quad (3.6)$$

Условия неравенств (3.1) и (3.2) могут быть достигнуты путем изменения скоростей жидкости в различных зонах, изменения значений K_j — за счет изменения концентраций десорбента или того и другого. Так как вход питания находится между зонами I и II, должно выполняться условие $v_I > v_{II}$. Если селективность близка к 1, то трудно одновременно иметь $\mu_{A_{cc2}} > 0$ и $\mu_{B_{cc1}} < 0$. Таким образом, для противоточной системы необходима сравнительно высокая селективность, если мы хотим иметь

значительную скорость питания. Для данной скорости питания скорости продуктов и растворителя могут быть рассчитаны на основе выполнения условий (3.1) и (3.2).

Заметим, что на рис. 3.4 нет «мертвых» областей. Если бы мы хотели иметь идеальную противоточную систему с отсутствием размывания зон, то области $3'$, $3''$ и S должны были бы стать вертикальными линиями. В этом идеальном случае каждая область насадки могла бы быть очень тонкой и не зависеть от скорости питания. Теоретическое максимальное отношение питание/растворитель равно 1 для линейных систем, когда десорбент не изменяет значения K . Несколько меньшее, чем это, значение требуется для того, чтобы удовлетворить неравенствам (3.1) и (3.2). Размывание зон увеличивает необходимое количество адсорбента, но незначительно влияет на количество необходимого растворителя.

К основным преимуществам противоточного процесса относятся следующие: 1) это процесс стационарный, а не периодический, так что не требуется переключения потока продукта; 2) процесс более эффективен и требует меньшего количества адсорбента и растворителя; 3) последующие разделители меньше, и в них перерабатывается меньшее количество материала, так как продукты менее разбавлены.

Имеются также три главных недостатка: 1) противоточный процесс является стационарным бинарным сепаратором. Если необходимо отдельно получить три компонента, то потребуется иметь две колонки. Мы можем получить А как один продукт и смесь В и С как другой продукт в первой колонке, затем следовало бы разделить смесь В и С во второй колонке; 2) устройство достаточно сложное; 3) в практическом смысле до настоящего времени мы не знаем, как передвигать насадку в виде однородной пробки без перемешивания. Таким образом, разработка устройств с приемлемыми ВЭТТ — трудная задача. Исследования по развитию истинно противоточной хроматографии рассмотрено Баркером [7], Ренделлом [8], Сассманом и Разоре [9], Сассманом [10] и Баркером и сотр. [11, 12]. Одним из перспективных методов является использование магнитно-стабилизированных оживленных слоев [13], разработанных Экзоном. Системы с движущимися слоями широко используют для ионного обмена [14, 15], однако там требуется намного меньше ступеней.

Проблема передвижения насадки была преодолена путем использования заполненных слоев и имитацией противотока. Системы с псевдодвижущимися слоями (ПДС) используют в промышленности, они рассмотрены ниже.

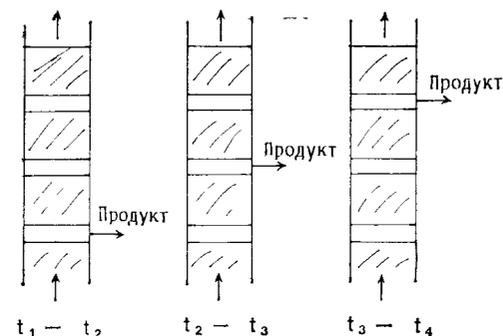


Рис. 3.5. Метод псевдодвижущегося противотока.

3.4. Системы с псевдодвижущимися слоями

Идея имитации противоточного движения с помощью изменения положения точки ввода питания и отбора продукта является старой. Она использовалась уже по крайней мере в системе Шенка для выщелачивания кальцинированной соды в Англии в 1840-х гг. [16]. Эти имитированные противоточные системы до сих пор используются для выщелачивания [16], в адсорбционных и ионообменных системах для удаления одного или большего числа растворенных веществ [17, 18] и для хроматографических разделений.

Метод псевдодвижущегося слоя (ПДС) иллюстрируется на рис. 3.5. Несколько заполненных слоев соединяют в систему секций трубопроводом так, чтобы можно было добавлять или извлекать материал между секциями. Это может быть сделано как внутри одной колонки, так и в виде серии колонок. Каждые несколько минут положение всех продуктов и точки питания перемещается на одну секцию (в направлении потока жидкости). На рис. 3.5 это происходит во времена t_1 , t_2 , t_3 , t_4 и т. д. Если посмотреть на точку вывода продукта, то видно, что насадка движется вниз в эти времена, тогда как жидкость постоянно движется вверх. Таким образом, видно, что происходит периодический противоток насадки и жидкости. Так как насадка реально является неподвижной, то такой противоток является кажущимся или осуществляется процесс псевдодвижущегося слоя (ПДС). Для того чтобы осуществить систему, показанную на рис. 3.3, линию рецикла связывают с вершиной и основанием колонки. Когда данный выход из секции достигает вершины колонки, он переключается на основание. Насколько эта модель близка к реальной действительной противоточной системе? Липис и Риппен [18] исследовали этот вопрос теоретически и нашли, что при использовании четырех заполненных секций

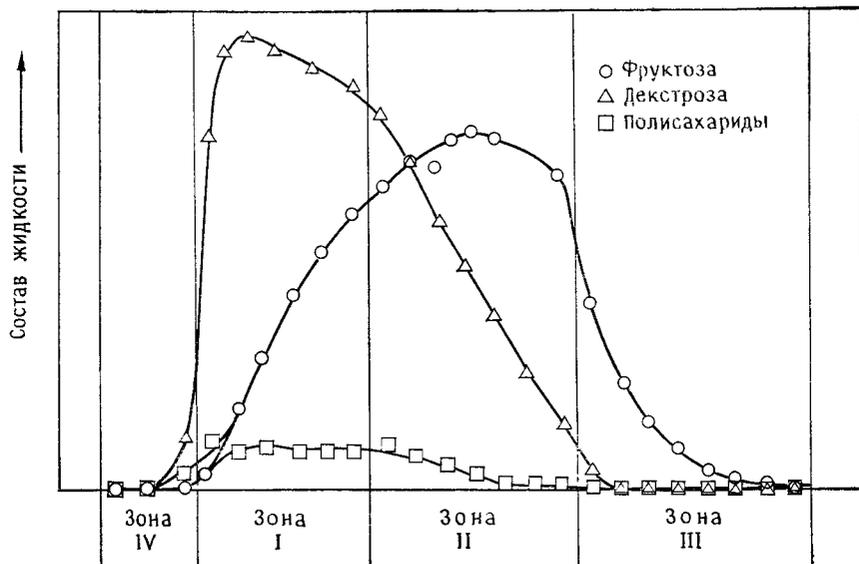


Рис. 3.6. Профили концентраций в колонке пилотной установки сарекс-процесса (рис. 8 из [28]).

в одной зоне эффективность ПДС составляет примерно 98% от эффективности действительного противоточного процесса для химических систем, которые они изучали.

Современное применение техники псевдодвижущегося слоя в жидкостной хроматографии с использованием системы, показанной на рис. 3.3 и 3.5, было первоначально развито Браутоном и его сотрудниками на фирме Universal Oil Products [19—31]. Этот процесс с псевдодвижущимся слоем (сорбекс-процесс) был впервые реализован в промышленности для отделения линейных парафинов от парафинов с разветвленной цепью и циклических углеводородов (молекс-процесс) с использованием молекулярного сита 5А [19—21]. Другими промышленными процессами являются очистка *n*-ксилола (парекс-процесс) [23], выделение олефинов (олекс-процесс) [22] и разделение фруктозы и глюкозы (сарекс-процесс) [26—28]. Были продемонстрированы разделения в пилотном масштабе для выделения *n*- и *m*-крезола из смеси изомеров, *n*-цимола или *m*-цимола из смеси изомеров, этилбензола из смеси ароматических соединений C_8 , бутена-1 из олефино-парафиновых смесей C_4 , *n*-диизопропилбензола из смеси изомеров, β -пинена из смеси пиненов, *n*-диэтилбензола из смеси изомеров [25, 29, 30]. Обзор всех этих исследований имеется в работе Рассета и сотр. [31]. В системах

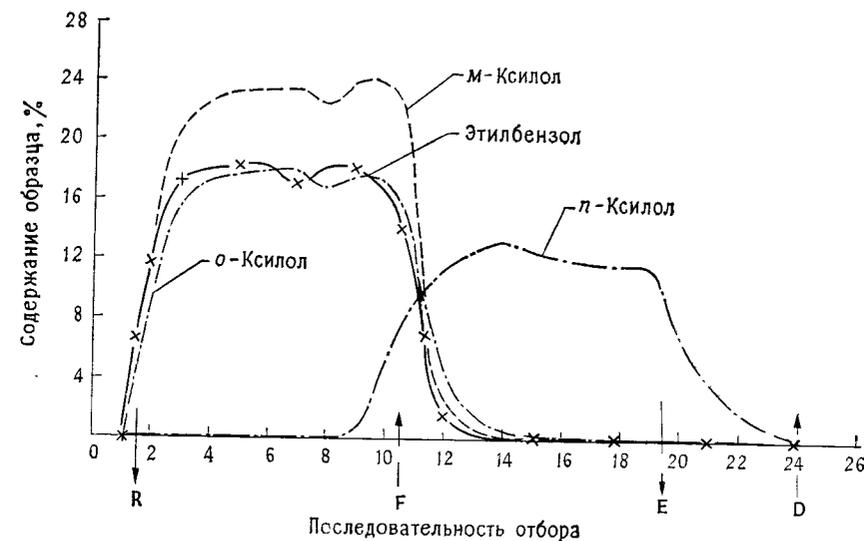


Рис. 3.7. Выделение *n*-ксилола из смеси ароматического сырья C_8 на пилотной установке парекс-процесса (рис. 6 из [25]).

фирмы Universal Oil Products используют специально разработанный поворотный кран для управления потоком жидкости в колонку и из нее. Могут быть использованы другие разнообразные коллекторные системы.

Достигнутые типы разделений показаны на рис. 3.6 и 3.7. На рис. 3.6 показаны результаты разделения в пилотном масштабе для промышленной системы сарекс [28]. На вход подавался раствор, содержащий 41,3 масс.% (в пересчете на сухой остаток) фруктозы; был получен продукт, содержащий 91 масс.% фруктозы с выходом 91,5% (напомним, что разделение происходило в стационарном режиме). На рис. 3.6 более сильно адсорбированная фруктоза движется вниз по колонке в зонах I и II и вверх по колонке в зоне III. В качестве адсорбента был использован цеолит, в качестве растворителя — деионизованная вода.

На рис. 3.7 показано выделение на заводской пилотной установке *n*-ксилола из смеси ароматических углеводородов C_8 . *n*-Ксилол адсорбировался наиболее сильно [25]. Наименьший коэффициент селективности между *n*-ксилолом и этилбензолом составлял 1,6 для данных, приведенных на рис. 3.7. Промышленные системы более селективны. Для имитации противоточного процесса была использована система из 24 небольших хроматографических колонок. Де Россет и сотр. [25] основывали выбор условий разделения в ПДС-системе на результатах

элюентной хроматографии. В качестве десорбента были использованы продажный толуол и *n*-диэтилтензол. Типичная ПДС-система для очистки *n*-ксилолов рассчитана на производство 10 тыс. метрических тонн в год *n*-ксилола с чистотой более чем 99,3% и выходом от 96,7 до 99,7% (в зависимости от используемого десорбента). Это действительно крупномасштабные хроматографические системы!

Браунтон и сотр. [23] использовали ступенчатую модель для анализа системы парекс. Они предсказали, что в ПДС-системах требуется только 1/25 количества адсорбента, необходимого в элюентной хроматографической системе, и 1/2 требуемого десорбента. Последнее обстоятельство весьма существенно, так как оно означает сильное уменьшение размеров ректификационных колонн, применяемых затем в схеме этого процесса. Точные детали элюентной хроматографической системы, с которой они сравнивали результаты по ПДС-системе, не были приведены. Очевидно, в хроматографической системе не был использован метод циркуляции. Оптимизированный элюентный хроматограф даст характеристики, которые будут намного ближе к ПДС-системе. Это неудивительно, так как ПДС можно рассматривать как усложненное применение техники переключения колонок и рециклов. К сожалению, нельзя непосредственно сравнить ПДС-процесс и систему элюентной хроматографии Сэко и сотр. [4], так как были использованы различные адсорбенты.

Де Россет и сотр. [25, 29, 31] сообщили о выделении этилбензола из смеси ксилолов на заводской пилотной установке. Это интересное исследование — первая публикация по процессам, в которых главным продуктом являются менее адсорбированные материалы. Авторы считают, что по сравнению с элюентной хроматографией потребуется вчетверо меньше адсорбента и вчетверо меньше десорбента.

Для анализа ПДС-процессов, представленных на рис. 3.3 и 3.5, можно опираться на физические представления об удерживании [6]. Поскольку в ПДС-процессах насадка в действительности не движется, наиболее важной переменной становится средняя скорость перемещения точки ввода или вывода:

$$\mu_{\text{вв}} = L_{\text{вв}}/t_{\text{вв}} \quad (3.7)$$

где $L_{\text{вв}}$ — высота между точкой ввода и вывода, $t_{\text{вв}}$ — время между переключением ввода и вывода.

Для того чтобы вещество А концентрировалось между зонами I и IV (см. рис. 3.3), необходимо, чтобы выполнялось условие

$$\mu_{\text{VI}} > \mu_{\text{A2}} > \mu_{\text{вв}} > \mu_{\text{A4}} \quad (3.8)$$

где скорости растворенных веществ могут быть определены из времен удерживания, найденных с помощью элюентной хроматографии, как в уравнениях (3.3) или (3.5). Для более медленно движущихся растворенных веществ необходимо, чтобы растворенное вещество эффективно двигалось вниз в зоне I и II и попадало в зону III. Такими условиями являются:

$$\mu_{\text{вз}} > \mu_{\text{вв}} > \mu_{\text{BI}} > \mu_{\text{B2}} \quad (3.9)$$

Чем выше селективность системы, тем легче будет подобрать условия, при которых одновременно выполняются условия (3.8) и (3.9). (По существу, это те же условия, которые приведены в выражениях (3.1) и (3.2).) Более детальная теория, включающая массообмен, представлена в работе Рутвина [32].

Были исследованы многие другие применения системы ПДС. Ишикава и сотр. [33], Хирода и Шиода [34] разработали ПДС-систему для разделения фруктозы и глюкозы. В этой системе используется только одна колонка для каждой зоны, что напоминает систему, показанную на рис. 3.3. Так как каждая зона не является приближением к противоточному движению, то эти системы разработаны только для частичного разделения сахаров. Аналогичные методы используют в промышленности. В серии статей Баркера и сотр. [35, 36] изучены применения ПДС-методов для жидкостной хроматографии.

ПДС-процесс был применен в ситовой хроматографии Баркером и сотр. [11, 12]. Они использовали 5 стеклянных колонок внутренним диаметром 5,1 см и длиной 70 см, заполненных сферосилом ХОВО75 с частицами 200—400 мкм для получения узких по молекулярной массе фракций декстрана-40. Концентрационный профиль декстрана по всей длине аппарата показан на рис. 3.8 [12]. Отметим, что в центральной секции концентрация очень высокая: концентрация питания 0,21 г/см³ при скорости питания 7,9 см³/мин. Скорость потока элюента была в 5,66 раза больше скорости питания. Средняя молекулярная масса продукта 1 составляла 95 тыс. и продукта 2 — 27 тыс. Разделение было неполным и наблюдалось значительное перекрывание молекулярных масс продуктов.

Прежде чем перейти к рассмотрению других альтернатив, будет полезно суммировать преимущества и недостатки ПДС-систем в сравнении с элюентной хроматографией. В идеальном случае ПДС-системы не имеют областей, где не происходит разделение. Таким образом, в ПДС-системах требуется меньше адсорбента, меньше десорбента, и они работают при более высоких концентрациях растворенных веществ. В процессе получают продукт в стационарных условиях. ПДС-процесс используют в промышленности в системах очень большого масштаба. Недостатком является то, что ПДС-системы значительно слож-

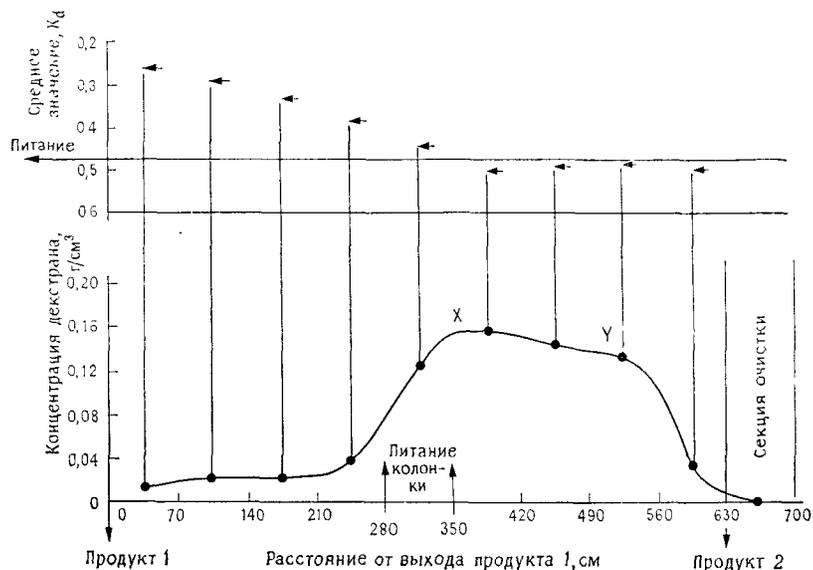


Рис. 3.8. Концентрация декстрана и средние значения K_d для ПДС в ситовой хроматографии (рис. 7 из [12]).

нее, чем элюентная хроматография. Так как наша система должна удовлетворять приведенному выше списку семи разработанных критериев, то, кроме того, еще необходимо разработать системы, предотвращающие избыточное смешение между частями колонки или между колонками. Для простой работы системы требуется довольно высокая селективность. Метод является по существу бинарным сепаратором. Если нам необходимо иметь чистый *n*-ксилол и чистый этилбензол из сырья смешанных углеводов C_8 (см. рис. 3.7), то потребуются две полные системы ПДС.

Когда следует использовать элюентную хроматографию, а когда ПДС-систему? Конечно, ответ будет зависеть от экономических соображений, но могут быть предложены некоторые рекомендации. В относительно небольших системах, по-видимому, следует отдать предпочтение более простым элюентным хроматографам. В крупномасштабных системах, где необходим только один чистый компонент и он адсорбируется сильнее или слабее других компонентов, ПДС-системы будут, очевидно, дешевле. Вероятно, что для систем промежуточного масштаба и для выделения компонента, среднего по адсорбционной способности среди других компонентов в системах большого или среднего масштаба, выбор не очевиден.

3.5. Гибридные методы.

Комбинация системы с псевдодвижущимся слоем и элюентной хроматографии

Перечень преимуществ и недостатков показывает, что в большой степени элюентная хроматография и ПДС-хроматография являются дополняющими. То, что не может делать одна система, делает другая. Таким образом, разумно использовать комбинацию этих двух методов. Ванкат и сотр. [37—42] исследовали некоторые варианты этих комбинаций.

В хроматографии с движущейся точкой питания [37—40, 42] используют аппараты, показанные на рис. 3.9. Растворитель непрерывно подается в основание системы. Система работает как элюентный хроматограф, за исключением перемещения точки ввода пробы вверх по колонке в процессе питания системы. После завершения питания используется элюентное проявление. Средняя скорость движения точки питания дается уравнением (3.7). Для бинарной системы эта средняя скорость точки питания должна лежать между скоростями двух растворенных веществ:

$$\mu_A > \mu_{\text{вв}} > \mu_B \quad (3.10)$$

При наличии большего числа компонентов условие (3.10) может быть выполнено для более сложного разделения. Выполнение условия (3.10) будет минимизировать непродуктивную область 2 и уменьшать область 1 на рис. 3.1. Полосы растворенных веществ будут более концентрированными, и продукт будет выходить из колонки быстрее, так как последняя часть питания вводится выше по колонке. Первоначальное теоретическое предсказание было сделано Ванкатом [37] и расширено на двумерную систему [38].

Мак Гейри и Ванкат [40] изучили разделение нафталина, антрацена и пирена в системе, заполненной поливинилпирролидоновой смолой с размером частиц 80—100 меш; в качестве растворителя был использован 2-пропанол. В системе было использовано 4 колонки длиной 5 см, за которыми следовала колонка длиной 30,4 см. Результаты для обычной элюентной хроматографии и для системы с движущейся точкой питания показаны на рис. 3.10. Отметим, что в последнем случае пики более узкие и более концентрированные, с лучшим разрешением между различными компонентами. Кроме того, пирен выходит из колонки раньше, что позволяет раньше вводить следующий пик. На рис. 3.10 прерывистой линией показан общий сигнал УФ-детектора. Относительная концентрация равна C/C_0 , где C_0 — реальная концентрация вещества, введенного в колонку (после смешения с растворителем). Так как вводы растворенных ве-

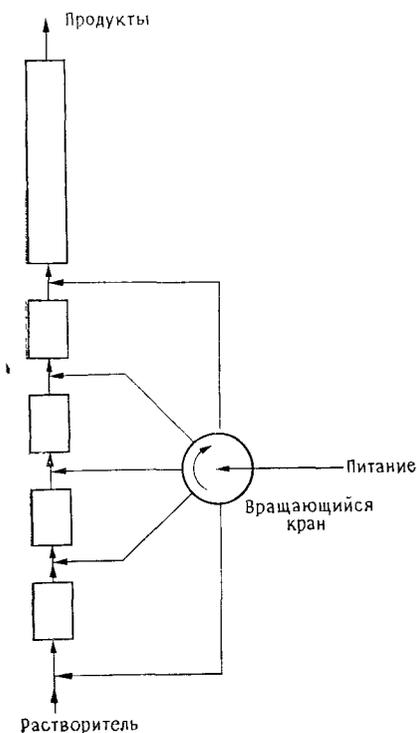


Рис. 3.9. Аппарат для хроматографии с движущейся точкой ввода.

[42] было показано, что по существу такое же улучшение может быть получено при очень быстром вводе всех введенных доз в основание колонки. Например, для системы, показанной на рис. 3.9, все вводы могут быть сделаны в начало колонки за период времени, равный одной ступени подачи. Скорость питания будет в 5 раз больше, чем на рис. 3.9, и питание будет осуществлено за 1/5 времени. Если не принимать во внимание массообмен и дисперсию, то этот простой метод быстрого ввода даст по существу тот же результат, что и оптимизированный метод с движущейся точкой питания. Таким образом, улучшение, видимое в методе с движущейся точкой питания, очевидно, обусловлено уменьшением разбавления. Хотя могут быть трудности, связанные с перепадом давления, метод «короткого импульса» является простым и может быть рекомендован.

Система с движущейся точкой ввода питания уменьшает непродуктивные области 1 и 2 на рис. 3.1. Метод ПДС способен

шеств при различных временах могут перекрываться, то относительная концентрация может быть больше 1,0 (см. рис. 3.10, б). При идентичном разрешении для системы с подвижной точкой ввода наблюдали увеличение выхода с 90 до 300% по сравнению с элюентной хроматографией. Не был использован режим циркуляции, хотя наверняка он может быть использован в обеих системах. Для моделирования этой системы была взята линейная модель размытия. Используя один подгоночный параметр (число Пекле, ВЭТТ или число ступеней), получили хорошее согласие между теорией и экспериментом. Хроматограмма, показанная на рис. 3.10, б, является суммой гауссовых пиков для каждого положения точки питания на рис. 3.9.

Сравнительно недавно с помощью линейных и нелинейных равновесных моделей

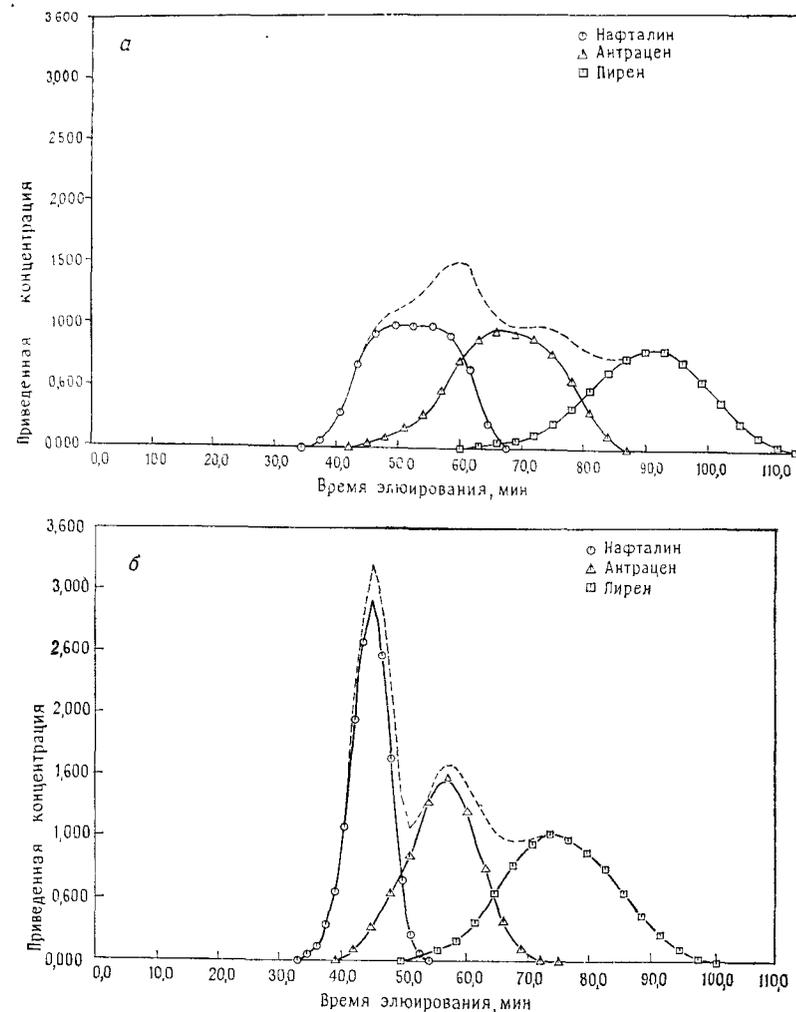


Рис. 3.10. Хроматограммы разделения нафталина, антрацена и пирена для 25-мин пульсаций питания. а — элюентная хроматография (рис. 6 из [40]); б — хроматография с движущейся точкой ввода (рис. 7 из [40]); штриховая линия — показания УФ-детектора.

сделать то же самое плюс удалить непродуктивные области 3 и 4 и уменьшить область 1. В методе ПДС это достигается путем движения как точки питания, так и точки отбора продукта. Поэтому имеет смысл попытаться передвигать точку отбора продукта в элюентной хроматографической системе. Это может рассматриваться как дополнение методов переключения коло-

нок. Теоретические расчеты для единственного случая разделения антрацена, нафталина и пирена предсказывают, что в случае использования подвижной точки отбора продукта при том же разделении выход увеличится на 69,5% по сравнению с обычной элюентной хроматографией [41]. Нелинейные модели [42] показывают аналогичное или большее увеличение выхода плюс меньшее разбавление медленно движущихся компонентов. Метод движущейся точки отбора наиболее полезен при разделении продуктов с очень широким диапазоном сродства и является одним из путей решения общей «проблемы элюирования». Экспериментально метод не был проверен.

Гибридные процессы совсем не являются развитием элюентной хроматографии или ПДС-систем. Однако, так как они не ограничены бинарными системами и являются более эффективными, чем элюентная хроматография, некоторые из них могут стать полезными для крупномасштабной хроматографии. Возможно, областями применения гибридной хроматографии будут разделения средних масштабов, а также разделения средних и крупных масштабов при необходимости выделения компонента, элюируемого в середине хроматограммы.

3.6. Другие методы крупномасштабной хроматографии

Множество других способов проведения процесса было изучено для проведения крупномасштабной хроматографии. В этом разделе мы кратко рассмотрим некоторые из этих подходов. Более исчерпывающие обзоры по этим методам опубликованы в работах [7—11, 43, 44].

В хроматографических системах среднего размера были использованы центрифуги [8, 45—48]. Слой насадки укладывался в центрифугу корзиночного типа. Использовали элюентное проявление в радиальном направлении. Преимуществом этих систем является возможность получения относительно большого выхода в малой системе.

Непрерывная стационарная двумерная хроматография с использованием вращающегося щелевого зазора была первоначально предложена Мартином [49]. После этого многие разрабатывали эту систему, используя либо вращающийся щелевой зазор, либо серию колонок, как в барабане пистолета. Более раннее экспериментальное оборудование рассмотрено Свенссоном и сотр. [50]. Применение для ситовой хроматографии рассмотрено Николасом и Фоксом [51]. Современный непрерывный хроматограф высокого давления был разработан группой исследователей в Окридже [52, 53]. Вопросы соотношения между различными одномерными и двумерными разделениями были

разработаны Ванкатом [54]. В обзорах Ямрака [43], Баркера [7], Ренделла [10], Сассмана и Резора [9] и Сассмана [10] обсуждаются эти и другие двумерные разделения.

Были изучены различные системы с движущимся слоем. Часто движение насадки применяется в ионном обмене [14, 15]; были сделаны попытки использовать его в жидкостной хроматографии [7, 10]. Обычно эти методы оказываются недостаточно успешными для жидкостной хроматографии из-за избыточного смещения и истирания насадки. Альтернативным решением является упаковка насадки в трубы, которые вращаются [7, 12]. Этот подход с механической точки зрения достаточно сложен и, видимо, может рассматриваться как устаревший после появления ПДС. Ямрак [43] рассматривал использование бесконечной ленты, движущейся из одного бака в другой, для того, чтобы создать противоточный поток.

Совершенно другим подходом в крупномасштабной хроматографии является использование термодинамических переменных, таких, как температура, для того, чтобы усилить разделение. Вращающиеся нагреватели были использованы в газохроматографических процессах [55, 56]. Были развиты [43] различные циклические процессы, использующие изменение термодинамических параметров, такие, как параметрическая подача и циклическая зонная адсорбция. В большинстве случаев, хотя целью было изобретение методов многокомпонентного разделения [57, 58], в процессах получали все растворенные вещества вместе.

Все эти альтернативные процессы можно заставить работать. Однако они развиты только для специализированных применений и не стали стандартными методами разделения. По-видимому, элюентная препаративная хроматография, системы с псевдодвижущимся слоем и комбинация этих двух методов являются наиболее вероятными для широкого использования в крупномасштабных процессах.

3.7. Принятые обозначения

- A, B, C — растворенные (разделяемые) вещества
- K_d — коэффициент распределения в ситовой хроматографии
- K_j — отношение концентрации разделяемого вещества в неподвижной фазе к концентрации разделяемого вещества в подвижной фазе
- $L_{вв}$ — высота слоя насадки между входом и выходом
- L — длина колонки
- N — число ступеней
- t — время
- $t_{вв}$ — время между переключением входа и выхода

- t_{R_j} — время удерживания
 μ_A, μ_B — скорости разделяемых веществ, см. уравнения (3.3)
 μ_c, μ_j и (3.5)
 $\mu_{сc_j}$ — скорость разделяемого вещества в противоточной системе, см уравнение (3.6)
 $\mu_{вв}$ — средняя скорость переключения входа/выхода, см. уравнение (3.7)
 V — скорость жидкости внутри твердой насадки
 $V_{пов}$ — скорость жидкости между частицами
 $V_{нас}$ — скорость движения насадки
 $V_{п}$ — объем подвижной фазы
 $V_{н}$ — объем неподвижной фазы
 Z — расстояние вдоль оси колонны
 $\alpha_{ВА}$ — селективность = K_B/K_A
 ϵ — пористость

Литература

- 1 *Speeding F H, Fulmer E I, Butler T A, Gladrow E M, Gobush M, Porter P E, Powell J E, Wright J M*, The Separation of Rare Earths by Ion Exchange III Pilot Plant Scale Separations, *J Am Chem Soc*, **69** 2812 (1947)
- 2 *Shearon W H, Gee O F*, Carotene and Chlorophyll — Commercial Chromatographic Production, *Ind Eng Chem*, **42**, 218 (1949)
- 3 *Ek L*, Process Biochemistry, **3** (9), 25 (1968)
- 4 *Seko M, Takeuchi H, Inada T*, Scale up for Chromatographic Separation of p-xylene and ethylbenzene, *Ind Eng Chem Prod Res Develop*, **21**, 656 (1982)
- 5 *Heikkila H*, Separating Sugars and Amino Acids with Chromatography, *Chemical Engineering*, **50** (Jan 24, 1983)
- 6 *Wankat P C*, Operational Techniques for Adsorption and Ion Exchange Proceedings Corn Refiners Association 1982 Scientific Conference, Lincolnshire, IL, June 16—18, 1982, p 119—167
- 7 *Barker P E*, Continuous Chromatographic Refining in E. S. Perry and C. J. Van Oss (eds), *Progress in Separation and Purification*, vol **4**, Wiley, NY 1971 p 325
- 8 *Rendell M*, The Real Future for Large-Scale Chromatography, *Process Engineering*, (April 1975), p 66
- 9 *Sussman M V, Rathore R N S*, Continuous Modes of Chromatography, *Chromatographia* **8**, 55 (1975)
- 10 *Sussman M V*, Continuous Chromatography, *Chemtech*, **6**, 260 (1976)
- 11 *Barker P E, Ellison F J, Hatt B W*, Continuous Chromatography of Macromolecular Solutes, in *R. R. Epton* (ed), *Chromatography of Synthetic and Biological Polymers*, vol **1**, Ellis Horwood, Chichester Eng, 1978, p 218—239
- 12 *Barker P E, Ellison F J, Hatt B W*, A New Process for the Continuous Fractionation of Dextran, *Ind Eng Chem Process Des Develop*, **17** 302 (1978)
- 13 *Rosensweig R E*, Magnetic Stabilization of the State of Uniform Fluidization, *Ind Eng Chem Fundam*, **18**, 260 (1979)
- 14 *Slater M J*, Recent Industrial Scale Applications of Continuous Resin Ion Exchange Systems, *J Separ Proc Technol*, **2**, (3) 2 (1981)

- 15 *Streat M*, Recent Developments in Continuous Ion Exchange, *J Separ Proc Technol*, **1**, (3) 10 (1980)
- 16 *Treybal R E*, Mass Transfer Operations, 3rd ed, McGraw-Hill, NY, 1980, chapt 13
- 17 *King C J*, Separation Processes, 2nd ed, McGraw-Hill, NY, 1980, p 172—175
- 18 *Liapis A I, Rippin D W T*, The Simulation of Binary Adsorption in Continuous Counter-current Operation and a Comparison With Other Operating Modes, *AIChE Journal*, **25**, 455 (1979)
- 19 *Broughton D B, Carson D B*, The Molex Process, *Petroleum Refiner*, **38**, (4) 130 (1959)
- 20 *Broughton D B, Gerhold C G*, Continuous Sorption Process Employing Fixed Beds of Sorbent and Moving Inlets and Outlets, U S Patent No 2, 985, 589, May 23, 1961
- 21 *Broughton D B*, Molex Case History of a Process, *Chem Eng Prog*, **64**, (8) 60 (1968)
- 22 *Broughton D B, Berg R C*, Olefins by Dehydrogenation-Extraction, *Hydrocarbon Processing*, **48**, (6) 115 (1969)
- 23 *Broughton D B, Nuezil R W, Pharis J M, Breasley C S*, The Parex Process for Recovering Paraxylene, *Chem Eng Prog* **66**(9), 70 (1970)
- 24 *Fickel R G*, Continuous Adsorption — A Chemical Engineering Tool in *G. H. Cummings* (ed), *AIChE Symposium Ser*, **69**(135), 65 (1973)
- 25 *de Rosset A J, Neuzil R W, Korous D J*, Liquid Column Chromatography as a Predictive Tool for Continuous Counter-current Adsorptive Separations, *Ind Eng Chem Proc Des Develop*, **15**, 261 (1976)
- 26 *Bieser H J, de Rosset A. J*, Continuous Counter current Separation of Saccharides with Inorganic Adsorbents, *Die Starke*, **29**, (111) 392 (Jahrg 1977) (In English)
- 27 *Neuzil R W, Priegnitz J W*, Process for Separating a Ketose from a Aldose by Selective Adsorption, U S Patent No 4,024,331, (May 17, 1977)
- 28 *Neuzil R W, Jensen R H*, Development of the Sarex Process for the Separation of Saccharides, paper 22nd, AIChE meeting, Philadelphia, PA, (June 6, 1978)
- 29 *de Rossett A J, Neuzil R W, Tajbl D G, Braband J M*, Separation of Ethylbenzene from Mixed Xylenes by Continuous Adsorptive Processing, *Separat Sci Technology*, **15**, 637 (1980)
- 30 *Neuzil R W, Rosback D H, Jensen R H, Teague J R, de Rosset A J*, An Energy-saving Separation Scheme, *Chemtech*, **10**, 498 (Aug 1980)
- 31 *de Rosset A J, Neuzil R W, Broughton D B*, Industrial Applications of Preparative Chromatography, in *A. E. Rodrigues and D. Tondeur* (eds), *Percolation Processes, Theory and Applications*, Sijthoff and Noordhoff, Alphen aan den Rijn, Netherlands 1981, p 249—281
- 32 *Ruthven D M*, Principles of Adsorption and Adsorption Processes, Wiley-Interscience, NY, 1984, Chapt 12
- 33 *Ishikawa H, Tanabe H, Usui K*, Process of the Operation of a Simulated Moving Bed, U S Patent No 4, 182, 633 (Jan 8, 1980)
- 34 *Hiroda T, Shroda K*, A Method for the Elimination of Oligosaccharides, Japanese Patent Office Patent Journal, Kokai Patent No SHO 55 (1980) — 48400, (April 7, 1980)
- 35 *Barker P E, Deeble R E*, Production Scale Organic Mixture Separation Using a New Sequential Chromatographic Machine, *Anal Chem*, **45**, 1121 (1973)
- 36 *Barker P E, Howari M J, Irlam G A*, The Separation of Fatty Acid Esters by Continuous Gas-Liquid Chromatographic Refining, *J Separ Proc Technol*, **2** (2), 33 (1981)
- 37 *Wankat P C*, Improved Efficiency in Preparative Chromatographic Columns Using a Moving Feed, *Ind Eng Chem Fundam*, **16**, 468 (1977)

- 38 *Wankat P C*, Increasing Feed Throughput in Preparative Two-Dimensional Separations, *Separation Sci*, **12**, 553 (1977)
- 39 *Wankat P C*, *Ortiz P M*, Moving Feed Point Gel Permeation Chromatography An Improved Preparative Technique, *Ind Eng Chem Process Des Develop*, **21**, 416 (1982)
- 40 *McGary R H*, *Wankat P C*, Improved Preparative Liquid Chromatography. The Moving Feed Point Method, *Ind Eng Chem Fundamentals*, **22**, 10 (1983)
- 41 *Wankat P C*, Improved Preparative Chromatography Moving Port Chromatography, *Ind Eng Chem Fundamentals*, **23**, 256 (1984)
- 42 *Geldart R W*, *Wang N H L*, *Wankat P C*, Non Linear Analysis of Moving Withdrawal and Moving Port Chromatography, American Chemical Society Meeting, New York City, April 16, 1986
- 43 *Jamrack W. D*, Rare Metal Extraction by Chemical Engineering Methods, Pergamon Press, NY, 1963, chapt 3
- 44 *Wankat P. C*, Cyclic Separation Techniques, in *A E Rodrigues* and *D Tondeur* (eds), Percolation Processes, Theory and Applications, Sijthoff and Noordhoff, Alphen aan den Rijn, Netherlands, (1981), p 443—516
- 45 *Hopf P P*, Radial Chromatography in Industry, *Ind Eng Chem*, **39**, 938 (1947)
- 46 *Mitchell H L*, *Shrenk W G*, *Silker R E*, Preparation of Carotene Concentrates from Dehydrated Alfalfa Meal, *Ind Eng Chem*, **45**, 415 (1953)
- 47 *Heftmann E*, *Krochta J M*, *Farkas D. F*, *Schwimmer S*, The Chromatofuge, An Apparatus for Preparative Rapid Radial Column Chromatography, *J Chromatog*, **66**, 365 (1972)
- 48 *Delaney R A M*, *Donnelly J K*, *Kearney R D*, Industrial Applications of Gel Filtration 1 Whey, *Process Biochemistry*, **8**, (3) 13 (March 1973)
- 49 *Martin A J. P*, Summarizing Paper, *Disc Faraday Soc*, **7**, 332 (1949)
- 50 *Svensson H*, *Agrell C-E*, *Dehlen S-O*, *Hegdahl L*, An Apparatus for Continuous Chromatographic Separation, *Science Tools*, *The LKB Instrument Journal*, **2**, (2) 17 (1955)
- 51 *Nicholas R S*, *Fox J B*, Continuous Chromatography Apparatus, III, Application, *J Chromatog*, **43**, 61 (1969)
- 52 *Canon R M*, *Begovich J M*, *Sisson W G*, Pressurized Continuous Chromatography, *Separat Sci Technol*, **15**, 655 (1980)
- 53 *Begovich J M*, *Byers C H*, *Sisson W G*, A High Capacity Pressurized Continuous Chromatograph, *Separ Sci Technol*, **18**, 1167 (1983)
- 54 *Wankat P C*, The Relationship Between One Dimensional and Two-Dimensional Separation Processes, *AIChE Journal*, **23**, 859 (1977)
- 55 *Вагин Е В*, *Жуховицкий А А* — Докл АН СССР, 1954, т 94 с 273
- 56 *Tudge A P*, Studies in Chromatographic Transport III Chromathermography, *Canadian J Physics*, **40**, 557 (1962)
- 57 *Foo S C*, *Bergstrom K H*, *Wankat P C*, Multicomponent Fractionation by Direct, Thermal Mode Cycling Zone Adsorption, *Ind Eng Fractionation by Direct, Thermal Mode Cycling Zone Adsorption*, *Ind. Eng Chem Fundamental*, **19**, 86 (1980)
- 58 *Wu Xiang-Zhu*, *Wankat P C*, Continuous Multicomponent Parametric Pumping, *Ind Eng Chem Fundam*, **22**, 172 (1983)

4

Препаративная жидкостная хроматография в фармацевтической промышленности

А. Верли

4.1. Введение

Возрождение жидкостной хроматографии, начавшееся в 1970 г., привело к появлению ВЭЖХ и развитию исследований в области препаративных разделений, которые в последние годы стали одними из методов, наиболее широко используемых в фармацевтической промышленности [1, 2]. Они сопровождают лекарства на всем пути их производства Этот длинный путь включает следующие ступени:

поиск для приготовления лекарств новых соединений, сопровождаемый очисткой и измерением физических и химических свойств;

фармакологические исследования (на активность и токсичность),

производство в небольшом масштабе;

измерение биохимических параметров (адсорбция, распределение, метаболизм, выделение),

испытания на добровольцах;

исследования по созданию лекарственных форм и испытание стабильности веществ, ограниченные клинические испытания для сравнения с лучшими существующими лекарственными средствами;

опытное производство и производство в крупном масштабе, окончательное оформление

На этом пути аналитическая и препаративная хроматография в настоящее время широко используется для изучения многочисленных проблем

4.2. Главные области применения препаративной ЖХ в фармацевтической промышленности

4.2.1. Препаративная ЖХ

в поиске новых лекарственных веществ

Новые лекарственные вещества ищут, подвергая химическим превращениям известные фармацевтические препараты или путем выделения новых веществ из природных продуктов В обо-

их методах необходима препаративная жидкостная хроматография. Для фармацевтических препаратов, получаемых синтезом химических производных, очень важной характеристикой является чистота продукта. (Это диктуется также национальными законами.) Поэтому синтез чистых продуктов играет фундаментальную роль в фармацевтической промышленности. Для достижения высокой чистоты должны быть известны побочные реакции и структура побочных продуктов, так как это позволяет оптимизировать синтез. Для установления структуры необходимо выделить неизвестных побочных продуктов, что возможно сделать при увеличении масштабов разделения аналитической хроматографии до препаративного (миллиграммового) уровня [3]. В этом случае можно выделить побочные продукты, и их последующая идентификация качественными методами оказывается весьма эффективной [4]. При скрининге новых веществ, выделенных из растений [5], из продуктов ферментации [6] или из организмов животных [7], в исследовательских лабораториях используют препаративную ЖХ для получения материалов (миллиграммовый уровень) с целью идентификации структуры.

После того как конечный продукт выделен или синтезирован, следует точно определить его физические и химические свойства и установить аналитические стандарты, чтобы можно было видеть, что последующие изготавливаемые партии имеют то же качество. Поэтому в фармацевтических лабораториях с помощью препаративной ЖХ разделяют и очищают вещества в граммовых количествах. Для получения таких количеств в соответствии с препаративными требованиями должна быть в наличии соответствующая аппаратура, колонки и методы выделения.

4.2.2. Препаративная ЖХ при биологических испытаниях

После этой первой ступени исследования соединения передают фармакологу для испытания на животных, чтобы определить полезность нового лекарства, особенно в сравнении с существующими препаратами. Кроме этих фармакологических испытаний необходимо рассмотреть биохимию и токсикологию соединения. Это означает, что большой интерес представляет адсорбция, распределение, выделение и метаболические изменения, происходящие в живом организме. Поэтому следует ответить на два главных вопроса: 1) как изменяется соединение в организме под действием различных ферментных систем; 2) являются ли какие-либо из этих метаболитов токсичными, неактивными или более активными, чем исходные соединения. Эти вопросы требуют выделения нанограммовых количеств и идентификации структуры компонентов. Классический путь решения этих вопросов дает препаративная хроматография [8].

4.2.3. Препаративная ЖХ при исследовании стабильности лекарств

После завершения исследований метаболизма и других экспериментов на животных следующая важная ступень — испытание воздействия нового препарата на человеческий организм. Эксперименты обычно выполняются с помощью добровольцев, набираемых из служащих компаний или в других местах. На этой стадии должны быть выполнены исследования по созданию лечебных форм, чтобы найти наиболее подходящую форму, в которой пациенту можно давать лекарство. Эта работа прежде всего включает изучение стабильности вещества в форме, выбранной для введения при клинических испытаниях.

При таких длительных исследованиях стабильности лекарств и исследованиях кинетики разложения важными стадиями являются разделение и последующая идентификация продуктов разложения. Для этих целей быстрый метод получения фракций, содержащих неизвестные продукты распада, обеспечивает препаративная жидкостная хроматография на миллиграммовом уровне. Полученные фракции в дальнейшем используются для идентификации, как описано в предыдущем разделе для метаболитов [9].

4.2.4. Препаративная жидкостная хроматография в производстве

После выполнения всех доклинических исследований может быть начата последняя стадия работы, включающая клинические испытания и изучение вопросов крупномасштабного производства. На этой стадии очистка играет центральную роль и является главной частью химической технологии. В фармацевтической промышленности установились такие классические методы, как перегонка, экстракция, кристаллизация и т. д., однако имеются многие дополняющие их методы. Одним из новых методов, не совсем обычным в химической технологии, является препаративная жидкостная хроматография. Она находит особое применение в крупномасштабном производстве лекарств на основе процесса ферментации [10].

Итак, препаративная жидкостная хроматография находит широкое применение при разделении веществ в фармацевтической промышленности. Ее используют прежде всего при поиске новых соединений, биологических испытаниях, при исследовании стабильности лекарств и при производстве лекарственных препаратов. Количество выделяемых компонентов меняется от миллиграммов до килограммов.

В зависимости от необходимого количества материала в фармацевтической промышленности различают препаративную жид-

костную хроматографию аналитического, лабораторного или промышленного (технологическая ЖХ) масштаба.

В исследовательских лабораториях ЖХ применяют для получения материала, необходимого для структурной идентификации или установления структуры (миллиграммовые количества) соединений с целью: 1) поиска новых эффективных веществ в организмах растений и животных, 2) выделения и разделения продуктов реакции или распада, 3) исследования метаболизма. Граммовые количества разделяют и очищают с помощью препаративной ЖХ лабораторного масштаба. Собираемые фракции используют для химического, физического и биологического исследования. Количество вещества в диапазоне многих граммов — килограммов (в производственном масштабе) получают с помощью препаративной ЖХ в производстве на стадии очистки.

4.3. Используемые хроматографические системы

Препаративная жидкостная хроматография нашла широкое применение в фармацевтической промышленности. Причиной этому является хорошо известная в настоящее время эффективность разделения широкого ряда лекарств. Имеются примеры хроматографического разделения таких чистых соединений, как анальгетики, анестетики, психостимуляторы, антиконвульсанты, аталептики, антигистамины, антикоагулянты, диуретики, гормоны, витамины, антибиотики, сульфамиды, гипнотические, сердечно-сосудистые, противоопухолевые препараты и другие. Такие вещества могут быть разделены в тех случаях, когда они находятся в таблетках, микстурах, кремах, помадах, препаратах на основе масел, в биологических растворах, в ферментационных бульонах или синтетических смесях [11—14].

При выполнении разделений или очистки этого широкого класса соединений могут быть использованы различные виды ЖХ. В фармацевтических лабораториях хорошо установившимися методами являются: адсорбционная хроматография [15], хроматография на привитых фазах [16], ионообменная [17] и итловая [18] хроматография. Кроме того, используется жидко-жидкостная распределительная [19] и аффинная [20] хроматография.

4.3.1. Адсорбционная хроматография

Адсорбционная хроматография распространена в фармацевтической промышленности довольно широко. В качестве насадок применяется оксид алюминия или силикагель. На обоих мате-

риалах адсорбцию обуславливают гидроксильные группы на поверхности. Поэтому важным фактором в адсорбционной хроматографии является содержание воды или полярных веществ в неподвижной фазе. Для того чтобы получать воспроизводимые разделения, необходимо тщательно устанавливать содержание этих веществ. В препаративной хроматографии это представляет трудности, поскольку при изменении содержания воды в подвижной фазе или самой подвижной фазы требуется некоторое время для установления равновесия в хроматографической системе. Поэтому, например, градиентное элюирование не рекомендуется использовать в препаративной адсорбционной хроматографии. Тем не менее адсорбционные материалы довольно часто используют в препаративной жидкостной хроматографии из-за их низкой стоимости.

4.3.2. Хроматография на привитых фазах

Принципиальный недостаток адсорбционной хроматографии — большое время приведения системы в равновесие — отсутствует в хроматографии на привитых фазах. Такие насадки имеют хорошую химическую инертность, отличную стабильность и короткое время рекондиционирования при градиентном элюировании или в процессах очистки колонки [21]. Они дают большую свободу выбора в отношении подвижных фаз и их состава. Могут быть насадки для обращенной или нормально-фазовой хроматографии. Такие фазы дороги, и поэтому их используют главным образом в препаративной хроматографии небольшого масштаба.

4.3.2.1. Обращенно-фазная хроматография

В настоящее время большинство публикуемых работ, связанных с применением ЖХ в фармацевтической промышленности, относятся к хроматографии на обращенных фазах. Поскольку такие колонки не только имеют упомянутые выше преимущества, но и обеспечивают широкий диапазон элюирующей силы простых бинарных смесей, таких, как метанол — вода или ацетонитрил — вода. Поэтому на колонках, заполненных обращенно-фазными материалами, могут быть успешно хроматографированы многие фармацевтические продукты.

4.3.2.2. Нормально-фазная хроматография

Сегодня в препаративной жидкостной хроматографии могут быть использованы фазы с различными полярными функциональными группами. Эти группы так же, как группы обращен-

ной фазы, прочно привиты к поверхности пористого силикагеля. Наиболее часто используются amino-, диол-, циано- и нитро- группы. Эти фазы используются большей частью в нормально-фазном варианте, аналогичном адсорбционной хроматографии. Они стабильны к гидролизу и по сравнению с адсорбционной хроматографией имеют более короткое время установления равновесия. Вследствие этого такие фазы могут быть быстро очищены и приведены в равновесие аналогично вышеупомянутым обращенно-фазным насадкам, и поэтому их используют в препаративной жидкостной хроматографии, если они дают равную или лучшую эффективность по сравнению с адсорбционной хроматографией.

4.3.3. Ионообменная хроматография

В прошлом ионообменную хроматографию широко использовали для разделения в фармацевтических лабораториях. В настоящее время ее важность, за исключением выделения пептидов, уменьшается. Причина этого, видимо, заключена в сложности методик, требующих длительного времени для проявления, и в ограниченности диапазона соединений, предопределенных для хорошего ионообменного разделения в сложных фармацевтических смесях.

4.3.4. Ситовая хроматография и другие методы

За небольшим исключением, ситовая хроматография, а также и некоторые другие хроматографические методы, например жидко-жидкостная распределительная хроматография или аффинная хроматография, нашли лишь небольшое место в фармацевтических препаративных применениях. Они используются для выделения природных продуктов, таких, как пептиды и протеины.

4.4. Аппаратура и примеры

Как уже отмечалось, препаративную ЖХ используют в фармацевтической промышленности для различных целей. Различают аналитическую, лабораторную и технологическую хроматографию.

4.4.1. Препаративная ЖХ аналитического масштаба (миллиграммы)

4.4.1.1. Приборы

Препаративно-аналитическая ЖХ предназначена для масштабирования высококачественных разделений на получение достаточно чистых веществ в количествах, необходимых для идентифика-

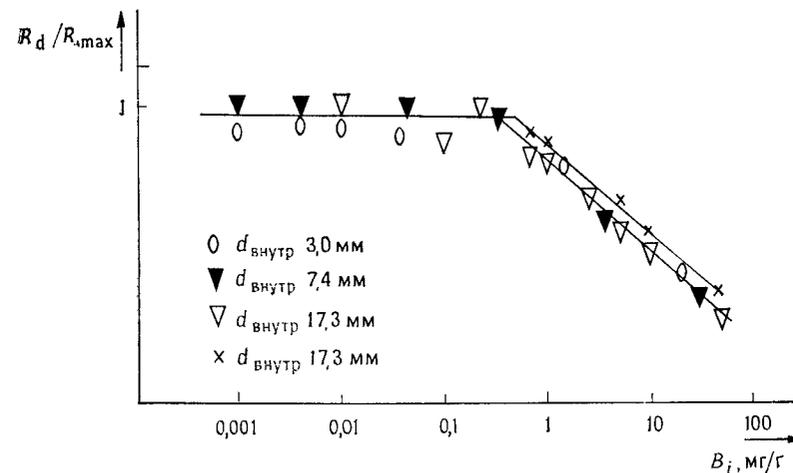


Рис. 4.1. Соотношение между относительным разрешением и нагрузкой на 1 г насадки.

ции или определения структуры соединения. Для таких применений требуется наибольшая из возможных степеней разделения. В последние десятилетия такой степени разделения удалось достигнуть на колонках, имеющих диаметр 3—24 мм, заполненных частицами малого размера (3—10 мкм) [22]. Однако эксперименты показали, что аналитические колонки позволяют разделять только миллиграммовые количества образца из-за сравнительно малой емкости этих систем. Емкость системы для большинства практических целей равна примерно 0,1—1 мг растворенного вещества на грамм полностью пористой насадки, как показано на рис. 4.1. В настоящее время такие разделения, как показано на рис. 4.2, выполняют с помощью аналитических приборов, позволяющих получать скорость потока до 30 мл/мин при давлении 30 МПа. Эти аналитические приборы позволяют работать с аналитическими колонками, имеющими длину от 25 до 50 см, диаметром 4—25 мм, заполненными мелкими гранулами. Емкость системы по выделяемому компоненту на 1 г насадки показывает, что на таких хроматографических системах возможно разделять 100 мг главного соединения в не слишком сложной смеси или 1 мг соединения, присутствующего в концентрации 1% за один опыт.

4.4.1.2. Примеры

Разделение на аналитических колонках с последующей очисткой и идентификацией является рутинной работой во многих лабораториях фармацевтической промышленности. Фракции, содер-

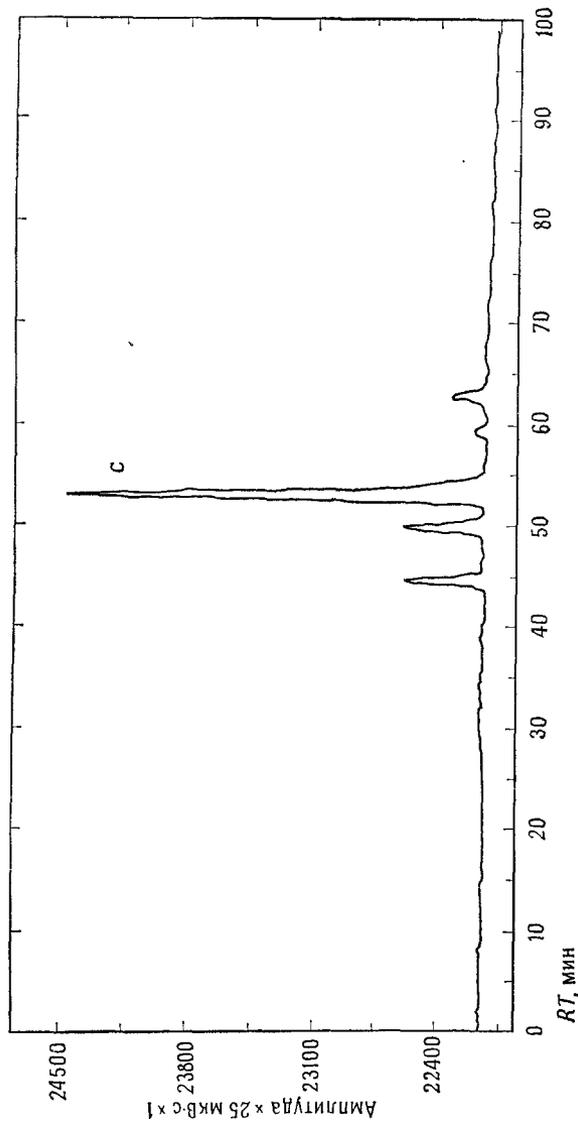


Рис. 4.2. Разделение главных компонентов спорыньи из экстракта продукта ферментации *claviceps purpurea* с помощью градиентного элюирования.

жащие разделенные компоненты, экстрагируют или хроматографируют в хлороформе или другом растворителе, который затем упаривают в атмосфере азота, а собранный компонент (в количестве от микрограмма до миллиграмма) используют для определения структуры с помощью ЯМР-, ИК- или масс-спектрометрии. Окончательная ступень идентификации заключается в сравнении спектральных данных и данных по удерживанию исследуемого соединения с соответствующими характеристиками предполагаемого соединения [23].

Большинство проблем идентификации в фармацевтической промышленности может быть решено без упомянутых выше методов полного установления структуры. Предварительное знание природы образца позволяет провести предварительную идентификацию и (или) подтвердить структуру. Примеры этому можно найти в систематических исследованиях экстрактов растительных или животных тканей, продуктов ферментации, в контроле синтетических продуктов и продуктов выделения, в исследованиях метаболизма и т. д. Если надо подтвердить или установить структуру соединения, то можно собрать вещество в количестве, необходимом для масс-спектрального или ЯМР-подтверждения ожидаемой структуры. Так как в масс-спектрометрии требуется примерно в 1000 раз меньше вещества для получения спектра, чем в других спектральных методах, то в некоторых случаях используют «офф-лайн» ЖХ — МС с использованием заполненных аналитических колонок небольшого размера, которые в этом случае являются средством аналитической пилотной идентификации [24].

На рис. 4.2 показана хроматограмма экстракта продуктов ферментации *claviceps purpurea*, полученная на аналитической колонке диаметром 4 мм, заполненной лихросорбом RP-8, с использованием градиентного элюирования. В этих условиях были разделены 4 главных компонента образца.

Для того, чтобы повысить концентрацию компонента, 2 мкл фракции, вырезанной в максимуме пика, помещают на «вискер» (щеточный кристалл) с помощью шприца, как показано на рис. 4.3. Эту каплю затем упаривают в потоке теплого азота, чтобы предотвратить окисление перед анализом. Для получения в луче β -спектра необходимо менее 10 нг вещества. Это означает, что в некоторых случаях для получения таких масс-спектров достаточно сконденсировать на вискере 1—10 мкл элюата, отобранных из центральной части фракции. Во-первых, был записан спектр с ионизацией электронным ударом каждого главного пика, полученного в экспериментах с ферментационным экстрактом продукта ферментации. Спектры пиков А, В, Д и Е было легко интерпретировать и идентифицировать путем сравнения со спектрами, имеющимися в библиотеке. Четвертый спектр, спектр

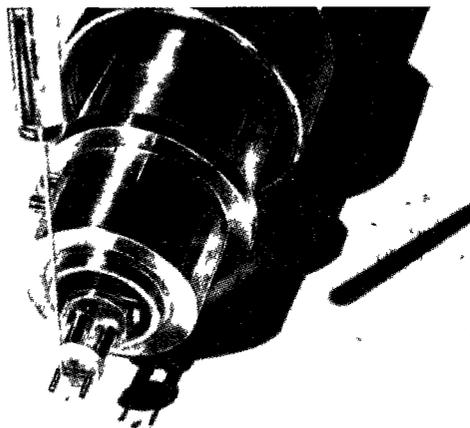


Рис. 4.3 Нанесение капли элюента на «щетку».

пика С, по-видимому, является спектром смеси. Поэтому, взяв 5 мкл фракции этого пика, мы сделали спектральный анализ с использованием полевой десорбции. Как показывает рис. 4.4, а, полевая десорбция дает такую высокую интенсивность молекулярного иона, что анализ смеси возможно сделать на основе одного этого спектра. В наших экспериментах показано, что пик С является смесью двух соединений.

Объяснение структуры только на основе спектра, полученного с помощью полевой десорбции или спектров электронного удара смесей, невозможно или по крайней мере рискованно. Но этот кажущийся недостаток можно исправить с помощью МС-МС-спектроскопии, где каждый ион может быть эффективно отделен с помощью трех квадруполей или с помощью обычного масс-спектрометра со связанным сканированием и анализа фрагментов разделенного иона, полученных после соударения с молекулами нейтрального газа. Такая фрагментация дает информацию, необходимую для идентификации. Такие МС-спектры с ионизацией методом полевой десорбции пиков в 1 и 2 представлены на спектре 2 и 3 (рис. 4.4, б). Как показывают спектры, в этом случае можно получить больше фрагментов и, значит, больше информации. Полученная информация была достаточной для того, чтобы качественно идентифицировать С₁ как эргокриптин и С₂ как эргосинин. Это два хорошо известных эрготалкалоида. Результаты были проверены путем сравнения с известными спектрами.

Этот эксперимент демонстрирует, что МС-МС-спектроскопия может быть очень важным средством для анализа грубых экстрактов, и что такой анализ смеси в сочетании с ЖХ найдет достаточное число применений в будущем.

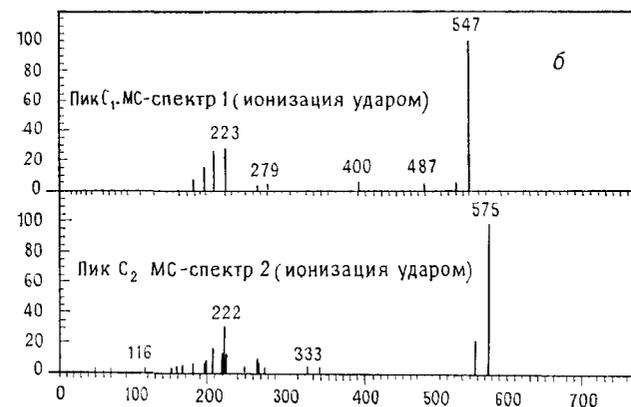
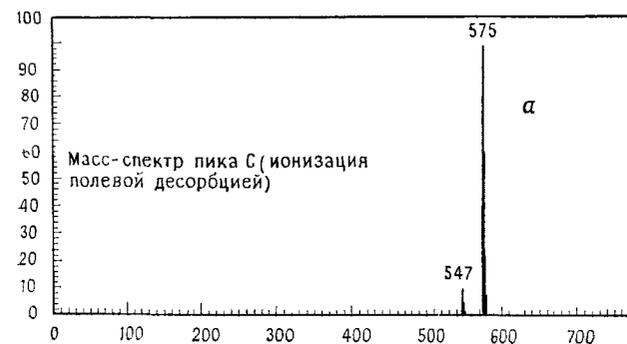


Рис. 4.4 Масс-спектры хроматографического пика а — полевая десорбция, б — полевая десорбция — ионизация ударом (пик С)

4.4.2. Препаративная ЖХ лабораторного масштаба (граммы)

4.4.2.1. Приборы

Другая область препаративной колонной жидкостной хроматографии имеет лабораторный масштаб. Здесь необходимые количества разделенного продукта должны составлять от миллиграммов до нескольких граммов. Хроматографы, предназначенные для препаративных разделений аналитического масштаба, обеспечивают линейную скорость потока до 5 см/с и должны работать при давлениях до 30 МПа. Среднее давление в аналитических работах составляет 10 МПа. В работах лабора-

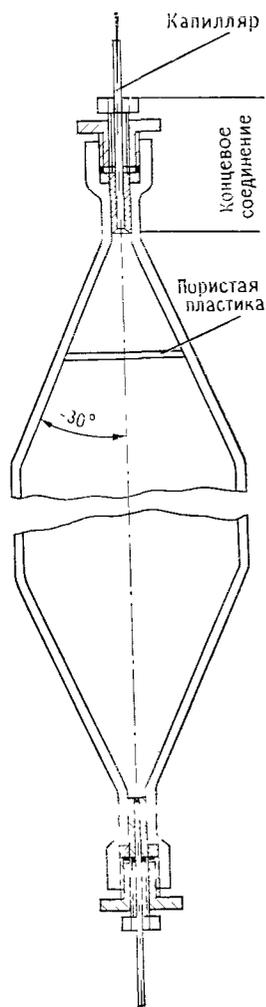


Рис. 4.5. Препаративная колонка для ЖХ (стеклянная конструкция).

устройствами для создания градиента при низком давлении, другие — коллекторами фракций.

Стеклянная колонка, используемая в нашей лаборатории, изображена на рис. 4.5 [26]. Сама колонка представляет собой стеклянную трубку диаметром 2,5, 5 или 7,5 см и длиной 60 см. Максимальное количество насадки в такой колонке составляет примерно 1 кг, что соответствует слою насадки высотой 50 см.

торного или технологического масштаба обычно используют область давления 0,1—10 МПа. Используемое оборудование можно разделить на две группы: 1) оборудование, работающее при давлениях до 5 МПа, 2) оборудование, работающее при давлениях 5—10 МПа.

4.4.2.1.1. Колонки и оборудование для разделений при давлениях меньше 5 МПа. В настоящее время в области фармацевтики многие препаративные ЖХ-разделения лабораторного масштаба проводят в стеклянных колонках с давлениями до 5 МПа. Такие колонки выдерживают ограниченное давление, и в продаже для них имеется все необходимое дополнительное оборудование (узлы ввода пробы, рубашки, колонки, соединительные трубки и т. д.)

Эти колонки лучше всего заполнять сухим методом, и поэтому их используют главным образом с неподвижными фазами, не дающими высокого противодействия. Для работы с такими колонками необходимо оборудование низкого давления. Во многих лабораториях можно найти самодельные системы, состоящие из насоса, петли-дозатора и детектора.

Некоторые из них дополняют

В других лабораториях в этой области давлений работают с оборудованием, выпускаемым промышленностью. Например, в 1975 г. фирма Waters Associates предложила препаративный жидкостный хроматограф модели PrepLC/System 500 [27]. Важным преимуществом конструкции этого инструмента является использование заменяемых предупакованных колонок с пластиковыми стенками — «картриджей». Картриджи помещают в цилиндрическую камеру для сжатия и быстро сжимают. С помощью этой процедуры сжимают насадку колонки в чрезвычайно эффективный хроматографический слой (см. гл. 1). Силикагелевые картриджи преппак-500 имеют размер 5,7 см в диаметре и 30 см в длину. Эффективная длина колонки может быть увеличена путем последовательного соединения таких картриджей. В соответствии с выбранными условиями разделения может быть установлена скорость потока между 0,05 и 0,5 л/мин. Максимальное рабочее давление равно 3 МПа. Образец вводят непосредственно в колонку с помощью шприца. Система ввода образца позволяет вводить фактически любой по размеру образец. В качестве детектора используют дифференциальный рефрактометр, оптимизированный для препаративных разделений.

4.4.2.1.2. Колонки и оборудование для разделений при давлениях 5—10 МПа. В большинстве упомянутых выше разделений, выполняемых при давлении до 5 МПа, требуется среднее разрешение. В таких случаях колонки заполняют насадкой с диаметром частиц более 30 мкм. Такие колонки могут быть однородно заполнены сухим способом частицами, имеющими указанный размер. Работая при давлениях, больших чем 5 МПа, получают среднее или высокое разрешение, которое часто необходимо в фармацевтической промышленности. Такое разрешение может быть получено за счет увеличения длины колонки или в результате использования частиц, имеющих размер менее 30 мкм. При этом необходимо: 1) иметь оборудование, позволяющее работать при таких давлениях, и 2) заполнять колонку суспензионным методом. Обе проблемы были решены фирмой Jobin Yvon при создании препаративного жидкостного хроматографа, в котором имеется возможность заполнять колонки и хроматографировать образцы под давлением (см. гл. 1.7) благодаря конструкции колонки (1 м×8 см), снабженной поршнем. Движение поршня вверх сжимает насадку в колонке и позволяет получать в ней хороший слой с помощью сравнительно простой операции (рис. 4.6). Суспензию насадочного материала в подвижной фазе заливают сверху в открытую колонку (рис. 4.6, а). Затем головка с узлом ввода образца закрепляется наверху колонки (рис. 4.6, б), и поршень движется вверх, сжимая слой и

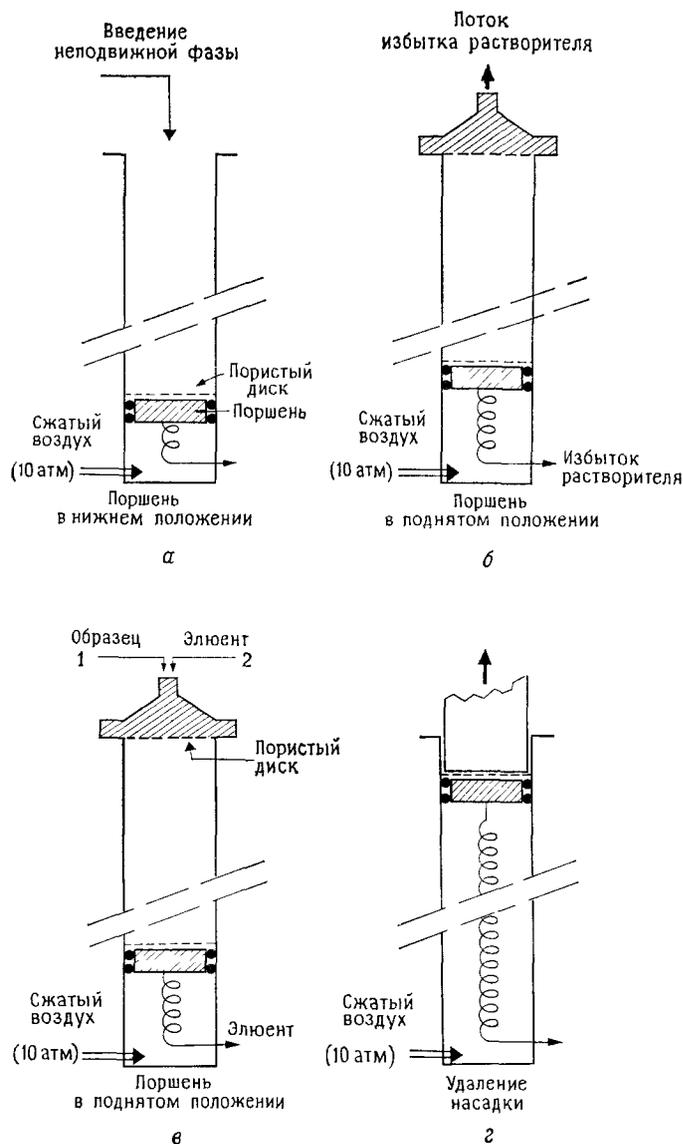


Рис. 4.6. Четыре этапа, иллюстрирующие метод заполнения насадкой колонки в установке хромоспапреп-100.

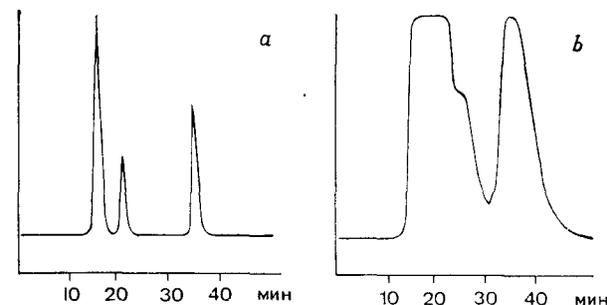


Рис. 4.7. Очистка пиранозидов (глюкоманно- и галактопиранозиды). *а* — аналитическое разделение, пересчитанное; *б* — препаративное разделение с перегрузкой. Колонка: 40×7 см, силикагель, подвижная фаза этилацетат/*n*-гептан, масса образца: 5 г.

выдавливая избыток растворителя из колонки через конец колонки. Окончательное давление на поршень поддерживается в течение хроматографического процесса (рис. 4.6, *в*). Отмечается, что преимущества такой системы заключаются в том, что она, с одной стороны, обеспечивает создание гомогенной и воспроизводимой насадки, а с другой — позволяет проводить элюирование и последующее выталкивание насадки [28].

4.4.2.2. Примеры

Типичными примерами препаративных разделений в лабораторном масштабе является производство высокочистых веществ для химических, физических и биологических испытаний в количествах от миллиграммов до граммов и обогащение и очистка синтетических продуктов, экстрактов растений и продуктов ферментации.

Первый пример [29], иллюстрирующий такое разделение, показан на рис. 4.7, демонстрирующем аналитическое разделение и разделение на колонке большого диаметра. Хроматограмма *а* показывает аналитическое разделение в условиях без перегрузки. Хроматограмма *б* показывает то же разделение в препаративных условиях с использованием стеклянной колонки большого диаметра с низким разрешением, работающей в условиях перегрузки. Эти примеры демонстрируют, что во многих случаях в препаративной жидкостной хроматографии лабораторного масштаба используют перегрузку для достижения большей емкости и большего выхода за счет ухудшения разрешения. Поэтому системы низкого давления с малой эффективностью все еще пользуются спросом и находят применение в ряде лабораторий.

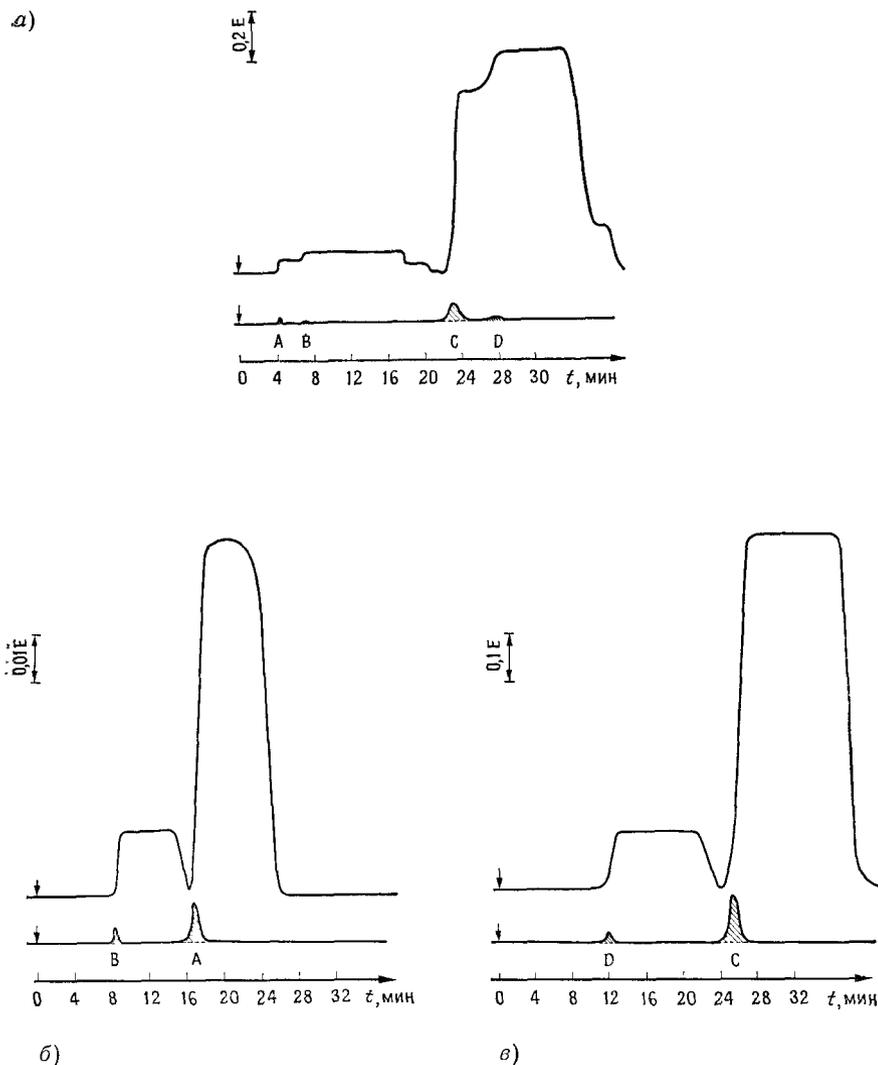


Рис. 4.8. Обогащение продуктов реакции 3-нитрофенацетина с использованием рекомендаций по масштабированию. *a* — аналитическая и препаративная хроматограмма смеси нитрофенацетинов. Колонки: $d_{\text{внутр}}=4,6$ мм, $l=250$ мм и $d_{\text{внутр}}=16$ мм, $l=250$ мм. Насадка: лихросорб S_1 100, $d_p=10$ мкм. Подвижная фаза: *n*-гексан/дихлорометан—ацетонитрил—вода (195 : 780 : 24 : 0,1). Объемные скорости: 2,5 и 30 мл/мин. *b* — колонки тех же размеров. Насадка: лихросорб RP-8, $d_p=10$ мкм. Подвижная фаза: вода—ацетонитрил—триэтиламин (870 : 124 : 6). Объемные скорости: 2,5 и 30 см³/мин.

Другой пример [30] показан на рис. 4.8. Разделяли четыре пика в два этапа. На первом этапе образец был разделен на две группы соединений, как показано на хроматограмме *a*. Эта хроматограмма демонстрирует также наложение двух примерно прямоугольных пиков в каждой группе при разделении на лихросорбе-60. Фракции элюента колонки, соответствующие двум группам соединений, были собраны вручную и разделены в более эффективной системе с лихросорбом RP-8, как показано на хроматограммах *b* и *c*. Таким образом были полностью разделены все четыре компонента. Полное время обогащения и разделения во всех трех хроматографических разделениях составляло 2 ч.

На основе таких хроматографических экспериментов можно утверждать, что при хроматографических разделениях смеси прежде всего необходимо подобрать колонки, имеющие наибольший коэффициент селективности для наиболее трудно разделяемой пары соединений. Далее надо составить план разделения, после чего на колонку следует нанести максимально возможное количество образца, чтобы увеличить выход.

Третий пример на рис. 4.9 демонстрирует основные принципы получения максимального выхода с использованием нескольких ступеней селективности. В этом примере для выделения чистых соединений из сырого экстракта растений, содержащего терпеноиды и алкалоиды, полезным оказалось использование препаративной системы с принудительной подачей раствора вместо обычной колонки с течением элюента под действием силы тяжести. Этот пример, опубликованный Хостеттманом [31], показывает разделение грубого гексанового экстракта из *fagara chalybea* (rutaceae) на хроматографе марки PrepLS/System 500) фирмы Waters с использованием колонки с картриджем из силикагеля (30 см × 5,7 см).

Первой ступенью являлось удаление небольших количеств полярного материала из экстракта путем элюирования его через силикагель подвижной фазой эфир — гексан 1 : 1. Это предотвращает впоследствии загрязнение колонки. Как видно из схемы, фильтрат был подвергнут затем препаративной ЖХ, с помощью которой в течение 6 мин получили менее полярные фракции 1 (примерно 1 г) и 2 (850 мг). После выхода пика 2 система была переключена на более полярный элюент этилацетат — гексан 1 : 4, и элюируемый продукт был собран в одной фракции. Фракция была сконцентрирована и подвергнута повторному препаративному ЖХ-разделению с тем же элюентом. Это привело к выделению за 25 мин четырех фракций: 3 (120 мг), 4 (180 мг), 5 (40 мг), 6 (125 мг). Отметим, что весь процесс выделения потребовал 2—3 ч, тогда как при обычной технике

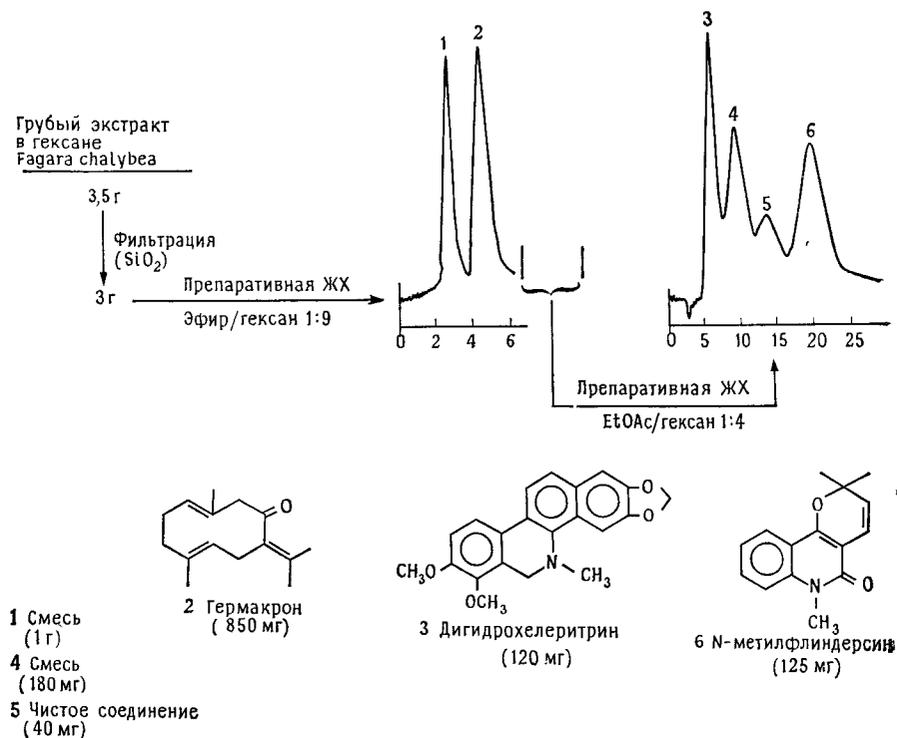


Рис. 4.9. Разделение грубого экстракта *fagaga chalybea* гексаном на препаративной системе фирмы Waters с использованием силикагелевых картриджей и давления [31].

необходимо примерно 2 недели. Можно отметить, что такая хроматография значительно упрощает выделение.

Эти три примера иллюстрируют применение препаративной ЖХ лабораторного масштаба в фармацевтической промышленности. В литературе имеется много других примеров, большинство из которых можно классифицировать с помощью рис. 4.10:

- 1) разделение близко элюируемых компонентов;
- 2) очистка сравнительно хорошо отделяемого главного компонента или обогащение побочного продукта;
- 3) выделение соединений в сложных смесях.

В последнем случае минорный компонент должен быть первоначально обогащен с помощью одной или большего числа ступеней. Это обогащение достигается путем перегрузки колонки и сбора фракции в области ожидаемого удерживания необходимого соединения. Собранные фракции затем можно объединить, сконцентрировать и вторично хроматографировать в дру-

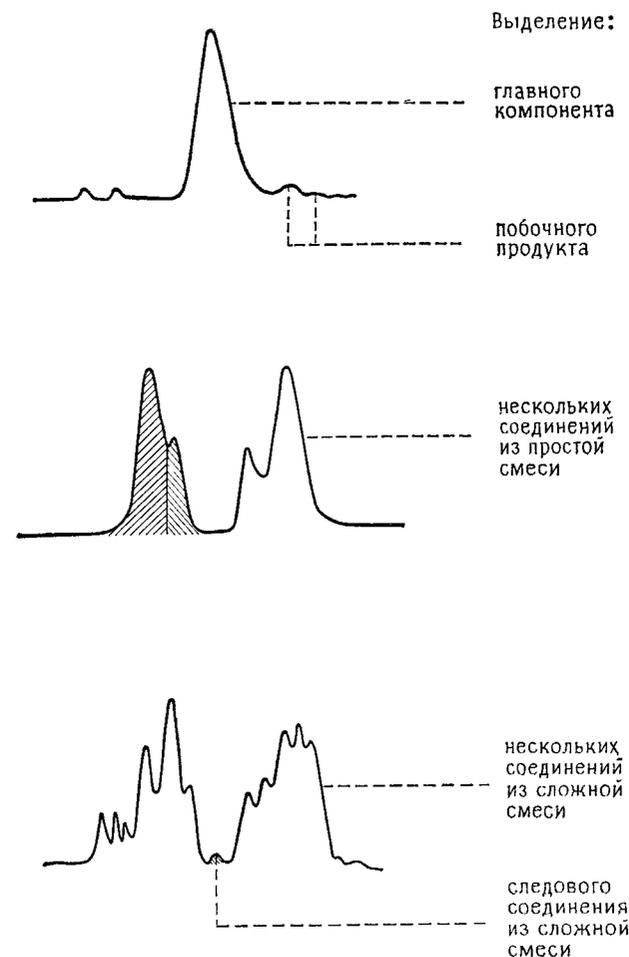


Рис. 4.10. Хроматограммы, иллюстрирующие проблемы выделения в препаративной ЖХ.

гой системе, позволяющей получить необходимое разделение.

Наиболее простой случай — очистка сравнительно хорошо отделяемого главного компонента или обогащение побочных продуктов. В этом случае лучше всего, во-первых, оптимизировать удерживание в пределах k' до 10, затем увеличить нагрузку до момента, когда пики будут перекрываться. В этой точке собирают фракцию.

В последнем случае должны быть выделены два или большее число близко элюируемых соединений. В этой ситуации полезно

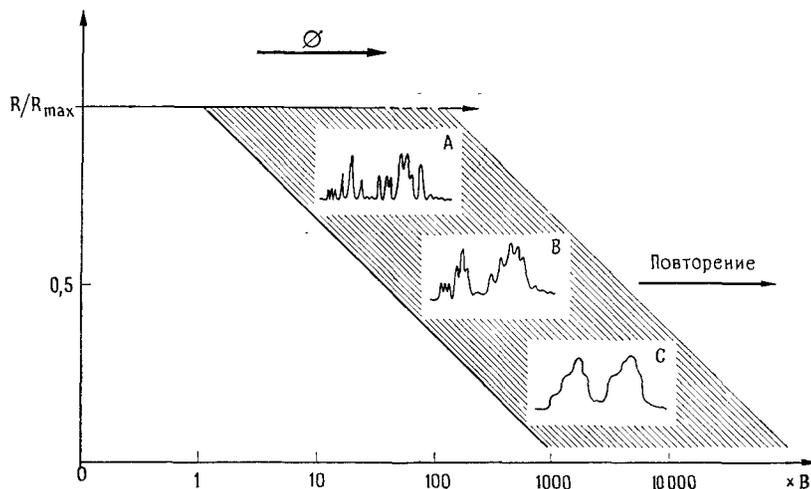


Рис. 4.11. Масштабирование ЖХ.

увеличить разрешение (путем увеличения эффективности или селективности) или использовать метод циркуляции.

4.4.2.3. Некоторые тенденции в препаративной ЖХ лабораторного масштаба

4.4.2.3.1. Работа в циклическом режиме. В препаративной хроматографии величина образца и удерживание определяют так называемую производительность, которая равна выделенному количеству разделенных соединений в единицу времени для данного числа теоретических тарелок. Соотношение между этой производительностью ($\times B$) и расширением полосы (R/R_{\max}) известно и показано на рис. 4.11.

Показанный график хорошо подходит для иллюстрации положения. Конечно, между А и С имеется плавный переход. Однако каждая область может быть расширена за счет: а) увеличения диаметра, б) повторения хроматограмм (или циклов разделения). Оба фактора можно объединить и систему обеспечить автоматическим контролем.

Эти контрольные системы для проведения программируемых разделений можно разделить на три группы:

1. Контролируется только время (система без обратной связи действительной последовательности разделения).

2. Контроль концентрации (система, в которой программа разделения зависит от хода разделения).

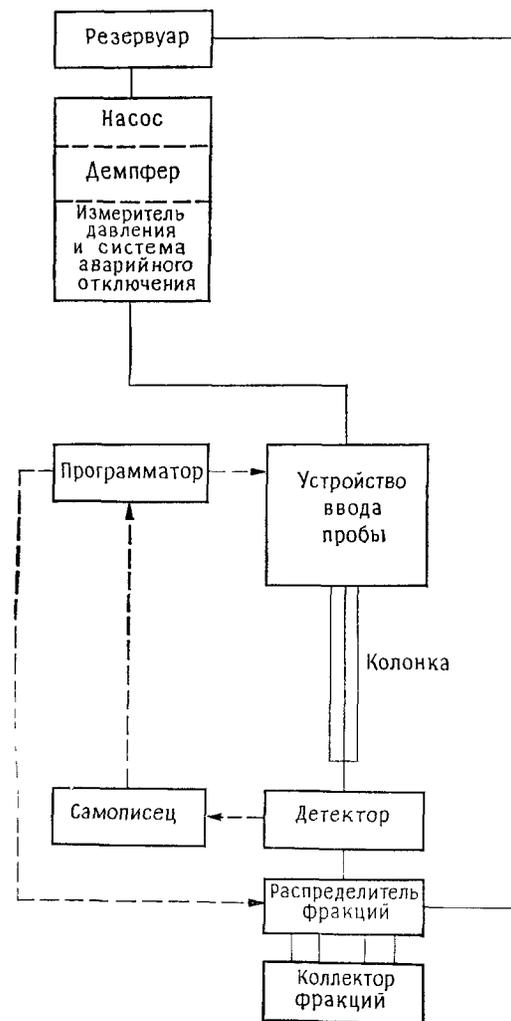


Рис. 4.12. Схема автоматизированной системы для периодических разделений.

3. Система с контролем времени и концентрации. Эта система, очевидно, наиболее надежная.

Рис. 4.12 показывает блок-схему автоматического хроматографа периодического действия, снабженного контрольной системой, который используется в нашей лаборатории.

4.4.2.3.2. Градиентное элюирование и циркуляция. Такие методы, как градиентное элюирование и переключение колонок, могут



Рис. 4.13. Схема циркуляционной установки.

быть интересными дополнениями в аппаратуре для препаративной хроматографии. В частности, установка градиентного элюирования может решить «общую проблему элюирования» и потому полезна во многих разделениях лекарств.

Циркуляция также может помочь преодолеть трудности при разделении. Наиболее простой вариант циркуляционного прибора включает насос, систему дозирования, колонку и детектор, объединенные в единую петлю (рис. 4.13).

Хроматограф для циркуляционной хроматографии отличается от обычного жидкостного хроматографа тем, что насос имеет два входа для растворителя (один из резервуара для растворителя и второй из рецикла) и переключающий кран на выходе детектора для рецикла или сбора данной фракции хроматограммы. Этот дополнительный кран необходим, поскольку циркуляционная система — закрытая система с конечным объемом. При циркуляции быстро движущиеся вещества будут в конце концов догонять вещества, двигающиеся более медленно и смешиваться с ними. Кран должен давать оператору возможность до того, как произойдет наложение пиков, удалять часть компонентов, которые могут смешаться.

Разделение метаболитов из экстракта мочи, выполненное на приборе, в котором выход УФ-детектора был соединен трубкой малого диаметра с системой подачи растворителя фирмы Waters, представлено на рис. 4.14. На рис. 4.14, *a* показана первоначальная хроматограмма. Разделение, приведенное на

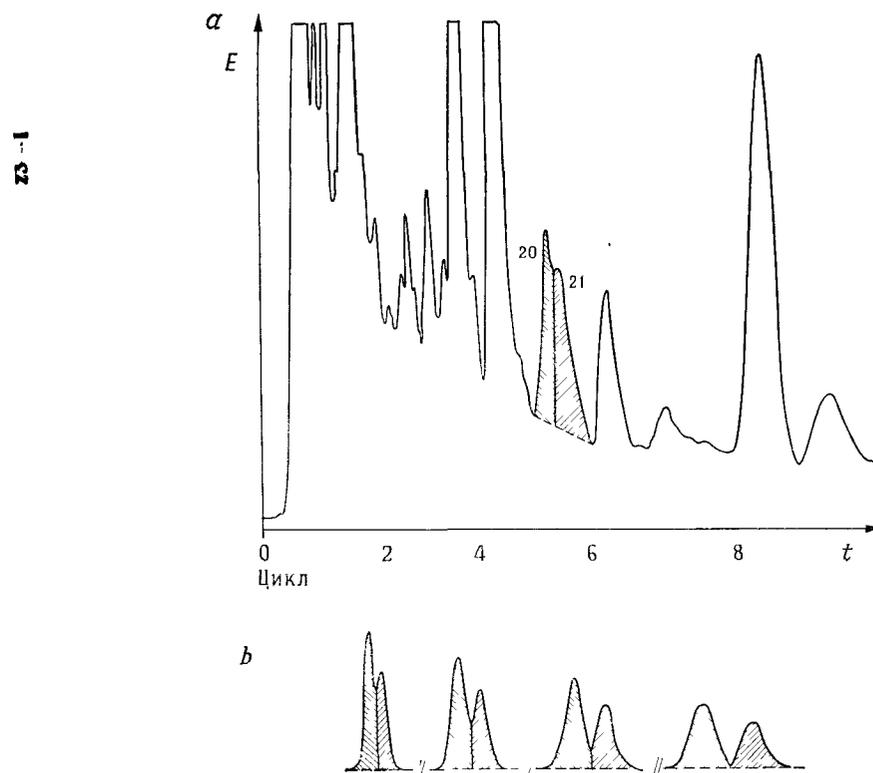
Рис. 4.14. Разделение с помощью циркуляции. *a* — исходная хроматограмма. Образец — экстракт метаболитов в плазме; *b* — разделение с помощью циркуляции веществ 20 и 21.

рис. 4.14, *b*, было получено за 8 циклов при скорости 9 мл/мин на колонке размером 28×0,8 см. Колонка была заполнена меркосорбом Si-100 с размером частиц 5 мкм. Благодаря хорошему разделению было возможно собрать оба компонента без потери материала.

4.4.3. Препаративная ЖХ промышленного масштаба

4.4.3.1. Аппаратура

Производительности хроматографической установки, обеспечивающей выпуск промышленной продукции, можно достичь путем выполнения многоцикловых разделений, как это делают в препаративной ЖХ лабораторного масштаба, и использования

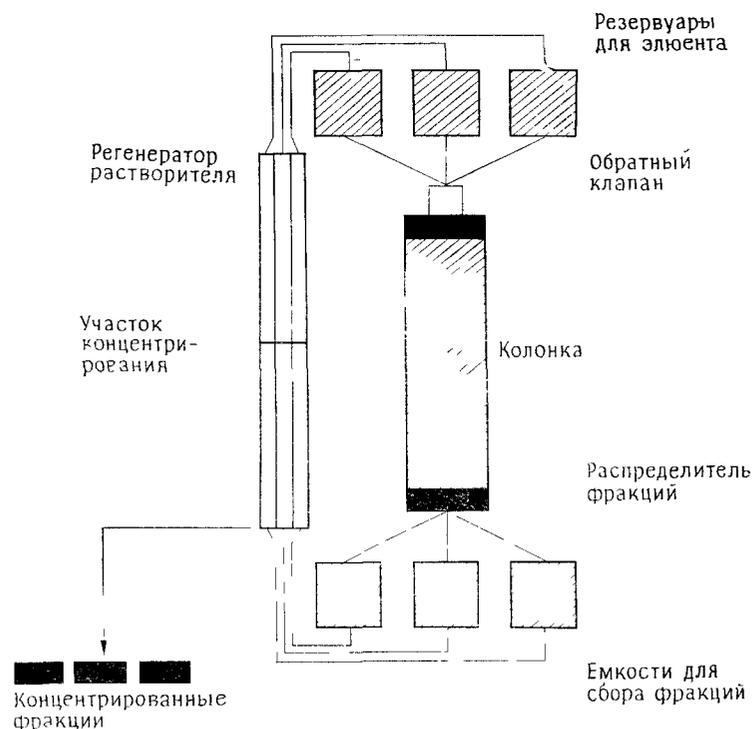


Рис. 4.15. Блок-схема технологической линии, используемой для группового разделения.

колонн большего диаметра [33] (как показано на рис. 4.11) или при непрерывной хроматографии [34]. Совершенно очевидно, что автоматические приборы, применяемые в исследовательских лабораториях, будут увеличены до масштабов, требуемых для фармацевтического производства, если будет доказана их необходимость и экономичность.

В настоящее время в большинстве лабораторий соединения или группы соединений, которые должны быть обогащены или очищены, разделяют за один пробег. Колонки диаметром от 2,5 см до примерно 1 м изготавливают из стекла. Их заполняют силикагелем, оксидом алюминия или целлюлозой (или ее производными) на высоту от 50 до 250 см частями, имеющими диаметр около 100 мкм. В большинстве случаев размер частиц выбирают исходя из практических соображений, например о проницаемости или об упрощении и безопасности (по ингаляции) метода заполнения.

Колонки с весьма низкой разделительной эффективностью по сравнению с колонками аналитической хроматографии все

еще употребляют для простых, например групповых, ситовых и т. д., разделений. Технологическое оборудование, используемое для таких процессов, показано на рис. 4.15. В этой блок-схеме имеются две главные части, о которых ничего специально не говорилось в предыдущих разделах: 1) колонка для регенерации растворителя, 2) система распределения образца при вводе в колонку. Обе части играют важную роль в препаративной ЖХ.

Вопрос о том, нужно ли очищать растворитель, должен решать пользователь. Обычно регенерацию или очистку растворителя в препаративной ЖХ осуществляют тремя методами: 1) сушка с замораживанием; 2) перегонка; 3) пропускание через селективную колонку (возможно, предколонку).

В препаративной ЖХ после сушки с вымораживанием регенерированный растворитель в большинстве случаев достаточно чист для препаративных разделений лабораторного или промышленного масштабов (в препаративной ЖХ аналитического масштаба очень часто нужна дальнейшая очистка). Необходимость очистки и рекондиционирования насадки колонки зависит от введенного образца.

Образцы, которые не были предварительно фракционированы, часто требуют слишком большого объема для полного элюирования, и повторное циклическое разделение соединений невозможно без очистки и рекондиционирования колонки. Экономическая целесообразность очистки и рекондиционирования зависит от стоимости растворителя и насадки. Часто предпочтительно заменить насадку колонки вместо ее рекондиционирования.

При введении образца в колонки диаметром более 20 мм очень важно равномерное распределение образца по поперечному сечению колонки. При использовании точечного ввода пробы колонка в центре окажется перегруженной, и часто будет наблюдаться заметное образование хвостов или размывание фронта. При желании достичь высоких нагрузок следует распределить образец гомогенно по всему поперечному сечению, как это показано на рис. 4.16, на котором распределительные перегородки (5 металлических трубок, стеклянные сферы и пористые пластинки) позволяют гомогенно распределять образец по сечению (см. гл. 1.7).

4.4.3.2. Примеры

Рис. 4.17 иллюстрирует, что на колонках большего внутреннего диаметра (20 см) можно выделить большие количества лекарства. Здесь показано разделение смеси простагландинов на очищенные компоненты на силикагелевой колонке 100×20 см,

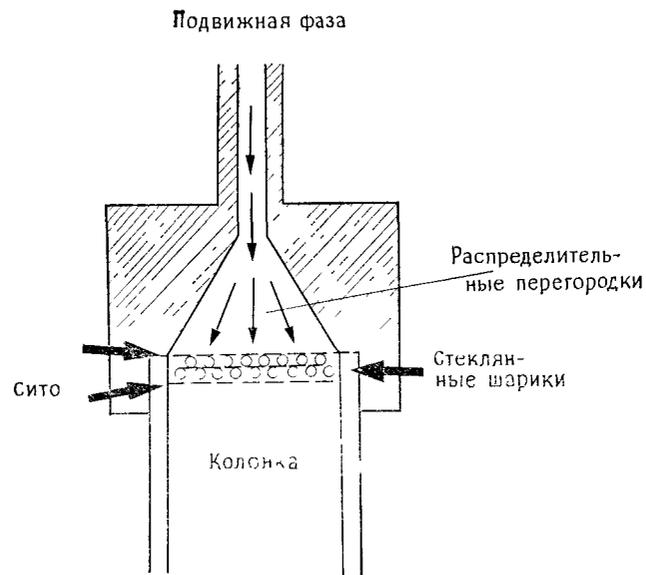


Рис. 4.16. Дозатор с распределителем

заполненной методом осевого сжатия. Хотя это не очень «красивая» хроматограмма, довольно большие количества высоко чистых простагландинов (например, 150 г простагландина Е) были выделены в течение одного цикла [35]. Колонки такого внутреннего диаметра пригодны для препаративного выделения килограммовых количеств очищенных материалов за приемлемое время.

Таким выделениям, конечно, может способствовать автоматизированная препаративная ЖХ. Как видно из последнего примера, повторные разделения можно использовать для выделения очень больших количеств чрезвычайно чистых компонентов. На рис. 4.18 показана хроматограмма повторяющихся разделений диастереомерных карбаматов на колонке, заполненной кислотным оксидом алюминия (для индивидуального опыта требу-

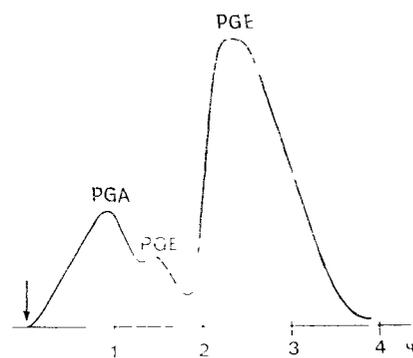


Рис. 4.17. Крупномасштабное разделение простагландинов. Колонка: $d_{\text{внутр}}=20$ см, $l=100$ см, силикагель («Woelm»); подвижная фаза: этилацетат/гексан [35].

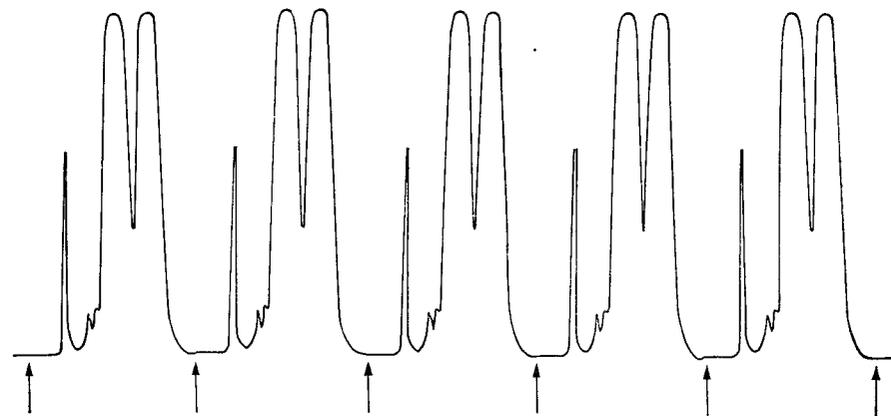
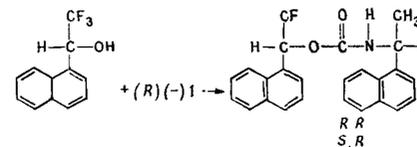


Рис. 4.18. Автоматическое периодически повторяющееся разделение диастереомерных карбаматов. Колонка: $d_{\text{внутр}}=6,4$ см, $l=122$ см, кислотный оксид алюминия. Подвижная фаза: бензол, навеска образца 1 г [36].

ется примерно 1 ч); система четко разделяет диастереоизомеры ($\alpha=1,37$) [36]. Это говорит о том, что с помощью повторяющихся разделений можно делить смеси с малой селективностью в граммовых и килограммовых количествах.

4.5. Заключение

Возрождение жидкостной хроматографии (1970), приведя к появлению ВЭЖХ, стимулировало исследования в области препаративных разделений. В соответствии с практическим опытом применений ВЭЖХ в фармацевтической промышленности виды хроматографического разделения можно классифицировать как препаративную хроматографию в аналитическом, лабораторном и промышленном масштабе. Требуемые количества изменяются от наногаммов до килограммов.

В исследовательских лабораториях ЖХ используют для получения материалов, необходимых для структурной идентификации и исследования структуры (требуются миллиграммы вещества), например при исследовании новых эффективных ве-

ществ растительного и животного происхождения. Для этих целей используют аналитическую аппаратуру.

Граммовые количества вещества также разделяют и очищают с помощью препаративной колоночной жидкостной хроматографии. Такие количества необходимы для физических, химических и биологических исследований. Для получения таких количеств аппаратура, колонки и схемы разделений должны соответствовать препаративным требованиям.

Препаративную колоночную жидкостную хроматографию в настоящее время еще редко используют на стадии производства — в основном как метод очистки или иногда как средство выделения главных компонентов на колонках большого диаметра.

Наблюдая бурное развитие в области аппаратуры, фаз и методов жидкостной хроматографии можно предсказать возрастание роли препаративной жидкостной хроматографии в фармацевтической промышленности.

Литература

- 1 Geevaert E, Verzele M, *Chromatographia*, **11**, 640 (1978)
- 2 Eittr L S, *Chromatographia*, **12**, 302 (1979)
- 3 Wehrli A Z *Anal Chem*, **277**, 289 (1975)
- 4 Hupe K P, Lauer H H, *Chromatographia*, **13**, 413 (1980)
- 5 Kingston D G I *J Nat Prod*, **42**, 237 (1979)
- 6 Neuss N et al, *Helv*, **63**, 1119 (1980)
- 7 Morris C J O R, Morris P, *Separation Methods in Biochemistry*, Pitman Publishing London, 1976
- 8 Overzet F, *HRC and CC*, **5**, 604 (1982)
- 9 Poochikian G K, Kelly J A *J Pharm Sci*, **70**, 182 (1981)
- 10 Schmid G, Goelker C, in P Prave et al (Ed), *Handbuch der Biotechnologie*, Akad Verlagsges Wiesbaden, 1982 pp 235—242
- 11 Heftmann E *Chromatography Parts A and B*, Elsevier, Scientific Publishing, Amsterdam, 1983
- 12 Fishbein L, in E Heftmann (Ed), *Chromatography* Elsevier Scientific Publishing Amsterdam, 1983, pp B 287 B 320
- 13 Wessely K, Zech K *HPLC in Pharmaceutical Analyses* hp, 1979
- 14 Fairbrother J E and others, *Quarterly Reviews*, in *Pharmaceutical Journals*
- 15 Unger K K *Porous Silica*, Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam 1979
- 16 Gruschka E, *Bonded Stationary Phases in Chromatography*, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 1974
- 17 Fritz J S, Gjerde D T, Pohlandt G, *Ion Chromatography*, Huthig Verlag, Heidelberg 1982
- 18 Yau W W, Kirkland J J, Bly D D *Modern Size Exclusion Chromatography*, Wiley Interscience, New York, 1979
- 19 Snyder L R, Kirkland J J, *Introduction to Modern LC*, John Wiley, New York, 1979
- 20 Туркова Я *Аффинная хроматография* — М. Мир 1980
- 21 Wehrli A, Hildenbrand J C, Keller H P, Stampfli R, Frei R W, *J Chromatogr*, **149**, 199 (1978)
- 22 Biesenberger J A, Tan M, Dudevan I, Maurer T, *Polymer Sci*, **B 9**, 353 (1971)

- 23 Barker D R, Henry R A, Williams R C, Hudson D R, *J Chromatogr*, **83**, 233 (1973)
- 24 Wehrli A, *Dublin Th Quiquerez Ch Chromatographi*, **7**, 414 (1982)
- 25 Cooks R G (Ed), *Collision Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1978
- 26 Loibner H, Seidel G, *Chromatographia*, **12**, 169 (1979)
- 27 Bidlingmeyer B A, Meili J, *Chemie Technik*, **8**, 169 (1979)
- 28 Rosset R *Analisis*, **5**, 253 (1977)
- 29 Little J N, Cotter R L, Prendergast J A, McDonald P D, *J Chromatogr*, **126**, 439 (1976)
- 30 Wehrli A, Hermann U, Huber J F K *J Chromatogr*, **125**, 59 (1976)
- 31 Hostettmann K, Pettel M J, Kubo I, Nakanishi K, *Helv*, **60**, 670 (1977)
- 32 Wehrli A, in *Instrumentation for HPLC*, J F K Huber (Ed), Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, 1978 pp 93—111
- 33 Porath J *Biotechnol Bioing Symp*, **3**, 145 (1972)
- 34 Barker P E, Chuah C M *Chem Ing Tech*, **53**, 987 (1981)
- 35 Yvon Jobin *Division d'Instruments S A*
- 36 Pirkle W H, Anderson R W, *J Org Chem*, **39**, 3901 (1974)

Препаративная жидкостная хроматография для химика-синтетика

Дж. Уайтселл

5.1. Введение

Выдающиеся достижения, имевшие место в течение последних двух десятилетий в области синтетической химии и в особенности в отношении полного синтеза сложных природных продуктов, в значительной степени обусловлены применением современных методов разделения. Поэтому неудивительно, что именно химик-синтетик первым берет на вооружение успехи науки о разделении веществ и первым может оценить их достоинство. Настоящая глава предназначена для детального описания практических способов применения современной техники в жидкостной хроматографии с целью выполнения тех типов разделения, с которыми обычно имеет дело химик-синтетик.

Наиболее часто используемый метод разделения — это жидкостно-адсорбционная распределительная хроматография с применением силикагеля как твердого носителя; такая система может найти свое приложение к разделению широкого диапазона веществ, будучи относительно недорогой и простой в обращении. Со временем жидкостная хроматография претерпела развитие от начального применения открытых набивных колонок до использования слоев сорбента, нанесенных на стеклянные пластинки, и закрытых колонок из нержавеющей стали, работающих под давлением. Ранние попытки поддерживать приемлемые уровни скорости потока при заполнении колонок мелкодисперсным силикагелем основывались на использовании открытых стеклянных колонок с приложением давления газа в верхней части присоединенного резервуара с растворителем; такой метод был, по всей видимости, введен в практику многими исследователями, но формализован Стиллом [1] и получил название «скоростной хроматографии». Очевидно, что сам материал колонки ограничивает применяемое давление до величины, составляющей несколько атмосфер. Работа с крупными пластинками (20×80 см), покрытыми толстыми слоями силикагеля (13 мм), позволила добиться приемлемых разрешений при наличии подходящих неdestructивных методов детектирования; однако сама процедура требовала исключительно больших затрат времени и усилий при разделении проб массой в несколько граммов. Сухое заполнение нейлоновых колонок силикагелем,

предназначенным для хроматографии в толстых слоях, позволило добиться разрешения в таких слоях [2, 3] и в то же время значительно увеличить объем разделяемых веществ и сократить трудозатраты. Наконец, применение металлических колонок и разнообразных систем подачи растворителя под давлением позволило усовершенствовать метод до его нынешнего уровня.

Требования, предъявляемые химиком-синтетиком к методам разделения, весьма высоки и касаются аналитических и препаративных применений с ограничениями, налагаемыми стоимостью и токсичностью растворителей при работе с большими количествами веществ. Так, хотя оптимальное аналитическое разделение конкретной смеси может быть достигнуто при хроматографии на обращенной фазе C_{18} с применением смеси вода — ацетонитрил в качестве подвижной фазы, стоимость фазы C_{18} и токсичность ацетонитрила будут препятствовать применению такой системы для разделения больших количеств веществ. Наличие этих достаточно жестких ограничений заставило многих синтетиков прибегнуть к использованию одной и той же «универсальной» системы разделения: силикагель в качестве неподвижной фазы и соответствующая смесь этилацетата и гексана (скелли-В) в качестве элюента. Как будет показано далее, ограничения на степень разрешения, которые могут возникнуть в результате неизменной приверженности к какой-либо конкретной системе разделения, в большинстве случаев можно обойти. Следует иметь в виду, что повседневное использование системы с применением относительно недорогих материалов и нетоксичных, легко очищаемых и стабильных растворителей, которые могут быть регенерированы и повторно взяты для работы, имеет определенные преимущества и приобретает все большее значение в препаративных разделениях при их сочетании с качественным анализом, который должен быть быстрым, простым и недорогим.

В течение многих лет имела постоянная потребность в достижении все более высокого разрешения в связи с усложнением структуры исследуемых молекул и вытекающими из этого трудностями в установлении тонких различий между ними. Два важнейших фактора, влияющие на качество разделения, — это размер частиц твердой фазы и одинаковость их размера. Однако метод приготовления и форма частиц — сферическая или нерегулярная — также имеют большое значение [4]. К сожалению, переход к однородным частицам меньшего размера сопровождается ростом давления, необходимым для поддержания заданной скорости потока подвижной фазы. Тот же недостаток присущ и применению более длинных колонок с целью улучшения разделения: подключение каждой дополнительной колонки приводит к соответствующему увеличению давления; поэтому на

каждую систему, начиная с системы скоростной хроматографии и кончая системами, основанными на применении современных насосных устройств, налагаются ограничения, обусловленные возможностями современной техники подачи растворителя и природой материала колонки.

Использование современных хроматографических возвратно-поступательных поршневых насосов является относительно простым решением дилеммы: многократное прохождение пробы через одну и ту же колонку обеспечивает улучшенное разрешение, свойственное системам из нескольких колонок, при сопротивлении, характерном только для одной колонки. Такая циркуляция в сочетании с отбором пиков позволяет в итоге добиться приемлемого разделения на препаративном уровне даже в тех случаях, когда разрешение, достигаемое классическими методами, например хроматографией в толстых слоях, было бы практически недостаточным. Применение циркуляции, особенно в комбинации с отбором пиков, требует, чтобы в распоряжении исследователя имелся метод анализа потока в реальном масштабе времени.

К сожалению, многие химики-синтетики не могут понять тех преимуществ, которые заключены в применении детектора, работающего в реальном масштабе времени, и полагаются на анализ большого числа фракций, собранных вручную или с помощью автоматизированного коллектора фракций. Когда тонкослойный хроматографический анализ используют для получения качественной картины чистоты фракции, такая процедура становится чрезвычайно трудоемкой и в то же время весьма неточной, особенно в случае очень плохо разделяемых смесей, когда при помощи стандартного тонкослойного анализа не удается достичь никакого видимого разрешения. Более того, существует тенденция ошибаться в сторону завышения чистоты, так как решения принимаются на основе анализа фракций вместо анализа всего объема, собранного для каждого компонента. Хотя фракция, близкая к центру пика, может содержать 20% второстепенного компонента, не следует думать, что такой компонент не должен входить в сводную фракцию данного материала, ведь важно оценить общий уровень чистоты комбинированного материала.

Наиболее часто приводимый аргумент в пользу анализа индивидуальных фракций, отобранных с помощью коллектора, — это отсутствие действительно универсальной системы детектирования. Единственным средством анализа, существующим в настоящее время для определения большого числа соединений, служит рефрактометрический детектор. Но при этом соответствующие системы детектирования основаны по необходимости на определении разности коэффициентов преломления между раствори-

лем, содержащим пробу и не содержащим пробы. Когда эта разность мала, метод становится весьма низкочувствительным и его применение при точном анализе малых количеств в ряде случаев будет ограничено. С другой стороны, относительно высокие концентрации, используемые в препаративном разделении, почти всегда дают достаточный отклик детектора для качественного анализа степени разделения. Действительно, мы никогда не получали ошибочных результатов за восемь лет работы с применением только детекторов по показателю преломления в препаративном разделении веществ в количествах от 500 мг до 50 г.

Применение любого современного метода разделения, включающего постоянный анализ выходящего потока, требует точного понимания роли тех факторов, которые способствуют эффективному разделению смеси, и ясного представления о той степени разделения, которую можно ожидать при получении конкретной хроматограммы. К сожалению, химик-синтетик обычно плохо ориентирован в этом вопросе. Степень разрешения двух (или большего числа) компонентов смеси представляет собой комбинацию абсолютного разделения центров пиков и степени размывания каждого (оба показателя измеряют по единой шкале, например по времени или объему элюента). Понятно, что если бы пики были бесконечно узкими, то любое разрешение пиков привело бы к количественному разделению, или, если бы пики были «бесконечно разделены» (один компонент обладает подвижностью, другой — нет), то степень размывания пиков не имела бы значения. В действительности оба фактора играют свою роль. Степень размывания пика в основном обусловлена действием двух факторов: использованием пористой неподвижной фазы, в которой для адсорбции доступна вся частица, и наличием пустот между частицами. Различные молекулы определенного компонента или вырываются вперед по пустотам, не взаимодействуя с неподвижной фазой, или отстают, диффундируя внутрь частиц, а затем из них. В результате возникает приблизительно гауссово распределение во времени в потоке. Использование материала неподвижной фазы с частицами одинакового размера позволяет резко сократить объем пустот; очень мелкие частицы способствуют уменьшению размывания, происходящего из-за того, что некоторые молекулы лишь касаются поверхности, тогда как другие молекулы одновременно с этим диффундируют внутрь частиц. К сожалению, чем меньше частицы и чем равномернее они заполняют колонку, тем выше давление, которое требуется для поддержания данной скорости потока растворителя. Таким образом, даже если бы имелась возможность экономичного производства колонок с равномерной набивкой чрезвычайно мелкодисперсным сорбентом, насос-

ные системы практически недоступны. Для аналитических целей имеется силикагель со средним размером частиц 5 мкм и очень малым разбросом; в то же время силикагель с размером частиц в диапазоне 37—55 мкм — это наилучший материал, какой может быть использован на практике для препаративного разделения.

На степень абсолютного разделения центров пиков влияет множество параметров, важнейшие из которых — природа самих компонентов (селективность), неподвижная и подвижная фазы (коэффициент емкости) и длина колонки (эффективность). Последний фактор легче всего регулировать, причем достигается эффект прямой пропорциональности: удвоение длины колонки приводит к увеличению вдвое расстояния между центрами пиков. С другой стороны, при удвоении длины колонки пики размываются только в 1,414 раза (квадратный корень из 2), что непосредственным образом связано с гауссовым распределением пика. Читателю рекомендуется обратиться к гл. 1.3 для более детального ознакомления с вопросами разрешения и вклада разных факторов в разделение пиков.

5.2. Моделирование на ЭВМ

Сочетание вышеупомянутых двух эффектов проиллюстрировано рис. 5.1, представляющим графики, полученные на ЭВМ для ожидаемого разрешения при применении одной, двух, трех и четырех идентичных колонок. Штриховые линии соответствуют индивидуальным компонентам, а сплошные — сумме обоих компонентов. Разумеется, сигнал детектора дает хроматограмму обеих компонентов. На рисунке смоделированы хроматограммы смесей с соотношением компонентов от 1:1 до 10:1; высокие соотношения более характерны для хроматограмм, получаемых химиком-синтетиком. К сожалению, достигаемая повышенная степень разрешения в определенной степени маскируется размыванием пиков, приводящим к ложному впечатлению, что степень разрешения падает. Однако важным параметром здесь является не ширина пиков и не разделение пиков, а скорее их соотношение. Под каждой из смоделированных хроматограмм дана степень чистоты соответствующего компонента или «пика», если обе фракции были получены вблизи точки, где пересекаются хроматограммы индивидуальных компонентов, обозначенной вертикальной черточкой. Химики без хорошей хроматографической подготовки почти всегда считают уровень чистоты более низким, чем это показано на рисунке. Так, например, на первой хроматограмме для каждой смеси не видно внешних признаков разделения, и простое разделение по средней точке даст две фракции, каждая со степенью чистоты 82% для начальной смеси 1:1. Применение двух колонок, соединенных последователь-

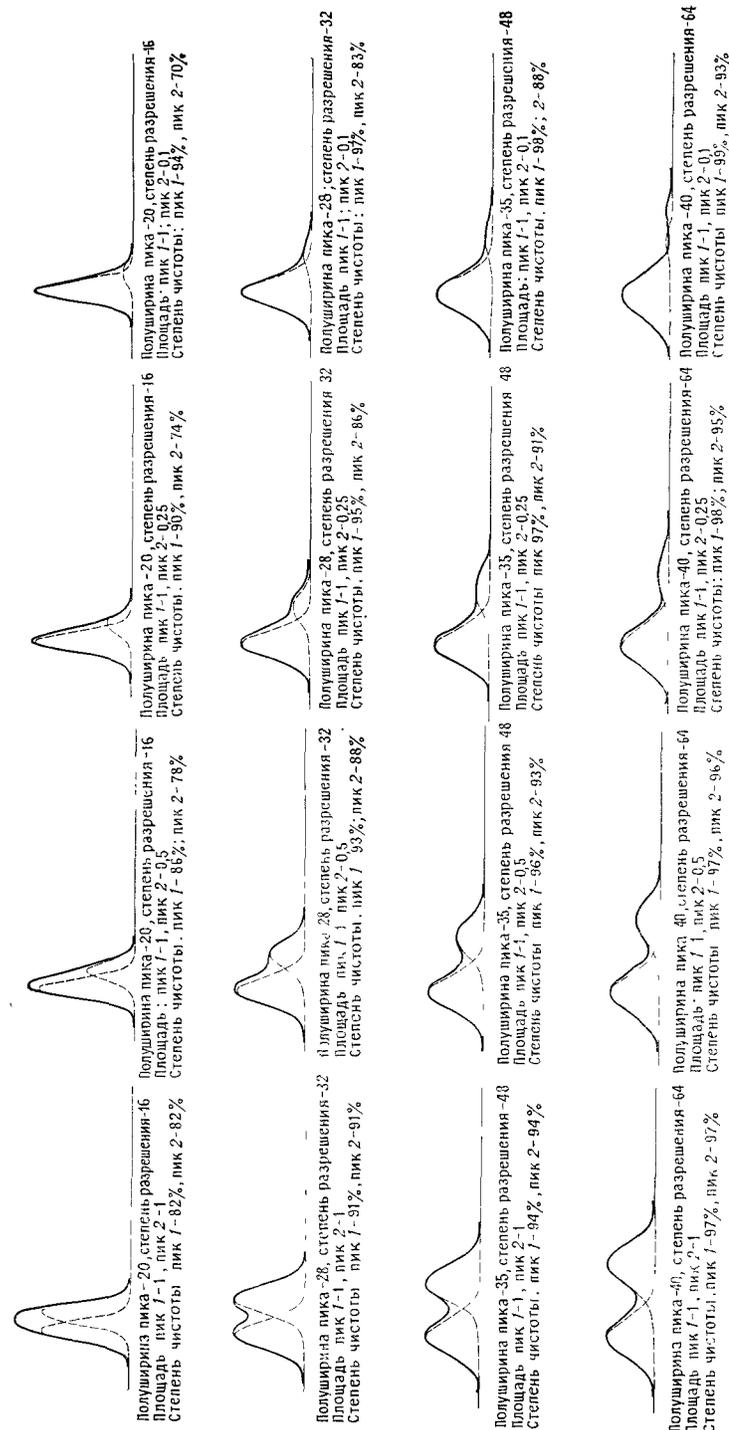


Рис. 5.1. Моделирование на ЭВМ разрешения пиков, получаемого при использовании одной, двух, трех и четырех идентичных колонок.

но, обеспечивает уровень чистоты 91%, а три колонки дадут степень чистоты 94%, что приемлемо для многих целей при полном синтезе. Как можно было ожидать, уровень чистоты основного компонента возрастает в случае, если в первоначальной смеси количества компонентов не равны; в то же время степень чистоты второго компонента снижается параллельно уменьшению его начальной концентрации.

Существует много факторов, сочетание которых ставит предел улучшению разрешения, достигаемому просто подключением дополнительных колонок. В добавление к очевидному росту стоимости, связанному с применением дополнительных колонок и количеств сорбента, увеличивается потребность в растворителях, а концентрация анализируемого вещества снижается, что осложняет выделение очищенных материалов. Критическим является тот факт, что давление, требуемое для поддержания заданной скорости потока, растет пропорционально числу добавляемых секций колонки; возможное увеличение давления ограничено пределом прочности материала колонки или системы создания давления. Обычно применяемое решение — это использование по возможности наиболее длинных колонок (или серии колонок) и разделение смеси на три фракции с удалением средней фракции или ее отбором для последующей хроматографической очистки. Эффект «вырезания» (отбора) высокочистых фракций из головной или хвостовой части пика проиллюстрирован рис. 5.2.

Три верхние хроматограммы демонстрируют результат разделения только на две фракции так, как это показано на рис. 5.1; в случае, представленном тремя нижними хроматограммами, участки отбора были выбраны так, чтобы получить степени чистоты соответствующего компонента в первой и третьей фракции на уровне 94, 96 и 98%. На рисунке также указаны степени извлечения компонентов в упомянутых «внешних» фракциях. Здесь можно также утверждать, что большинство химиков будет в значительной степени недооценивать или уровень чистоты, или степень извлечения, ожидаемые при таких условиях. В большинстве случаев для целей синтеза достаточно 96%-ная чистота; более того, многие из аналитических методов, обычно используемых химиками-синтетиками (например, протонный магнитный резонанс и ЯМР ^{13}C), не позволяют определить 4%-ное загрязнение по той причине, что примеси обычно имеют структуру, сходную со структурой целевых компонентов. Следует отметить, что в случае наименьшего разрешения получение самого высокого уровня чистоты (98%) сопровождается недопустимо низкой степенью извлечения (22%), тогда как при наилучшем разрешении можно извлечь 81% каждого компонента при той же чистоте.

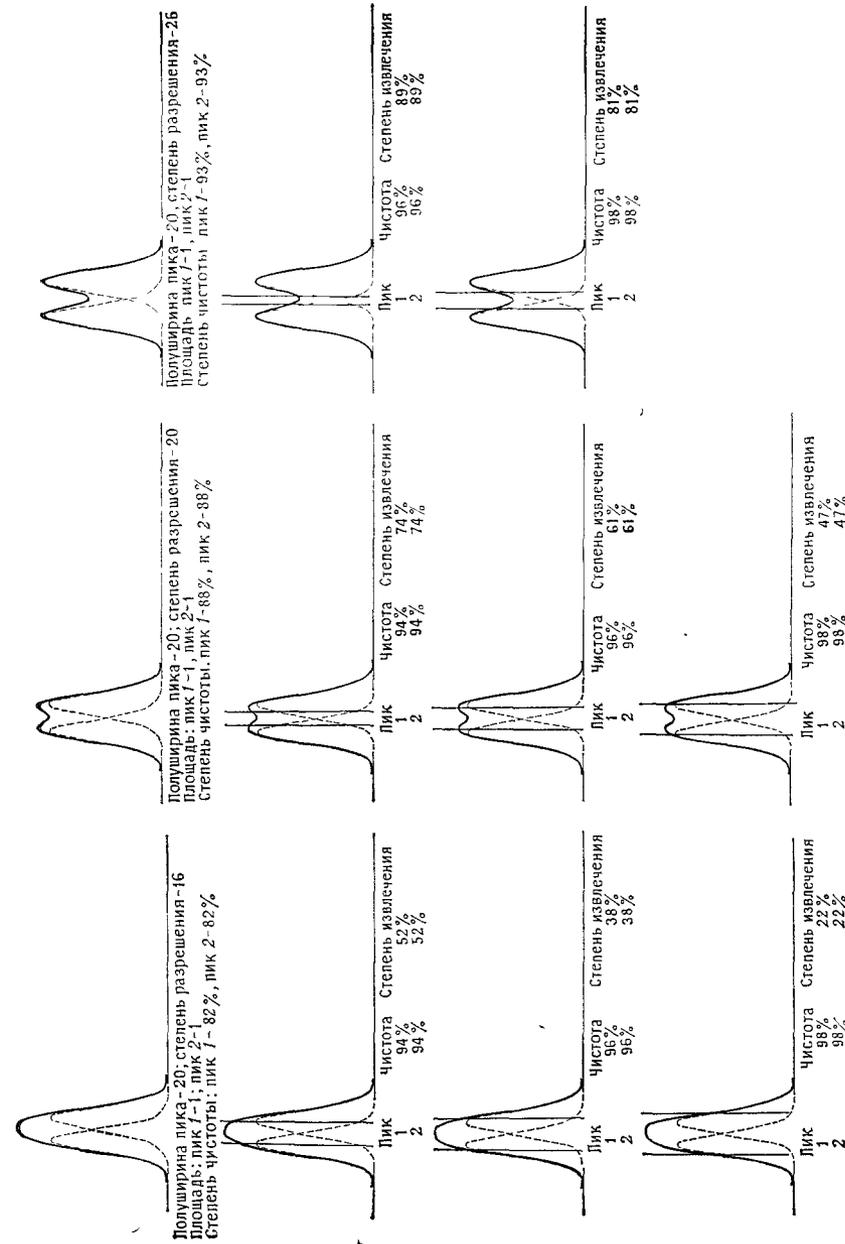


Рис. 5.2. Влияние отбора перекрывающихся пиков на степень чистоты отбираемых фракций. Соотношение компонентов в пике 1 : 1.

Моделирование, результаты которого представлены на рис. 5.2, было выполнено для смеси равных количеств двух близких веществ, т. е. для относительно редкой (и затруднительной) ситуации для химика-синтетика, затрачивающего много усилий на разработку схем управления ходом реакций с целью достижения желаемого выхода. Более типичные случаи представлены на рис. 5.3—5.5, где соотношения между компонентами составляют 2:1, 4:1 и 10:1.

Проводимый далее анализ применим к любому методу разделения, позволяющему проводить в реальном масштабе времени анализ потока, выходящего из колонки; синтетику, который хотел бы в полной мере воспользоваться возможностями современной техники хроматографического разделения, настоятельно рекомендуется тщательно изучить возможности разделения, получаемого при различных условиях моделирования (рис. 5.2—5.5). Отсутствие ясного понимания того, какая степень очистки может быть получена при любом перекрытии пиков компонентов, приводит к обычной ошибке в оценке чистоты пробы, а, как известно, завышенное значение по сравнению с требуемым уровнем чистоты в свою очередь приводит к низким степеням извлечения. Хотя средние фракции, получаемые в больших количествах и содержащие значительные количества обоих компонентов, могут быть подвергнуты повторному разделению, в большинстве случаев это вызывает значительные затруднения.

Во многих жидкостных хроматографах, выпускавшихся ранее в промышленных масштабах, подача растворителя под давлением осуществлялась или из сифона с помощью газа высокого давления (азота) из внешнего источника, или с помощью устройства, сходного с большим шприцем. В большинстве современных хроматографов используют возвратно-поступательные поршневые насосы, забирающие раствор из резервуара, находящегося при атмосферном давлении. Применение таких приборов дает уникальную возможность препаративного разделения, так как здесь несложно обеспечить рециркуляцию потока, выходящего из колонки, через насос вновь в колонку [5]. Процесс может быть повторен, причем при каждом последующем проходе увеличивается расстояние между пиками по сравнению с их шириной. Получаемый эффект идентичен тому, какой достигается при подключении дополнительных колонок числом, равным числу повторных циклов. Однако в данном случае ни стоимость колонок и сорбента, ни перепад давлений не возрастают при циркуляции. Необходимо отметить, что разрешение улучшается при циркуляции, только если объем смешения в головной части насоса, инжекторе и соединительных магистралях мал по сравнению с объемом растворителя, которым

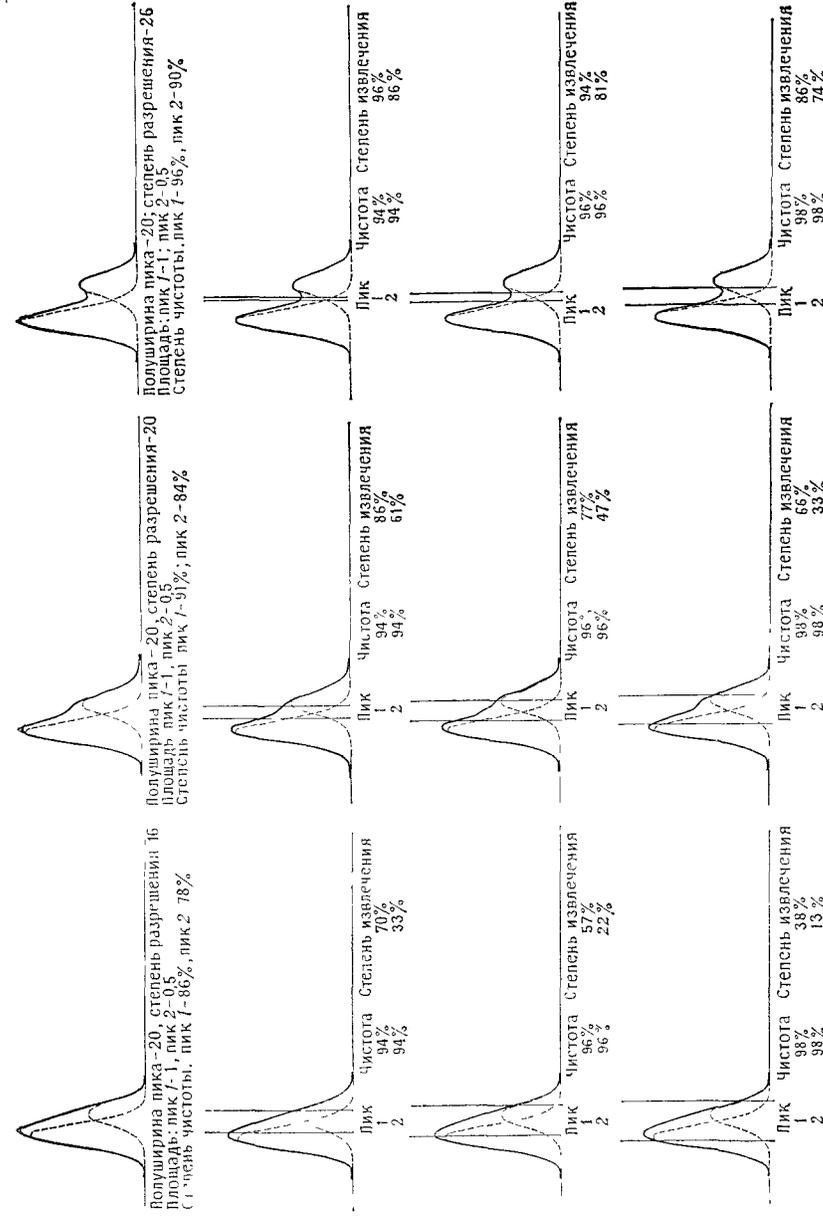


Рис. 5.3. Влияние отбора перекрывающихся пиков на степень чистоты отбираемых фракций. Соотношение компонентов в пиках 2:1.

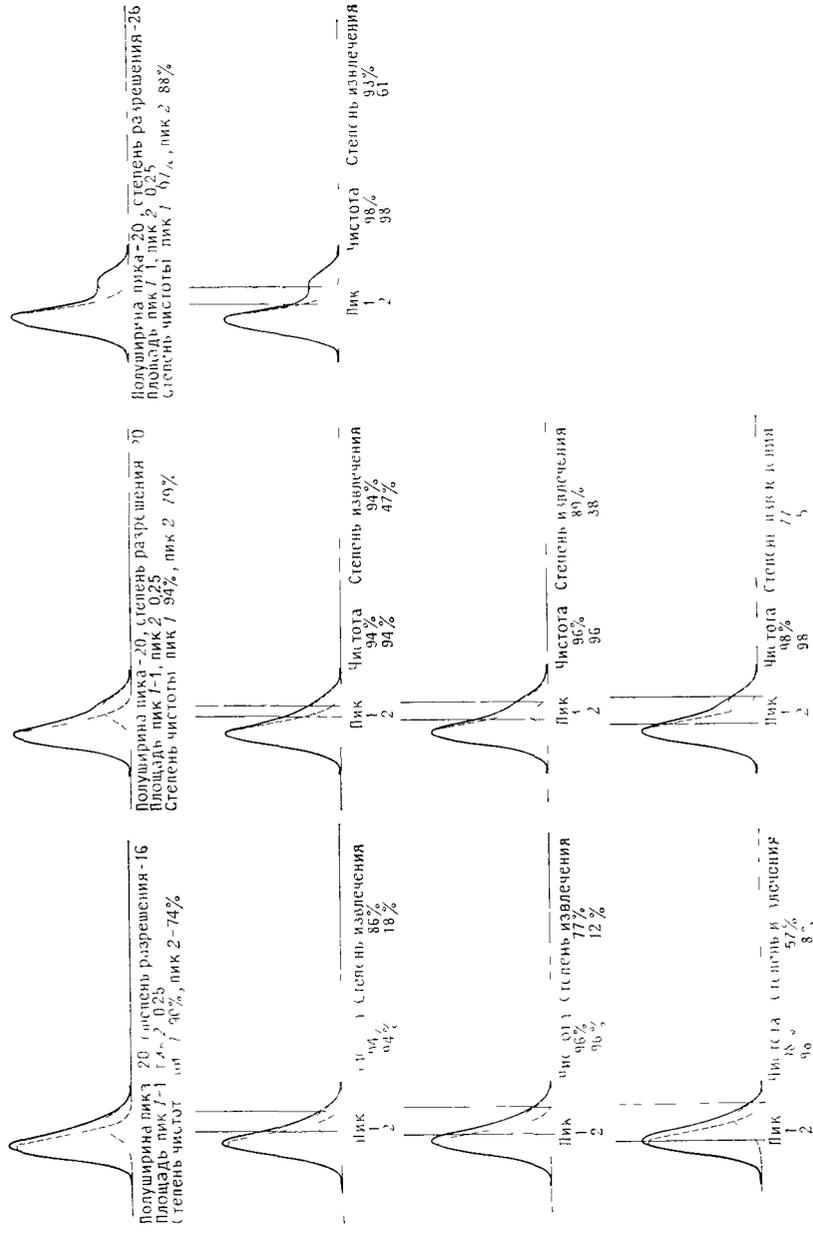


Рис. 5.4. Влияние отбора перекрывающихся пиков на степень чистоты отбираемых фракций. Соотношение компонентов в пиках 4 : 1.

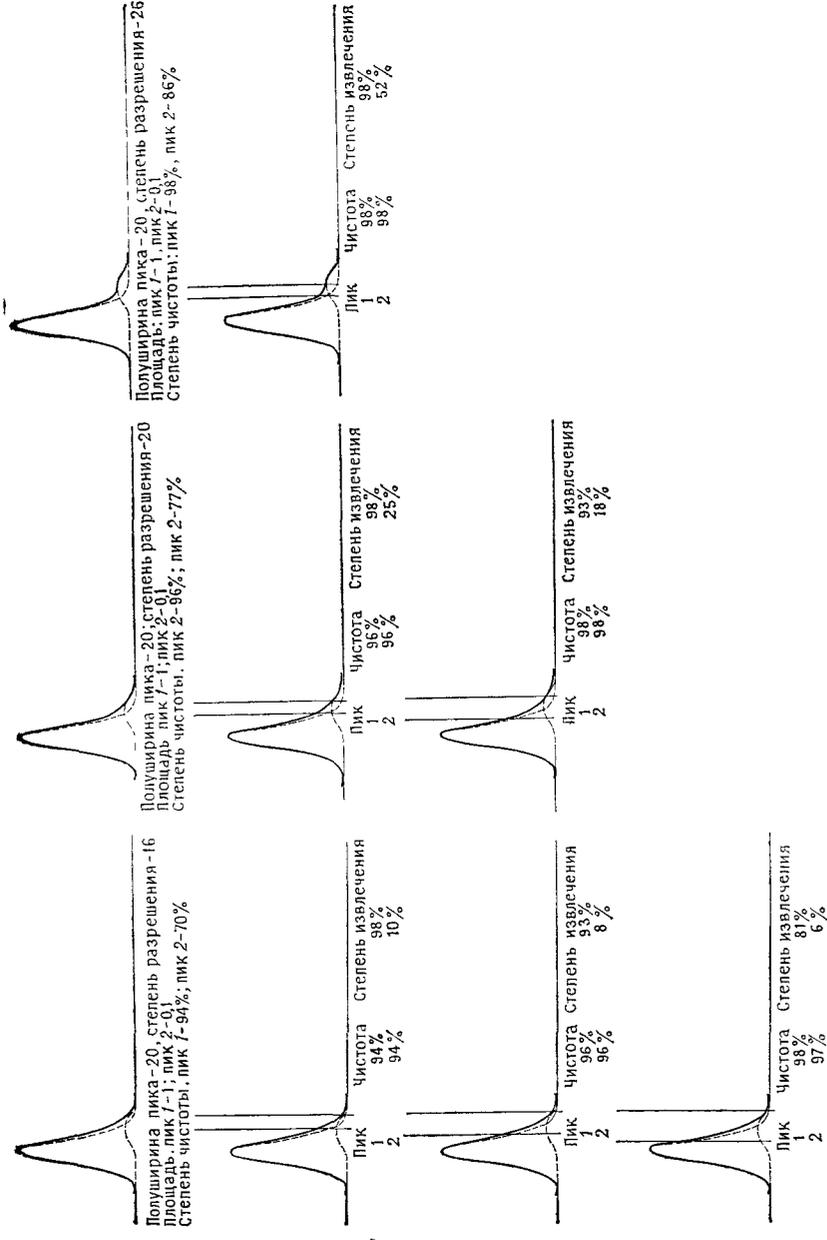


Рис. 5.5. Влияние отбора перекрывающихся пиков на степень чистоты отбираемых фракций. Соотношение компонентов в пиках 10 : 1.

элюируется пик. Размывание пика из-за наличия такого мертвого объема может часто быть лимитирующим фактором при применении циркуляции в аналитических колонках малого диаметра, но оно не имеет значения в системах большого объема, содержащих значительные количества вещества. (Подробное обсуждение циркуляции проведено в гл. 1.7.)

Имеется предел кратности (ре)циркуляции, обусловленный тем, что ширина пиков растет при каждом последующем проходе через колонку до тех пор, пока головная часть пика не перегонит хвостовую часть, что приводит к необратимому смещению медленно и быстро движущихся компонентов. Такая ситуация часто возникает даже при однократной рециркуляции проб большого объема, перегружающих емкость колонки. Проблема может быть решена простым путем. При каждом проходе отбирают, или «вырезают», как головную, так и хвостовую часть, и только слабо разделяемую среднюю фракцию, содержащую оба компонента, повторно пропускают через колонку. Даже если компоненты смеси разделяются плохо, отбор может привести к получению фракций, содержащих материал высокой чистоты, как показано на рис. 5.5. Такой процесс с отбором двух внешних фракций, содержащих компоненты высокой чистоты, и с циркуляцией плохо разделяемой средней фракции может быть повторен неоднократно до тех пор, пока не останется незначительное количество вещества в средней фракции или пока не исчерпается терпение оператора.

Рис. 5.6 иллюстрирует такой подход на примере разделения в четыре цикла смеси 4:1 с применением колонки, на которой степень разделения такая же, как в случаях наименьшей эффективности, показанных на рис. 5.5. Указанные на рисунке степени извлечения относятся только к одному циклу; характеристики полного извлечения очищаемого вещества представлены в табл. 5.1.

При четырехкратной циркуляции можно выделить в целом 95% основного компонента с чистотой 98%. Границы отбора фракций, содержащих второстепенный компонент, были выбраны так, чтобы избежать возможного перекрытия хвостовой части с пиком более подвижного материала, вместо того, чтобы стремиться максимизировать чистоту или степень его извлечения. Тем не менее смесь четырех фракций второстепенного компонента характеризуется 86%-ной чистотой и степенью извлечения 90%. Необходимо ясно представлять себе, что чем больше вещества удаляют при каждом отборе, тем лучше. Кроме того, рекомендуется тщательно изучить принципы выбора границ фракций, показанные на рис. 5.2—5.5.

На первый взгляд может показаться, что тот же суммарный эффект может быть достигнут путем применения более класси-

Таблица 5.1. Полная степень извлечения (%)

Число циклов	1	2	3	4
Компонент 1	52	80	92	95
Компонент 2	38	77	86	90

ческого подхода — отбора средней фракции с последующим концентрированием и отдельным хроматографическим разделением. Однако такой подход не позволяет использовать умеренное разделение компонентов, характерное для средней фракции. Сказанное может быть уяснено на примере более сложного случая разделения, изображенного на рис. 5.7, когда начальная смесь содержит равные количества обоих компонентов. Суммарные значения степени извлечения после каждого цикла даны в табл. 5.2. Видно, что можно получить по 92% каждого компонента чистотой 98% после четырех циклов.

Таблица 5.2. Полная степень извлечения (%)

Число циклов	1	2	3	4
Компонент 1	22	63	83	92
Компонент 2	22	63	83	92

Обращает на себя внимание тот факт, что при 90%-ной степени чистоты, получаемой после каждого цикла (рис. 5.7), степень извлечения возрастает от 22% (первое разделение) до 53, 55 и 59% после второго, третьего и четвертого циклов; тем самым недвусмысленно иллюстрируется улучшение разделения после двукратного прохода средней фракции через колонку.

В случае когда средняя фракция не отбирается непосредственно на циркуляцию, а подвергается концентрированию и отдельному хроматографическому разделению, при каждом проходе будет иметь место та же ситуация, как на первой хроматограмме рис. 5.7, т. е. степень извлечения каждого компонента составит 22%. Потребуется пропустить смесь через колонку одиннадцать раз, чтобы добиться такой же степени извлечения (92%) при уровне чистоты 98%, как при разделении за четыре цикла, изображенном на рис. 5.7.

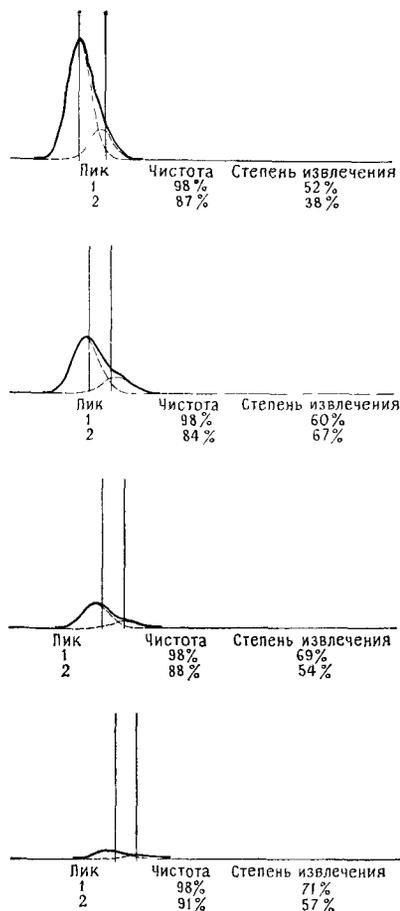


Рис. 5.6. Моделирование на ЭВМ разделения компонентов за четыре прохода через колонку. Соотношение компонентов в пиках 4 : 1.

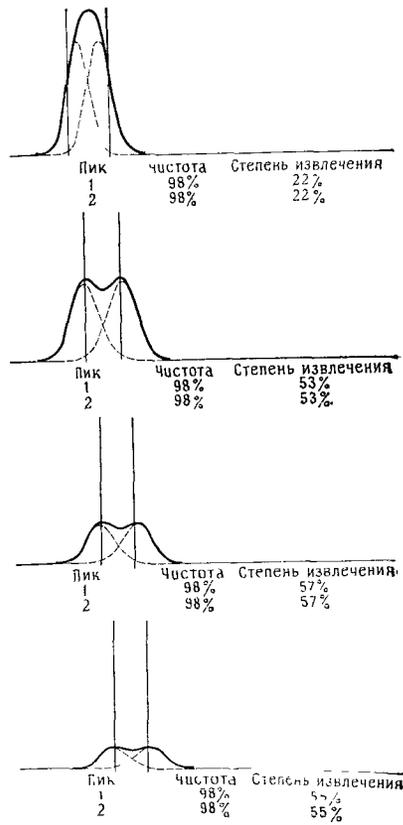


Рис. 5.7. Моделирование на ЭВМ разделения компонентов путем отбора фракций и повторного разделения фракции в зоне перекрытия пиков.

Очевидно, что 11-кратная циркуляция с достижением разумных значений степени чистоты и уровня извлечения оправдывается, только когда выделяемое соединение представляет значительную ценность; в большинстве же случаев такое разделение будет считаться слишком сложным, и даже не будут предприниматься попытки такого разделения. С другой стороны, экономия, присущая применению циркуляции с отбором фракций, более чем очевидна. Первостепенную важность имеет тот факт, что раствор расходуется только в том случае, когда идет сбор

компонента; при циркуляции поток, выходящий из колонки, используют повторно. Поскольку при многократной циркуляции может быть достигнут удовлетворительный уровень разделения даже при недостаточном разделении в каждом цикле, можно допустить более высокий уровень перегрузки, что позволит сэкономить на материале колонки и на растворителе.

Важно иметь в виду, что отбор части пиков осуществляют не для сбора материала, а для того, чтобы предотвратить происходящее в ходе циркуляции наложение головной части пика на хвостовую часть при размывании пиков. Именно многократная циркуляция позволяет добиться улучшенного разделения, обеспечивая тем самым практическую возможность крупномасштабного разделения трудновыделяемых веществ. Чем хуже разделяются вещества, тем меньше размывание при одном проходе и тем большее число повторных циклов можно провести до того, как потребуется отбор части пика.

5.3. Реальные системы

Проведенный выше анализ основывался на результатах моделирования на ЭВМ (рис. 5.1—5.7). Существует много факторов, приводящих к ухудшению показателей хроматографического разделения на практике, но наиболее важными являются те, какие вызывают асимметрию в размывании пиков. Негауссово распределение будет приводить к более высокой степени загрязнения и тем самым к более низким извлечениям за цикл при данной степени чистоты, особенно в тех случаях, когда выделяемый компонент движется медленнее. Тем не менее важность концепции циркуляции в сочетании с отбором части пика остается неизменной.

На рис. 5.8 и 5.9 показаны реальные хроматограммы, полученные на препаративном жидкостном хроматографе Ргер LC/System 500 фирмы Waters. Важно отметить, что критическим фактором здесь является не применяемая аппаратура, а использование концепции циркуляции с отбором пиков. Мы успешно следовали этой концепции при разделении в небольшом масштабе смеси на колонках размером 61 см × 9,5 мм с использованием системы подачи растворителя модели 6000А фирмы Waters (расход растворителя 9,9 мл/мин). На рис. 5.8 показано разделение примерно 35 г смеси 1 : 1 двух эимерных кетонов 1 и 2, использованных нами для синтеза иридоидных терпенов. Степень разделения на силикагеле с применением соответствующей смеси этилацетат — гексан такова, что данные компоненты не могут быть полностью разделены на пластинке для тонкослойной хроматографии размером 76 мм, давая хроматограмму, имеющую контур песочных часов.

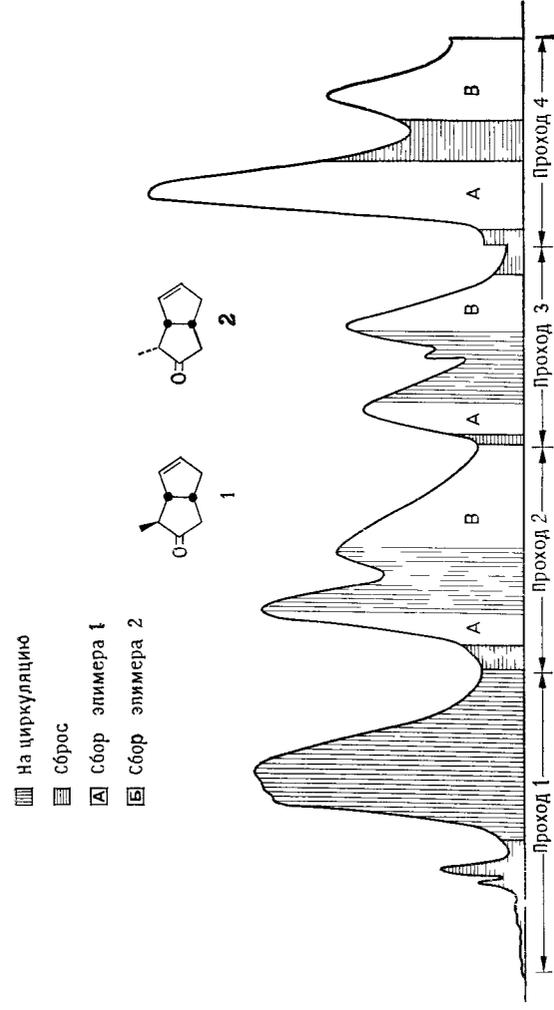


Рис 58 Препаративное разделение двух эпимерных кетонов. Разделению было подвергнуто 35 г смеси 1 I.

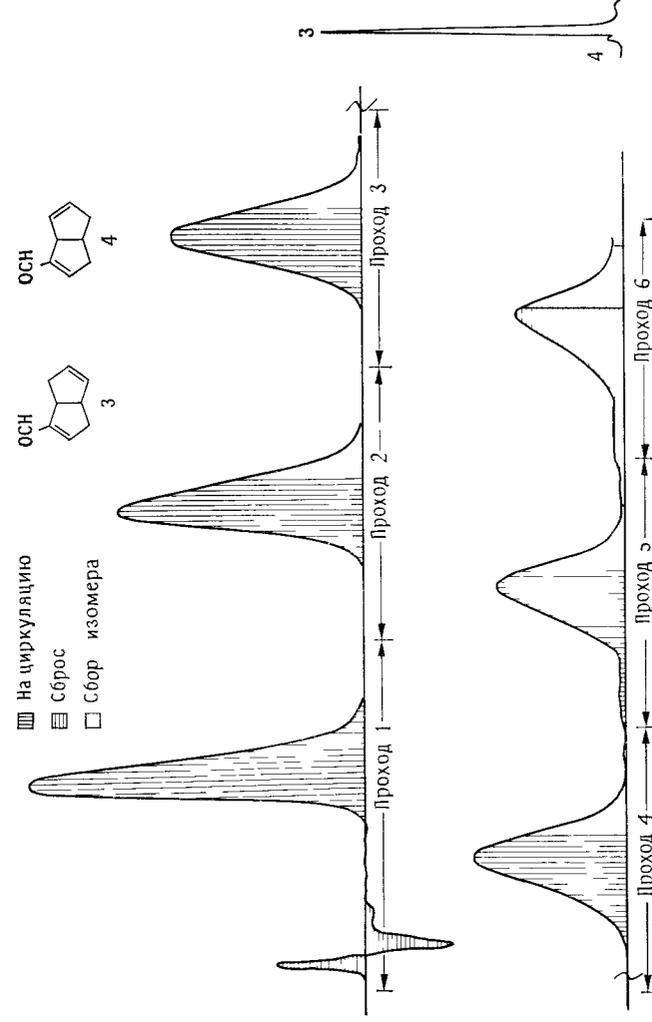


Рис. 59 Препаративное разделение эпимерных альдегидов. Масса смеси 7 г.

Элюент собирали при прохождении фронта растворителя до тех пор, пока не стала выходить разделяемая смесь (первый цикл); после этого всю пробу подвергали циркуляции. Можно наблюдать некоторое перекрывание хвостовой и головной частей между первым и вторым циклами, так как исходная нулевая линия не была восстановлена; в этом случае отбирали небольшую порцию смешанной фракции. Далее более подвижный компонент *экзо*-кетон, отбирали вплоть до вершины первого пика, среднюю порцию направляли на рециркуляцию, а *эндо*-кетон отбирали, начиная с вершины второго пика. Между вторым и третьим циклами опять отбирали смешанную фракцию, и процесс повторяли еще два раза. Сильные смещения кривой в ходе третьего цикла и в промежутке между третьим и четвертым циклами связаны с увеличением чувствительности детектора в эти моменты. Среднюю фракцию во время четвертого цикла не направляли на циркуляцию, а соединяли с другими смешанными фракциями. Следует отметить, что чувствительность детектора во время четвертого цикла была в пять раз выше, чем во время первого прохода, поэтому в последней смешанной фракции содержались относительно небольшие количества разделяемых веществ. В объединенных фракциях *эндо*- и *экзо*-кетонов (13,8 и 15,3 г соответственно) общая степень извлечения по каждому из них составила 83%. Анализ данных фракций методом жидкостной хроматографии показал, что каждая из них содержит соответствующий изомер по меньшей мере на уровне 99:1.

Рассмотренная схема разделения не только демонстрирует эффективность циркуляции, но и дает представление о том, к чему приводит чрезмерно осторожный отбор фракций. Перекрытие хвостовой части хроматограммы при первом проходе и головной части при втором проходе является непосредственным результатом недостаточного отделения смеси в головной части пика при первом проходе; если бы хвостовая часть пика была отобрана при первом проходе, то удалось бы избежать наложения пиков на границе между вторым и третьим циклами. Хотя при первом проходе не имеется внешних признаков разделения, часть вещества высокой чистоты могла бы быть удалена в это время. Тем не менее была достигнута весьма удовлетворительная степень извлечения вещества очень высокой чистоты за время эксперимента, составляющее 25 мин. В качестве альтернативы можно было бы прибегнуть к использованию менее полярной системы растворителей. Эффект снижения полярности раствора в такой системе, как этилацетат — гексан, по сути дела аналогичен эффекту, наблюдаемому при применении дополнительных колонок (рис. 5.1): если время удерживания пика возрастает вдвое, полуширина увеличивается в два раза.

Еще более сложный случай разделения представлен на рис. 5.9 (региоизомерные альдегиды 3 и 4). Структурное различие между изомерами незначительно, и в результате они плохо разделяются даже методом аналитической жидкостной хроматографии; при применении тонкослойной хроматографии разделение вообще не наблюдается. Проба массой примерно 7 г была несколько обогащена (2:1) целевым изомером 4. В связи с тем чтобы было необходимо выделить только хвостовую часть пика, ее и подвергали отбору. После шести циклов собрали 2,7 г изомера 4; остальные количества оставили для дальнейшего разделения. Степень чистоты выделенного материала была очень высокой (>98%), как видно из аналитической хроматограммы.

5.4. Практические вопросы

Для крупномасштабного разделения требуются большие количества растворителя независимо от применяемых методов и аппаратуры. В тех случаях когда индивидуальные компоненты растворителей устойчивы при хранении, вполне целесообразно регенерировать и повторно использовать смеси растворителей. Как побочные фракции, так и дистиллат, полученный при концентрировании целевых фракций, могут быть собраны вместе и подвергнуты перегонке с использованием короткой насадочной колонки. Газохроматографический анализ смеси обеспечивает более чем достаточную точность просто путем сравнения соотношений высот пиков с градуировочным графиком, полученным анализом стандартных смесей. Если перед перегонкой собирать весь регенерированный растворитель независимо от соотношения компонентов, то состав в дистиллате будет стремиться к среднему соотношению между компонентами, редко соответствующему требуемому составу. Поэтому понадобятся большие количества более или менее полярного растворителя для доведения состава до требуемого уровня. В результате количество регенерированного растворителя растёт быстрее, чем объем потерь при разделении. Усовершенствованная система работы предусматривает разделение регенерируемого растворителя на две или лучше три категории, такие, как растворитель с соотношением компонентов менее чем 5:1, растворитель с соотношением компонентов между 5:1 и 10:1 и растворитель с соотношением больше чем 10:1. Тогда можно часто иметь определенные количества регенерированного растворителя, состав которых достаточно близок к желаемому соотношению, и в итоге регулирования состава не потребуется.

Крупномасштабное хроматографическое разделение требует также соответственно больших количеств силикагеля. Экономически обоснованное разделение предусматривает также повтор-

ное использование неподвижной фазы. Это не вызывает проблем, если все материалы, вводимые в колонку, удаляют после каждого разделения. При этом возникает необходимость предварительной очистки проб для удаления очень полярных примесей, которые в противном случае могут концентрироваться в начале колонки, приводя к быстрому росту гидравлического сопротивления до недопустимых уровней. Предварительную очистку легко провести путем простой «фильтрации» пробы в короткой стеклянной колонке, набитой силикагелем с применением той же системы растворителя, которая будет далее применена в тщательном хроматографическом разделении. Силикагель для начального, черногого разделения не обязательно должен быть высокого качества, но ускорять данную стадию, например прокачиванием растворителя через колонку, не следует. После каждого разделения требуется промывать колонку более полярным растворителем в количестве, равном по меньшей мере двум объемам колонки; растворитель можно отогнать и вновь использовать для той же цели. Описанная очистка колонки позволяет уменьшить возможность перекрестного загрязнения последующей пробы предыдущей.

Литература

1. Still W. C., Kahn M., Mitra A., J. Org. Chem., 43 (1978) 2923.
2. Loev B., Snader K. M., Chem. Ind. (London), 15, 1965.
3. Loev B., Goodman M. M., Chem. Ind. (London), 2026, 1967.
4. Snyder L. R., Kirkland J. J., Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, Second Edition, New York, p. 178, 1979.
5. Conroe K., Chromatographia, 8 (1975) 119.

6

Применение препаративной жидкостной хроматографии в биохимии

У. Хэнкок, Р. Престидж

6.1. Введение

Часто возникает необходимость получения больших количеств какого-либо биохимического компонента, очищенного до однородного состава, для дальнейших биологических или химических исследований. Во многих случаях для этих целей выбирают препаративную жидкостную хроматографию (ЖХ). Так, например, при определении последовательности пептидов в белке ЖХ оказала заметное воздействие на все стадии соответствующей процедуры. В выпущенном недавно обзоре Бауна и Беннетта [1] описано применение ситовой (гель-фильтрационной) хроматографии при выделении образца чистого белка и крупных фрагментов белка после частичного расщепления полипептидной цепи. Обращенно-фазное разделение оказалось особенно подходящим для выделения миллиграммовых количеств чистых пептидов из сложных смесей, образующихся при расщеплении белка протеазами, таким, как трипсин и химотрипсин. Обращенно-фазная ЖХ оказалась также весьма удобным методом получения таких белков, как антигены клеточной поверхности, гормоны и другие растворимые белки, синтезируемые лишь в очень малых количествах в биологических системах. Некоторые методы анализа, например радиоиммунный метод, могут не обладать полной специфичностью по отношению к конкретному пептиду или белку, в результате чего получаемые результаты часто подтверждают методом препаративной ЖХ с последующим применением специфической хроматографической методики [2]. Применение препаративной ЖХ в биохимии уже утвердилось и продолжает расширяться.

В связи с изложенным настоящим обзор охватывает препаративное разделение образцов аминокислот, пептидов и белков. Сложная ионная структура таких образцов обуславливает потенциальные трудности в применении классических методов разделения для разделения биохимических смесей. Начальные результаты, полученные при препаративном разделении других биохимических систем, таких, как липиды, углеводы и нуклеиновые кислоты, дают основания считать, что многие методы, используемые при разделении полипептидов, могут иметь общее применение. Последний раздел настоящего обзора посвящен препаративному разделению перечисленных классов соединений.

6.2. Общие требования к разделению аминокислот и полипептидов

Многие из трудностей, с которыми исследователи сталкивались ранее в попытке разделить полипептиды методом ЖХ, обусловлены отличиями в хроматографических свойствах таких сложных образцов по сравнению с характеристиками традиционного разделения низкомолекулярных образцов. Иными словами, разделение образцов полипептидов требует особого внимания к природе неподвижной и подвижной фаз и к выбору соответствующей аппаратуры.

6.2.1. Природа неподвижной фазы

Особенности колонки с обращенной фазой — это зачастую важный фактор разделения образцов аминокислот или полипептидов. Существует ряд свойств колонок с обращенной фазой, которые могут оказывать сильное влияние на разделение образца и, что особенно важно в препаративных целях, на извлечение компонента после разделения. Такие показатели, как, например, размер пор, природа обращенной фазы (химические функциональные группы и природа связи с частицей силикагеля), степень заполнения фазой (мкмоль/м^2), удельная поверхность сорбента и размер частиц, имеют, как было обнаружено, большое значение [3]. По-видимому, наиболее важным фактором, определяющим характер разделения полипептидов, является природа силикагеля, используемого в приготовлении обращенной фазы. В последнем обзоре по разделению белков [4] отмечалось, что такие кремнеземы, как резоль и вайдак, являются хорошими исходными материалами для приготовления колонок с обращенной фазой C_{18} , предназначенных для разделения пептидов и белков. Различия, имеющиеся между этими и другими кремнеземами, могут быть частично связаны с небольшими изменениями в физической структуре или в уровнях следовых загрязнений (например, ионами металлов). В настоящее время наши знания о поверхностных свойствах кремнеземов, позволяющих иметь высококачественные обращенно-фазные сорбенты очень ограничен и выбор колонки для конкретного разделения является почти полностью эмпирическим.

Мелкодисперсный кремнезем — это гетерогенная поверхность с силанольными группами, различающимися по своей доступности и кислотности; pK_a составляет 5—6 [5]. Наличие внутримолекулярных водородных связей является, по-видимому, причиной вариации pK_a . В адсорбционной хроматографии более реакционноспособные силанольные группы подвергаются дезактивации при обработке кремнезема полярными растворителями,

такими, как вода и метанол [6]. Мы обнаружили, что важную роль как в препаративном, так и в аналитическом разделении играет выбор сорбента, позволяющего проводить разделение с высокой селективностью и при больших нагрузках по образцу. Вероятно, что эффективное взаимодействие с силанольными группами играет существенную роль в обеспечении требуемых свойств данного обращенно-фазного сорбента. Так, например, при разделении очень сложных пептидных карт было обнаружено, что носитель с обращенной фазой, характеризующийся одновременно с этими полярными взаимодействиями (ионные и водородные связи), позволяет добиться высокой степени разделения смеси [7]. Было показано, что данной системе присущ смешанный характер взаимодействия; в общем случае смешанное взаимодействие между образцом и неподвижной фазой позволяет достичь наиболее эффективного разделения полипептидов.

6.2.2. Природа подвижной фазы

Добавление солей к подвижной фазе также служит важным приемом, позволяющим свести к минимуму взаимодействие между силанольными группами колонки и ионными группами, присутствующими в растворяемом веществе. Соль может действовать просто как электролитная добавка, подавляющая ионные взаимодействия, или в ряде случаев как агент, вызывающий более специфическое взаимодействие [8]. В последнее время широкое распространение нашли аминфосфатные буферы при ЖХ-разделении аминокислот, пептидов и белков [9]. Часть успеха в применении таких буферов можно отнести на счет дезактивации силанольных групп путем осуществления взаимодействий, ведущих к образованию ионных и (или) водородных связей с аминами, добавленными к подвижной фазе. Хотя подвижная фаза, содержащая 0,1% H_3PO_4 , была достаточна для хроматографического выделения пептида Gly-Gly-Tyr, для выделения других пептидов, таких, как Gly-Leu-Tyr, требовалась подвижная фаза, содержащая аминфосфат, например триэтиламмонийфосфат (ТЭАФ). Более того, аргинин в пептиде является дополнительным сильноосновным звеном из-за наличия гуанидиновой боковой цепи. Неудивительно поэтому, что пептиды Met-Arg-Phe и Leu-Tyr-Met-Arg имеют плохую форму пиков при разделении в колонках с обращенной фазой даже в присутствии 1% ТЭАФ в подвижной фазе (рис. 6.1, б и в). В то же время замена ацетонитрила на изопропанол как органический модификатор приводит к значительно улучшению профиля элюирования этих основных пептидов (рис. 6.1, а и в). Метанол при использовании вместо ацетонитрила не обладает таким

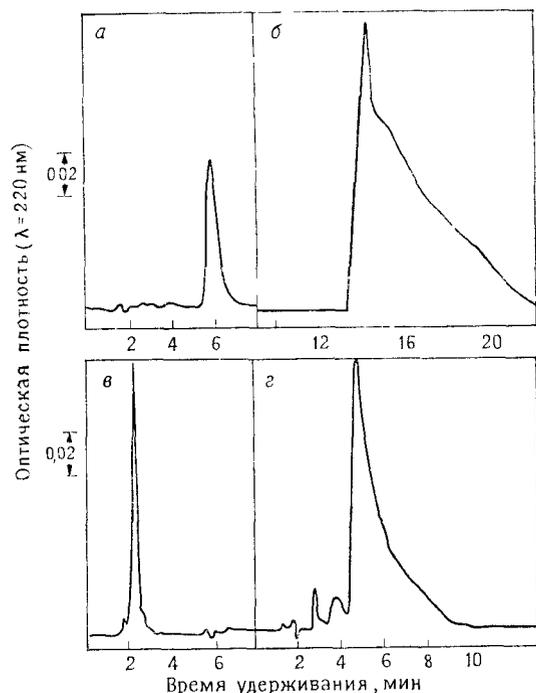


Рис. 6.1. Хроматографический анализ пептидов Leu-Trp-Met-Arg (а и б) и Met-Arg-Phe (в и г) на колонке рэдиал-пак-ризол- C_{18} . Колонка была подвергнута предварительной промывке метанолом. Каждый анализ выполняли с 50 мкг подвижной фазы. Чувствительность по оптической плотности была увеличена вдвое в случаях б и г, что позволило получать более широкие пики. Скорость потока составляла 2 мл/мин. В случаях а и в подвижная фаза содержала 1%-ный триэтилammонийфосфат (ТЭАФ) и изопропанол (80 : 20), а в случаях б и г — 1%-ный ТЭАФ и ацетонитрил (80 : 20) [7].

эффектом. Вероятно, этот факт можно объяснить тем обстоятельством, что изопропанол, обладая крупным неполярным участком, особенно легко проникает в носитель обращенной фазы и тем самым дополнительно дезактивирует силанольные группы путем образования водородной связи [3]. Люис и Девальд [10] обнаружили, что *n*-пропанол также является отличным растворителем для разделения полипептидов.

На основании данных, представленных на рис. 6.1, можно полагать, что подвижная фаза, содержащая изопропанол и ТЭАФ в относительно высокой концентрации, будет особенно пригодна для хроматографического разделения основных гидрофобных образцов. Такой вывод подкрепляется результатами разделения сложных смесей белков, представленными ниже.

Аполипротеины, получаемые удалением липидных компонентов липопротеинов, чрезвычайно чувствительны к адсорбции на стеклянных поверхностях [11]. В попытке разработать метод определения С-аполипротеинов (компонентов липопротеинов весьма малой плотности) было предпринято изократическое разделение смеси аполипротеинов С-I, С-II и С-III и на колонке с адсорбентом μ -бондапак C_{18} (рис. 6.2). Было высказано предположение, что это разделение идет по нормально-фазному, а не по обращенно-фазному механизму, так как наблюдения показали, что снижение концентрации ацетонитрила в подвижной фазе вызвало сокращение времени удерживания в противоположность тому, что происходит при разделении в обращенной фазе. Порядок элюирования апоС-III₁ и апоС-I также соответствует характеру взаимодействия основных остатков белков с кислотными силанольными группами сорбента [11]. Не удивительно поэтому, что при таком разделении были получены низкие степени извлечения (20—50%). Если подвижную фазу модифицировать добавлением 1% ТЭАФ вместо 0,1% H_3PO_4 и заменить ацетонитрил изопропанолом, то получается разделение С-аполипротеинов, изображенное на рис. 6.3. При таком разделении порядок элюирования соответствует тому, который должен был бы ожидать в случае обращенно-фазной, а не нормально-фазной хроматографии. Были получены высокие степени извлечения (более 80% по каждому компоненту). В этом случае ионная сила раствора должна была быть высокой, поскольку снижение концентрации ТЭАФ от 1 до 0,1% привело к двукратному уменьшению степени извлечения апопротеинов, а также к искажению формы пиков (возникновение длинной хвостовой части) [11]. Эти результаты указывают на наличие смешанного механизма разделения образца полипептидов в жидкостной обращенно-фазной хроматографии, и, как будет показано далее, они явились основанием для разработки способов препаративного разделения таких белков в больших количествах.

Как бы ни были выгодны свойства aminoфосфатов при высокоэффективном разделении образцов полипептидов, использование нелетучих подвижных фаз в препаративном разделении будет ограниченным, так как после разделения фракции должны быть подвергнуты процедуре обессоливания. На практике обнаружено, что многие полипептиды имеют значительное сродство к указанным aminoфосфатам, из-за чего полное отделение ионного модификатора может оказаться весьма сложным. Препаративное разделение таких образцов стало практически возможным с момента внедрения летучих подвижных фаз (табл. 6.1). Однако следует помнить, что неaminoфосфатные добавки, вводимые в подвижную фазу в качестве агентов, снижающих интенсивность взаимодействий силанол — растворенное веществ-

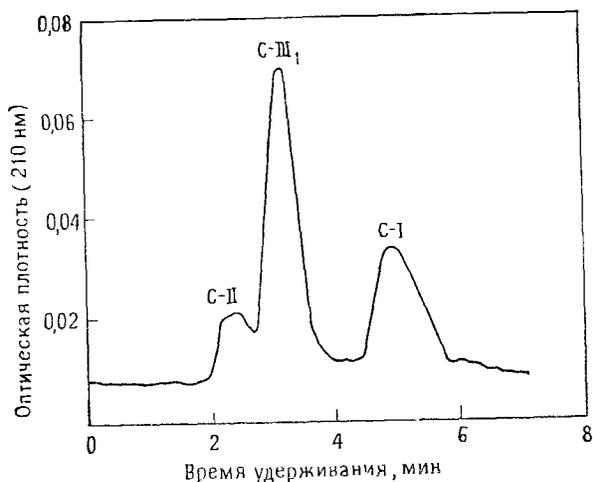


Рис. 6.2. Хроматографический профиль, полученный при изократическом элюировании аполипопротеинов С-I, С-II, С-III на колонке μ-бондапак-C18; подвижная фаза содержала 0,1%-ную фосфорную кислоту, рН 2,0 и ацетонитрил (40 : 60). Скорость потока: 1,5 мл/мин [11].

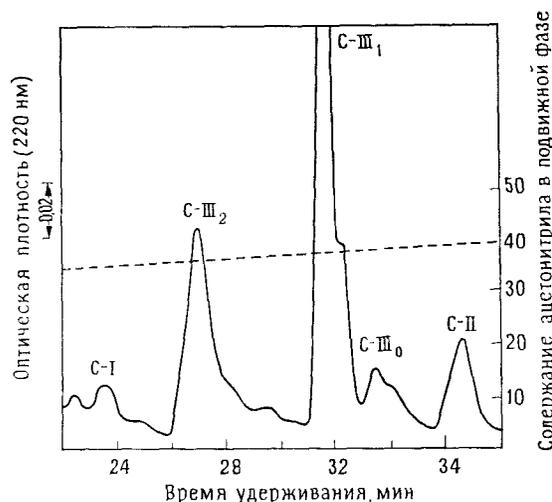


Рис. 6.3. Хроматограмма неочищенной смеси С-аполипопротеинов (100 мкг), полученная на колонке μ-бондапак с фенольными группами; подвижная фаза — 1%-ный ТЭАФ. Скорость потока: 1,5 мл/мин. При элюировании использовали 10-мин вогнутый градиент 0—37% ацетонитрила (номер 2 на программирующем устройстве Waters-660 и 20-мин выпуклый градиент 37—42% ацетонитрила (номер 8) [11].

Таблица 6.1. Ионные модификаторы, обычно вводимые в летучую подвижную фазу в препаративной высокоэффективной ЖХ белков

Бикарбонат аммония (0,02—0,1 М, рН 8,0)
 Трифтороуксусная кислота (0,1%)
 Бикарбонат аммония (0,1%)
 Ацетат аммония (0,01—0,05 М, рН 4,0)
 Триэтиламмонийформат (0,04 М, рН 3,15)
 Пиридинформат-ацетат (0,5—2 М, рН 3,5—5,0)

Таблица 6.2. Органические модификаторы, используемые при разделении образцов аминокислот и полипептидов (в скобках приведены обычно встречающиеся примеси)

Метанол (ацетон, уксусная кислота)
 Этанол (ацетон, ацетальдегид, этилацетат, бензол)
 Изопропанол, пропанол (ацетон, пропанол)
 Диоксан и тетрагидрофуран (пероксиды)
 Ацетонитрил (ароматические соединения)

во, могут оказаться не столь эффективными, как аминокислоты. В табл. 6.1 обобщены сведения по эффективности различных подвижных фаз, хотя возможны некоторые изменения для растворенных веществ с различной чувствительностью по отношению к силанольным группам.

6.2.3. Природа органического модификатора

В табл. 6.2 дан перечень органических модификаторов, обычно используемых при разделении аминокислот и полипептидов. Во многих аналитических процедурах хроматографические характеристики и прозрачность ацетонитрила в ультрафиолетовой области делают его незаменимыми. Однако в препаративном разделении часто предпочитают метанол, поскольку он менее токсичен и менее дорог, чем ацетонитрил, а разделение в такой среде проходит почти так же хорошо, как и в ацетонитриле, особенно в случае аминокислот и пептидов.

При разделении образцов белков требование летучести растворителя не является столь уж важным, ибо многие белки неустойчивы при применении процедур испарения растворителя. Отсюда следует возможность использования группы растворителей, способствующих хорошему разделению, но обладающих меньшей летучестью, например пропанола, этиленгликоля и 2-метоксиэтанола. Эти растворители могут быть удалены лио-

филизацией, диализом или фильтрованием сквозь пустотелые волокна, но они не обладают особой токсичностью, и во многих случаях их можно не удалять.

6.2.4. Некоторые комментарии о препаративном разделении

Различие между аналитическим и препаративным разделением является по своей сути концептуальным. Если исследователь намеревается получить очищенный образец для дальнейшего изучения, то соответствующий метод можно назвать препаративным, независимо от массы очищенного образца — килограммы или микрограммы. В случае некоторых гормонов белковой природы, например, интерферона, выделение нескольких микрограммов очищенного белка обеспечит достаточное количество материала для многочисленных клинических экспериментов, и в этом смысле может называться препаративным. Проблемы емкости колонки, удаления растворителя и оценки степени чистоты продукта присущи препаративной хроматографии всех масштабов.

В то же время при разделении образцов массой более 1 г или около того возникает новый класс проблем. Вследствие того, что производительность хроматографического оборудования становится лимитирующим фактором, все большую важность приобретают вопросы оптимизации разделения в смысле количества вводимого образца, разрешения пиков и использования растворителя и времени. При таком масштабе разделения очевидным становится сходство между препаративной хроматографией и методами химической технологии.

На рис. 6.4 даны сведения о размерах обычно применяемых колонок и о рекомендуемых количествах вводимых полипептидов.

6.3. Препаративное разделение аминокислот и пептидов

Высокоэффективную жидкостную хроматографию использовали в весьма ограниченной степени в препаративном разделении аминокислот. Грант и Клифф [12] сообщили об отделении статина (редкой аминокислоты, обнаруживаемой в пепстатине) от аланина и валина в системе, содержащей 0,1% H_3PO_4 и MeOH, на препаративной колонке с обращенной фазой.

Уошборн и сотр. [13] недавно разделили рацемат [1- ^{14}C]-валина, пользуясь хиральной подвижной фазой. В состав подвижной фазы входили L-пролин, ацетат меди(II) и ацетат натрия; при применении такой подвижной фазы разделение D- и L-

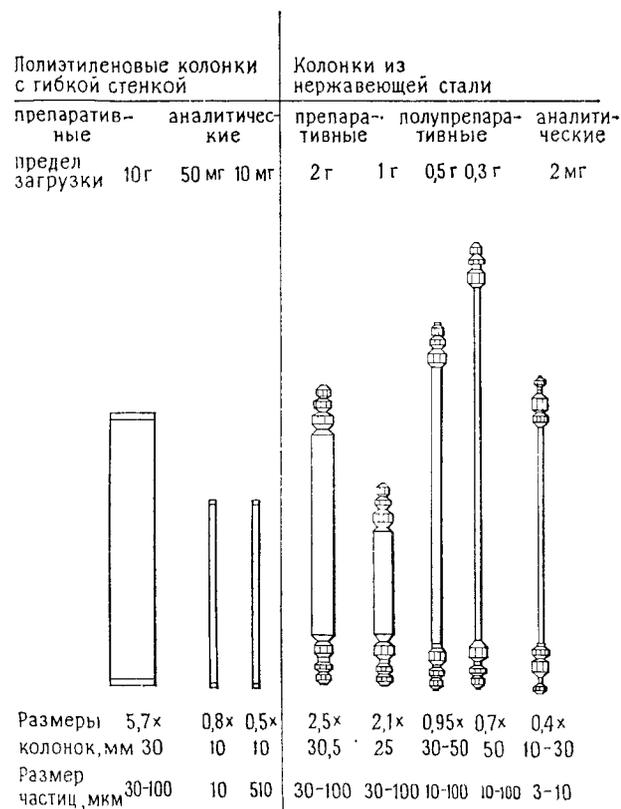


Рис. 6.4. Диаграмма размеров колонок, обычно применяемых для аналитического и препаративного разделения аминокислот, пептидов и белков. Полиэтиленовые колонки обладают гибкостью, что позволяет применять радиальное сжатие колонок как полезный прием при разделении указанных веществ (подробности см. в [7]). Указанные пределы загрузки даны с запасом и могут быть превзойдены в благоприятных условиях.

валина в колонке с обращенной фазой проходило почти до нулевой линии. Хотя за один проход было очищено лишь 4 мг L-[1- ^{14}C]-валина, наличие весьма высокой удельной активности этого материала (2 Ки/ммоль) означает, что таким способом можно приготовить несколько клинических доз всего за 50 мин. Такая изыщная процедура, впервые примененная Гил-авем и сотр. [14], должна найти широкое применение в будущем в синтезе пептидов.

Петржик и Стодола [15] разделили аддукты малонового диальдегида и нескольких аминокислот на колонке с амберли-

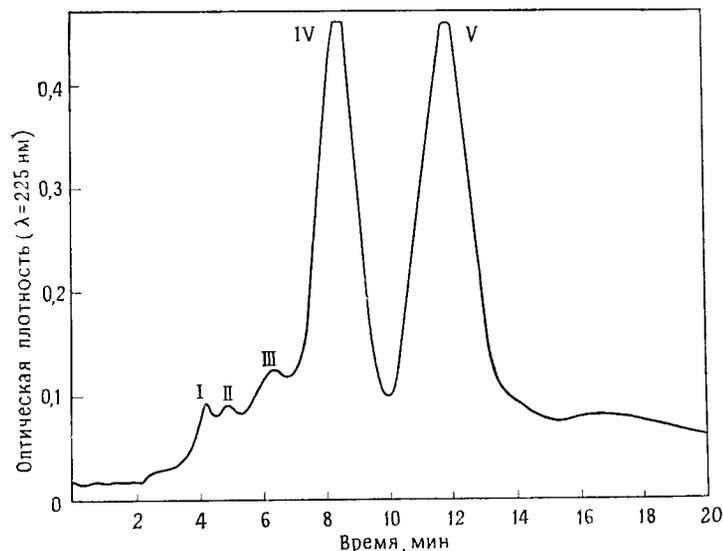


Рис. 6.5. Препаративное разделение неочищенного *O*-бензильного эфира лейцин-энкефалинамида (V) и дебензилированного продукта (IV) на колонке, содержащей фенилпорасил-В (0,7×60 см); подвижная фаза: 30%-ный ацетонитрил — вода — 0,1%-ная фосфорная кислота. Количество введенного материала: 4 мг; скорость потока: 2 мл/мин [23].

том XAD-4. Авторам удалось выделить по несколько сот миллиграммов очищенных соединений с хорошим выходом.

Широкое применение препаративная обращенно-фазная ЖХ нашла при разделении синтетических пептидов, полученных твердофазным методом [16]. На рис. 6.5 изображено препаративное выделение синтетического пептида лейцин-энкефалинамида на колонке с сорбентом фенилпорасил В. Пик IV принадлежит определяемому пептиду, а пик V — побочному продукту, образовавшемуся в результате каталитического гидрирования соответствующего пептида, защищенного *O*-бензильной группировкой. Аминокислотный анализ и аналитическое ЖХ-определение показали, что очищенный пептид обладает однородным составом. Рисунок подчеркивает преимущество обращенно-фазной ЖХ как метода очистки синтетических пептидов, так как метод характеризуется высокой скоростью и хорошей степенью разделения.

Рис. 6.6 показывает выделение синтетического пентадекапептида на колонке C_{18} с подвижной фазой, содержащей триэтиламмонийфосфат [7]. В этом случае могут быть выделены приемлемые количества пептида на аналитической колонке; на практике на такой колонке разделили около 50 мг неочищенных

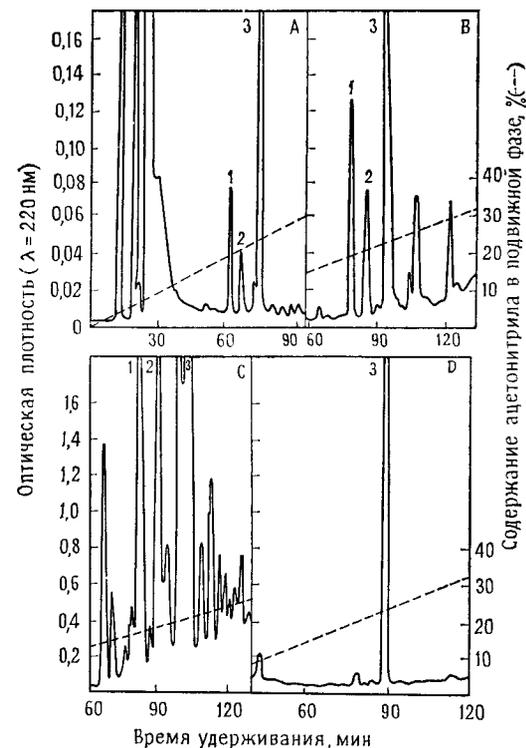


Рис. 6.6. Очистка синтетического аналога 1—15 сегментов человеческого аполипопротеина С-1, в котором Phe-14 заменен *n*-идофенилаланином на стадии химического синтеза. Подвижная фаза представляла собой очищенный ТЭАФ с линейным градиентом ацетонитрила. Скорость потока: 1,5 мл/мин. Нагрузки от А к С были 0,5, 8 и 2 мг неочищенного пептида, растворенного в 1%-ном ТЭАФ в 3М гидрохлориде гуанина при концентрации 10 мг/мл. Пик 3 — выделяемый пептид; эти фракции из каждого опыта объединяли. Анализ аликвоты объединенной фракции показан на Д [7].

синтетических пептидов. Основным недостатком использованной здесь подвижной фазы является то, что триэтиламмонийфосфат нелетуч. Это приводит к необходимости прибегать к стадии удаления соли с целью получения пептида в бессолевой форме. Спэрроу очищал синтетические пептиды (в количествах от 5 до 20 г) на препаративных картриджах с фазой C_{18} , применяемых в препаративной ЖХ-системе 500 фирмы «Вотерс». Подвижная фаза содержала 1% триэтиламмонийфосфата и имела рН 3,0; был использован градиент изопропанола [17]. Очищенный пептид собирали, рН раствора доводили до 8,0 добавлением гидроксида аммония, изопропанол частично удаляли вакуумной обра-

боткой, и водный буферный раствор подвергали лиофилизации. В данной работе очистке подвергали все пептиды вплоть до пентапептидов с выходом, превышающим 90%.

Защищенные синтетические пептиды можно очищать с помощью обращенно-фазной хроматографии [18] или на колонках, предварительно заполненных кремнеземом [19, 20]. Рис. 6.7 описывает очистку синтетического пентапептида Ac-Ser-Thr-Phe-Glu(OBz-*n*-NO₂)-Arg(NO₂)OH. Здесь, когда очищаемый пептид не содержит свободных аминогрупп, нет необходимости добавлять ионный модификатор для подавления взаимодействий между поверхностью сорбента и пептидом. Для подавления ионизации концевой карбоксильной группы использовали уксусную кислоту, что повысило полярность пептида и усилило удерживание. Из рис. 6.7, *a* видно, что начальные попытки очистки путем хроматографического выделения на сефадексе LH-20 дали неудовлетворительные результаты, в том числе с точки зрения скорости. Выходящие из колонки порции собирали (заштрихованный участок на рис. 6.7, *a*) и подвергали анализу при помощи обращенно-фазной хроматографии (рис. 6.7, *б*). В этом случае разделение проходило быстро, завершаясь менее чем за 7 мин, при хорошем разрешении. Весь остаток выходящего потока (рис. 6.7, *a*) затем подвергали препаративному хроматографическому разделению, очищенную порцию (заштрихованный участок на рис. 6.7, *в*) собирали и проводили аналитическое разделение. Степень чистоты фракции ясно следует из наличия одного большого пика (рис. 6.7, *г*). Из результатов этих экспериментов следует, что при применении препаративной системы не происходит значительных потерь степени разрешения; этот вывод подтверждается данными последующих анализов. Описанным разделением иллюстрируются преимущества препаративной ЖХ (высокая степень разделения менее чем за 30 мин) над классическими хроматографическими методами (недостаточное разделение, несмотря на 10-часовую продолжительность эксперимента). Аналогичным образом Байерман и сотр. [21] провели очистку защищенного секрета (0,83 г) на двух картриджах, содержащих препарат C₁₈ (50×5,2 см) при использовании в качестве подвижной фазы смеси метанола, диметилформамида, воды и уксусной кислоты в соотношении 48:38:13:1.

Габриэль и сотр. [19, 20] разработали недорогую систему, работающую под низким давлением (0,35—1,05 МПа) и использующую толстостенные стеклянные колонки, предварительно заполненные силикагелем-60. Число теоретических тарелок в колонках составляло от 200 до 400. Типичным примером применения такой системы для очистки было хроматографирование Z-Phe-Phe-Trp-Lys (бутоксикарбонил)-Thr (*трет*-бутил)-Ser (*трет*-

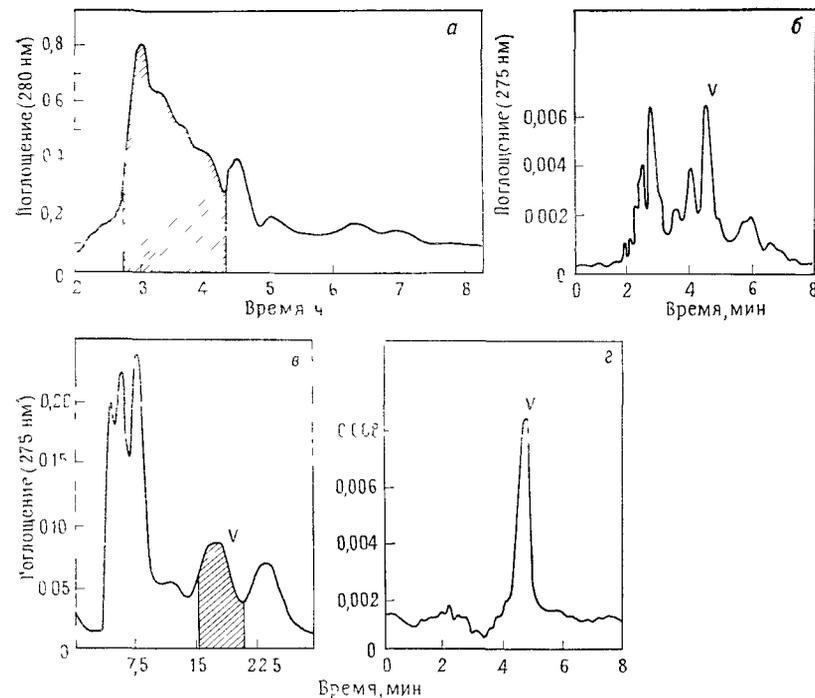


Рис. 6.7. Хроматограммы, полученные при очистке пентапептида: ацетил-Ser-Thr-Phe-Glu-(O-бензил-*n*-NO₂)-Arg-(NO₂)OH. *a* — профиль, полученный на системе сефадекс-LH-20. Подвижная фаза — 1% метанола в этилацетате. Колонка стеклянная 31×25 см. Скорость потока: 60 мл/ч. Гидростатическое давление при введении образца составляло 1 м; количество образца: 10 мл. В качестве детектора использовали прибор Увикорд; рабочая длина УФ-волны 280 нм. *б* и *г* — профили, полученные на колонке μ -бондапак, применяемой для анализа жирных кислот: 300×4 мм ($d_{\text{внутр}}$). Подвижная фаза содержит 50% метанола и 50% воды с 1% уксусной кислоты. Эффективность колонки: 2100 т. т. *в* — профиль, полученный для пептапептида, подвергнутого очистке на препаративной колонке. Препаративная система высокоэффективной ЖХ содержала две колонки длиной 60 см×7 мм ($d_{\text{внутр}}$), соединенные последовательно. Колонки были заполнены силианизированным сорбентом бондапак-фенилпорасил-B (37—50 мкм, фирма Waters) сухим методом. Подвижная фаза содержала 40% метанола и 60% воды с добавкой 1% уксусной кислоты. Введенный образец (2 мл) был приготовлен в подвижной фазе. Скорость потока: 5 мл/мин, требуемое давление: 13,7 атм. Суммарное число тарелок в обеих колонках: 520; хотя это значительно ниже, чем в случае применения аналитической колонки, выраженного отличия в характере разделения не наблюдалось [18].

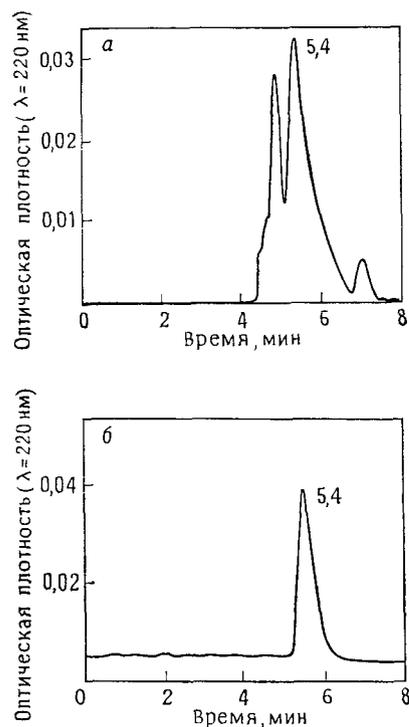


Рис. 6.8. Профиль элюирования неочищенного синтетического продукта L-Leu(Gly)₃ (а) и коммерческого стандарта этого соединения (б). Колонка: μ -бондапак-С₁₈; подвижная фаза: вода+0,5% трифтороуксусной кислоты, рН 2,3; скорость потока: 1,5 мл/мин [24].

бутил)-Сус (трет - бутил) - О - трет-бутила в количестве 474 мг при использовании в качестве подвижной фазы смеси хлороформ — метанол — уксусная кислота (80 : 10 : 2). Ряд пептидов вплоть до тетрадекапептидов был подвергнут хроматографическому разделению в данной системе. Более высокомолекулярные пептиды могут обладать ограниченной растворимостью в указанной подвижной фазе, хотя менее растворимые соединения могут быть растворены в таких веществах, как диметилформид или ледяная уксусная кислота, без снижения эффективности колонки. Куллман [22] разработал аналогичную систему для очистки защищенных промежуточных продуктов в ферментативном синтезе лейцин-энкефалина; в состав подвижной фазы входили смеси дихлорометана, этанола и уксусной кислоты.

В ранних исследованиях, связанных с попытками применить растворы фосфорной кислоты для элюирования пептидов из обращенно-фазных колонок, было изучено использование уксусной кислоты и трифтороуксусной кислоты как добавок к подвижной фазе. Было обнаружено, что присутствие уксусной кислоты приводит к уширению пиков и значительному увеличению времени удерживания [23], что, как правило, не подходило для целей анализа пептидов. С другой стороны, в присутствии трифтороуксусной кислоты получены очень хорошие данные, которые были сопоставимы с теми, какие получались с растворами фосфорной кислоты. Основными недостатками такой подвижной фазы в сравнении с фосфорной кислотой были повышенная кислотность фторированной кислоты, приводящая к сокращению срока службы колонки, и несколько повышенное поглощение на длине волны 210 нм. В то же время

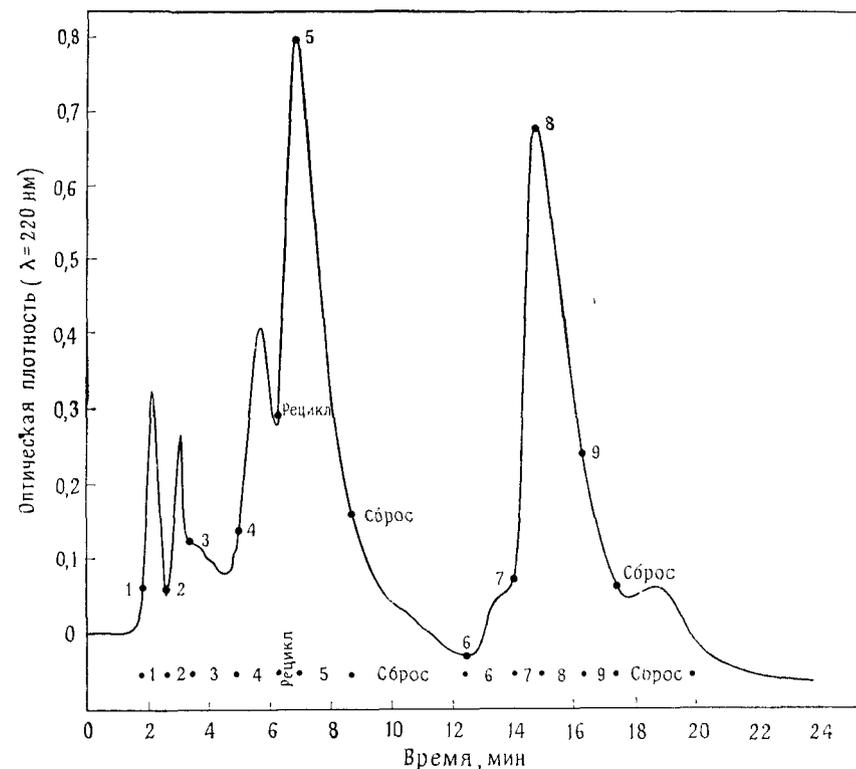


Рис. 6.9. Хроматограмма препаративной очистки 1 г неочищенного L-Leu(Gly)₃. Колонка с картриджом преппак-500/С₁₈; подвижная фаза: вода—метанол—трифтороуксусная кислота (95 : 5 : 0 : 0,05), рН=2,3; скорость потока: 100 мл/мин [24].

главным достоинством была высокая летучесть растворов трифтороуксусной кислоты, что представляло удобство с точки зрения препаративного разделения.

Доступность серийных препаративных жидкостных хроматографов облегчает препаративное разделение, поскольку позволяет пропорционально увеличить масштабы аналитического разделения. Примером такого увеличения масштабов является препаративное разделение 5 г тетрапептида Leu-(Gly)₃ в картридже преппак С₁₈ (75 мкм) размерами 30 см×5,7 см на приборе Prep LC/System 500 фирмы Waters [24]. Подвижная фаза представляла собой 0,05%-ный раствор трифтороуксусной кислоты в смеси вода — метанол (95 : 5); скорость потока составляла 100 мл/мин, противодействие — 7 ат. На рис. 6.8, а приведена хроматограмма неочищенного продукта синтеза тетрапептида в

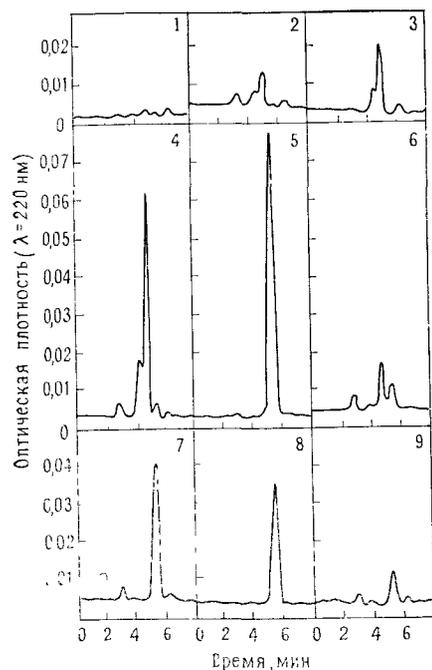


Рис. 6.10. Аналитические хроматограммы анализа методом ВЭЖХ собранных фракций (1—9) препаративного разделения неочищенного L-Leu(Gly)₃. Условия хроматографирования, те же, что на рис. 6.8 [24].

5 г на одно препаративное разделение: Gly-Glu-O-Et, Gly-Gly-Glu, пиридин-His-Gly, (Pro)₃ и пентапептидов лейцин- и метионин-энкефалин. Однако зачастую полярные пептиды недостаточно прочно удерживаются для достижения эффективного разделения на неполярных колонках при применении трифтороуксусной кислоты даже в отсутствие органического модификатора в подвижной фазе. Популярность в аналитическом разделении аминокислот и полипептидов приобрело использование ион-парных реагентов [26, 27]. Добавление к подвижной фазе таких анионоактивных веществ, как алкилсульфонаты, может привести к увеличению наблюдаемого времени удерживания полипептидов. С другой стороны, алкилсульфонаты непригодны для препаративных разделений, в связи с чем мы [28] и другие авторы [27] перешли к применению ряда перфторированных жирных кислот. При введении таких реагентов в подвижную фазу удерживание полипептидов оказалось непосредственно связанным с

растворе, а на рис. 6.8, б видна хроматограмма очищенного образца.

На рис. 6.9 показана хроматограмма образца массой 5 г, полученная на препаративном хроматографе. На рис. 6.10 представлены результаты аналитического разделения фракций, полученных в ходе препаративного разделения. Видно, что хвостовая часть основного пика, выходящего в препаративном разлении примерно через 8 мин, содержит чистое вещество. Кроме того, дополнительное количество чистого вещества получили из фракции 8, которую отобрали из хвостовой части материала, после циркуляции головной части основного пика. Последующие эксперименты показали, что степень извлечения очищенного вещества составляла около 95% [24].

В более поздней публикации [25] описана очистка перечисленных далее синтетических пептидов в количествах

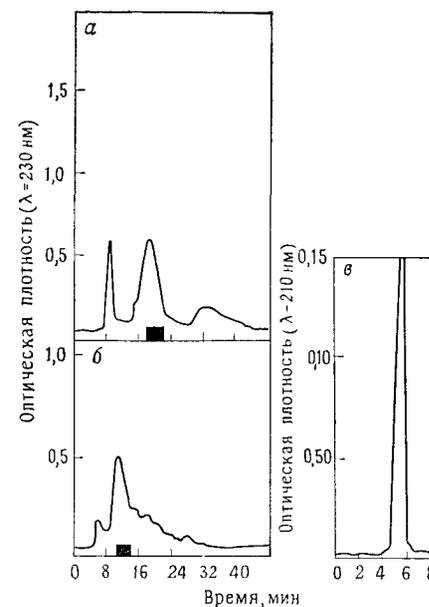


Рис. 6.11. Препаративное разделение пептида пиридин-His-Gly. 1 г неочищенного продукта растворяли в подвижной фазе и вводили в колонку с фазой C₁₈. В препаративных разделениях, показанных на рис. а и б, использовали скорость потока подвижной фазы 100 мл/мин; подвижная фаза: б — 0,05%-ный раствор перфтороуксусной кислоты, а, в — перфторомасляная кислота (5 мМ). Аналитическое разделение, показанное на рис. в, выполнили на колонке, заполненной бондапаком-C₁₈, используя в качестве подвижной фазы 5 мМ перфторомасляную кислоту. Вещества, выделенные в препаративных разделениях и собранные в одну фракцию, показаны зачерненными прямоугольниками [28].

длиной цепи перфторированной жирной кислоты [28]. Было, кроме того, показано, что указанные реагенты способствуют получению пиков правильной формы [28].

Преимущества использования подвижной фазы, содержащей 5 ммоль перфторированной жирной кислоты, были продемонстрированы на примере успешной очистки пептида пиридин-His-Gly (рис. 6.11). На рис. 6.11, б показано хроматографическое разделение синтетического продукта при применении подвижной фазы, содержащей 0,05% перфтороуксусной кислоты. В этом случае трипептид плохо отделяется от полярных примесей, элюируемых перед ним. Рис. 6.11, а описывает то же разделение, за исключением того, что в систему введена перфторомасляная кислота как ион-парный агент. Здесь удается хорошо отделить пиридин-His-Gly от примесей, выходящих из колонки раньше и позже трипептида. Такой результат можно отнести на счет более прочного удерживания растворенного вещества на

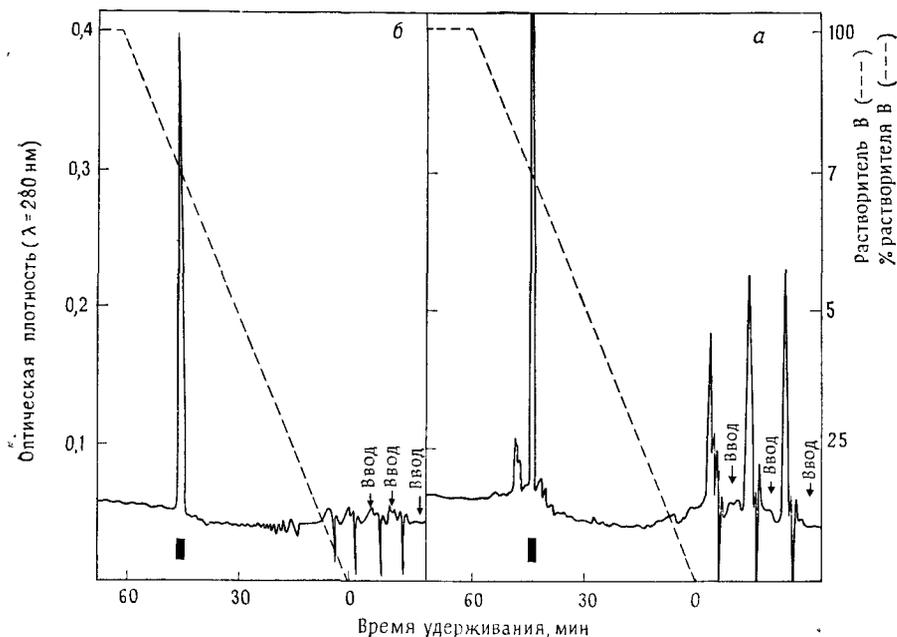


Рис. 6.12. Очистка 350 мкг пептида Leu-Gly-Ser-Phe-Leu-Lys-Ser-Tri-Leu-Ser-Ala-Leu-Gly-Gln-Ala-Leu-Lys-Ala выполнена на CN-колонке рэдиал-пак с линейным градиентом подвижной фазы от 0,1 М NH_4HCO_3 к раствору изопропанол — CH_3CN — 0,1 М NH_4HCO_3 (3 : 3 : 4) при скорости потока 1,0 мл/мин. Образец загружали путем ввода последовательно трех проб из раствора 6 М мочевины объемом 5 мл. *a* — профиль элюирования неочищенной смеси пептида. Фракцию, обозначенную сплошным прямоугольником (2 мл), собирали, разбавляли до 6 мл 0,1 М раствором NH_4HCO_3 и рехроматографировали в таких же условиях как на *a* [30].

колонке C_{18} при образовании комплекса с более липофильным ион-парным реагентом. Очищенный материал был взят из центральной части основного пика (рис. 6.11, *a*) и подвергнут анализу, доказавшему (рис. 6.11, *в*) его чистоту. Кроме того, аммониевую соль кислоты можно было удалить из очищенного пептида экстракцией эфиром — растворителем, в котором большинство пептидов не растворяется.

Бикарбонат аммония широко применяли как растворитель при разделении пептидов по традиционной хроматографической методике благодаря его большой летучести и высокой растворимости многих пептидов в соответствующем буфере. Высокие значения рН такой подвижной фазы (7,7—8) не позволяют применять ее совместно с кремнеземными сорбентами в жестких колонках, так как при этом возникают пустоты, вызванные

растворением кремнезема. Применение радиального сжатия в в колонках с гибкими стенками, помещенных в модуль радиального сжатия (изготовитель — Waters, отделение хроматографии фирмы Millipore) позволяет обойти эти трудности, поскольку любые пустоты, какие могут возникнуть, удаляются при сжатии колонки [7]. Мы обнаружили, что, если колонку каждый вечер промывать водой, а затем изопропанолом, можно добиться длительного срока службы (не менее 6 мес) колонок с неподвижной фазой рэдиал-пак резолв C_{18} или CN. В качестве дополнительной меры предосторожности устанавливают защитную колонку, набитую порасилом-В C_{18} . Защитная колонка не ухудшает разделения, но способствует значительному увеличению срока службы колонки вследствие удаления загрязнений из образца и подвижной фазы и растворения кремнезема в самой защитной колонке (тем самым подвижная фаза подвергается частичному предварительному насыщению кремнеземом).

На рис. 6.12 представлена хроматограмма, полученная при очистке 350 мкг синтетического пептида Leu-Gly-Ser-Phe-Leu-Lys-Ser-Trp-Leu-Ser-Ala-Leu-Gly-Gln-Ala-Leu-Lys-Ala [30]. До ЖХ-разделения данный пептид был подвергнут частичной очистке гелем-фильтрацией и ионообменной хроматографией. Образец был растворен в 5 мл 6 М мочевины и введен тремя примерно равными порциями при помощи инжектора (U6K, Waters). Большой пик был отобран (отмечено прямоугольником на рис. 6.12, *a*) и подвергнут повторному хроматографическому разделению, как показано на рис. 6.12, *б*. Перед повторным разделением объем вещества, содержащегося в пике (2 мл), был доведен до 6 мл раствором 0,1 М NH_4HCO_3 и введен в систему тремя приблизительно равными порциями в условиях, идентичных тем, которые существовали при получении хроматограммы, показанной на рис. 6.12, *a*. Очищенные пептиды были охарактеризованы аминокислотным анализом; типичными результатами были следующие: Ser 3,0 (2), Glu 3,1 (3), Ala 2,9 (3), Leu 5,0 (5), Phe 1,0 (1), Lys 2,0 (2), Trp 1,0 (1). Степень извлечения очищенного пептида составила по данным аминокислотного анализа 88%.

6.4. Применение тонкослойной хроматографии в обращенной фазе для контроля препаративного разделения

С появлением методов препаративного разделения в обращенной фазе возникла необходимость оценки степени чистоты выделенных фракций. Поскольку не всегда имеется дополнительный жидкостный хроматограф для контроля разделения, мы разработали метод с применением тонкослойной хроматографии

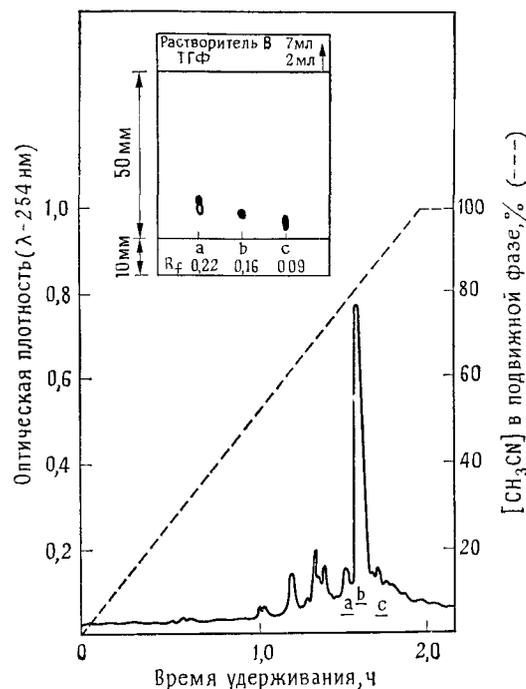


Рис. 6.13. Полупрепаративная очистка синтетического октадекапептида Leu-Gly-Ser-Phe-Leu-Lys-Ser-Trp (CHO)-Leu-Ser-Ala-Leu-Gly-Gln-Ala-Leu-Lys-Ala. Растворитель А — водный раствор триэтиламонийфосфата (1,5 мМ, рН 3,2), растворитель В — раствор 2-пропанол : ацетонитрил : водный раствор триэтиламонийфосфата (7,5 мМ) 40 : 40 : 20 по объему. Скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин, градиент указан штриховой линией. 5 мг пептида, растворенного в буфере А (0,2 мл), вводили в колонку. Вверху показано соответствующее ТСХ разделение фракций на слое с обращенной фазой [29].

(ТСХ) [29]. На рис. 6.13 приведены результаты применения обращенно-фазной ТСХ для контроля качества полупрепаративной очистки синтетического октадекапептида, Leu-Gly-Ser-Phe-Leu-Lys-Ser-Trp (CHO)-Leu-Ser-Ala-Leu-Gly-Gln-Ala-Leu-Lys-Ala. Данные ТСХ обеспечили возможность быстрой проверки результатов разделения методом высокоэффективной ЖХ и подтвердили, что пики оптической плотности действительно соответствуют пептидному материалу (дающему окраску с нингидрином). Рассматриваемый пептид содержал большое число гидрофобных остатков, в связи с чем он прочно удерживался на ТСХ пластинке с обращенной фазой. Удовлетворительные результаты были получены при добавлении тетрагидрофурана к подвижной

фазе; при этом хроматограмма содержала узкие пятна (рис. 6.13). Несмотря на различия в составах подвижных фаз, имеется четкая корреляция между системами ЖХ и ТСХ: например, для материала, элюируемого раньше в группе А ЖХ-фракций, значение R_f в обращенно-фазной ТСХ является наивысшим. Таким образом, обращенно-фазная ТСХ, основанная на применении пластин $KC_{18}F$ фирмы Whatman и подвижной фазы с 3% хлорида натрия, может быть применена для контроля состава фракций, полученных при ЖХ-разделении.

6.5. Препаративное разделение белков

6.5.1. Разделение в обращенной фазе

Хотя препаративное разделение аминокислот и низкомолекулярных пептидов при помощи ЖХ в обращенной фазе становится широко распространенной процедурой, разделение белков этим методом все еще требует тщательной оценки. Биологическая активность многих белков, чувствительная к денатурированию в результате сильных отклонений рН, контакта с органическими растворителями или солями в высоких концентрациях, адсорбции на стекле, гидрофобных компонентах или поверхности раздела воздух — вода [31]. Тщательный выбор колонок с обращенной фазой, органического модификатора (например, изопропанола) и оптимальных концентраций ионного модификатора (например, 0,1% трифтороуксусной кислоты) позволил добиться разделения белков при сохранении биологической активности.

Как уже упоминалось при обсуждении вопроса о разделении пептидов, добавление ионного модификатора зачастую является существенным моментом при разделении образцов белков методом обращенно-фазной ЖХ. Введение ионных модификаторов в подвижную фазу также может обеспечить достижение необходимых характеристик разделения сложных смесей белков. В число наиболее широко применяемых ионных модификаторов входят кислоты (например, трифтороуксусная [32, 33], фосфорная [9] и хлороводородная [34, 36]) и соли органических оснований (например, триэтиламинфосфат [7] и пиридинформат [37, 38]). В целом эффект ионного модификатора более сильно выражен в применении к белкам, чем к пептидам. Такое усиление эффекта может быть отнесено на счет наличия большего числа ионизуемых групп в образце белка. Поэтому вопрос оптимального выбора ионного модификатора может иметь более существенное значение при разделении белков.

Аполипептоин А-1 молекулярной массой 28000 можно легко элюировать из колонки C_{18} (μ -бондапак), применяя подвижную фазу, содержащую 1% триэтиламонийфосфата и гра-

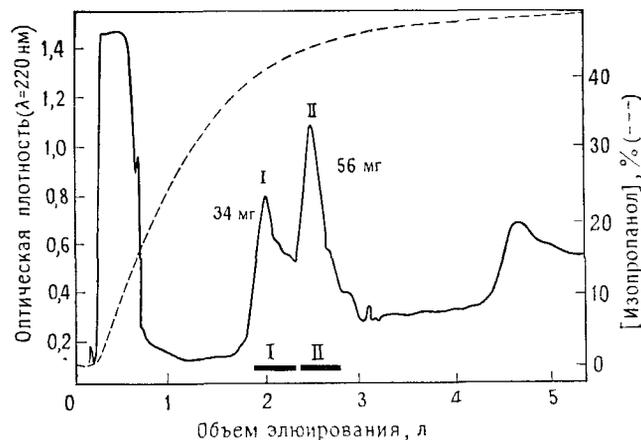


Рис. 6.14. Preparative separation apolipoprotein A-I на колонке преп-пак- C_{18} . Частично очищенный образец аполипопротеина А-I (0,1 г) растворяли в 20 мл раствора 3 М гуанидиндигидрохлорида, рН 3,2 и вводили в колонку. Разделение осуществляли в градиенте, показанном штриховой линией, от 1% триэтиламмонийфосфата (рН 3,2) до раствора, содержащего 80% изопропанола и 20% фосфатного буфера.

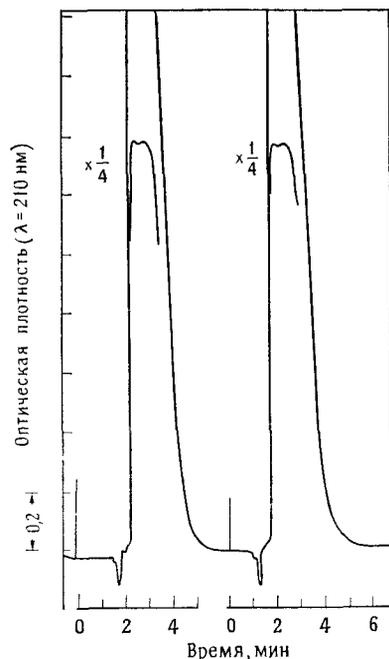


Рис. 6.15. Полуpreparative separation не содержащего цинка инсулина (2 мг) на колонке μ -бондапак- C_{18} ; подвижная фаза: 40% ацетонитрил с 1% триэтиламмонийфосфата, рН 4,5. Скорость потока: 1 мл/мин [40].

диент (0—40%) изопропанола. Замена триэтиламмонийфосфата на 5 мМ бутансульфонат приводит к неопределенно длительному удерживанию образца белка на фенильной колонке [39]. Кроме того, применение летучего ион-парного реагента — трифтороуксусной кислоты — препятствовало элюированию образца белка. Масштаб аналитического разделения может быть расширен до preparative очистки (рис. 6.14). На рис. 6.14 показано хроматографическое разделение 0,1 г частично очищенного аполипопротеина А-I на preparative колонке с обращенной фазой (преппак C_{18}). До 5 мг неочищенной смеси белков могло быть разделено без заметной потери эффективности разделения.

На рис. 6.15 представлены результаты полупреparative разделения инсулина, не содержащего цинка, на аналитической колонке C_{18} (μ -бондапак) [40]. На основании полученных данных удалось разработать метод preparative разделения образцов инсулина массой 5 г на приборе, выпускаемом в промышленном масштабе. Так как в preparative ЖХ-системе-500 фирмы Waters предусмотрено подключение второй колонки, то можно видеть, что имеется возможность при помощи preparative ЖХ быстро разделять образцы белков массой несколько граммов.

Иногда степень извлечения белка можно изменить путем обработки образца после разделения. Трипсин (1 мг) подвергли очистке на аналитической колонке (μ -бондапак C_{18}) с подвижной фазой, содержащей 0,1% трифтороуксусной кислоты при градиенте ацетонитрила от 0 до 45% [41]. Для надежного восстановления активности фермента необходимо было быстро изолировать очищенный фермент в очень мягких условиях. Ацетонитрил удаляли испарением в атмосфере азота при комнатной температуре, а водную трифтороуксусную кислоту быстро выводили из смеси лиофилизацией. Было достигнуто 57%-ное извлечение белка, причем очищенный материал обладал более высокой удельной активностью, чем исходный образец (151,5 и 135,8 ед/мг соответственно). О весьма сходных результатах разделения сообщил Титани с сотр. [42]. Путем добавления 2 мМ $CaCl_2$ к подвижной фазе авторы подняли стабильность трипсина и химотрипсина к действию трифтороуксусной кислоты; кроме того, были получены количественные степени восстановления активности обоих ферментов.

Аналогичным способом Ли и Чан [43] очистили 700 мкг экстракта человеческого гормона роста на колонке C_{18} (фирмы Alltech), применяя подвижную фазу, состоящую из пропанола-2 (43%) и воды, содержащей 0,1% трифтороуксусной кислоты. При очистке было получено 140 мкг гормона роста высокой степени очистки. Свобода и Ван Вик [44] очистили 50—75 мкг экстракта соматомедина С на колонке 30 см \times 7,8 мм (μ -бонда-

пак C_{18}) при линейном градиенте ацетонитрила (20—60%) в водной 0,1%-ной трифтороуксусной кислоте.

Исследования, проведенные Льюисом [7] и другими авторами [38, 45], показали, что размер пор кремнезема, использованного в производстве сорбента с обращенной фазой, может оказать существенное влияние на разделение высокомолекулярных белков. При сопоставлении [45] лихросорба RP-18 (размер пор 100 Å) и аквапора RP-300 (размер пор 300 Å) выяснилось, что второй сорбент дает значительно лучшие результаты при хроматографическом разделении белков с молекулярной массой более 15 000, например при разделении [^{14}C]-метилированного ингибитора трипсина поджелудочной железы быка, мюоглобина и овальбумина. Ривьер [46] недавно сообщил, что препаративная очистка синтетического препарата рилизинг-фактора кортикотропина может быть проведена со значительно более высокой эффективностью на сорбенте вайдак C_{18} (размер пор 300 Å), чем на сорбенте μ -бондапак C_{18} (размер пор 125 Å). К сожалению, в обоих исследованиях кремнеземы были неодинаковыми, и состав сорбированных фаз был различен, в связи с чем нельзя сделать вывода о влиянии размера пор. Тем не менее представляется, что есть тенденция применять кремнеземы с более крупными порами для разделения белков. Кроме того, хотя сейчас некоторые фирмы выпустили колонки с крупнопористым кремнеземом для работы в обращенно-фазном режиме, большого прогресса в производстве препаративных колонок, заполненных указанным сорбентом, не наблюдается.

Следует добавить, что тип использованного кремнезема так же важен, как и размер пор; первый фактор может иметь первостепенное значение [47]. По этой причине трудно оценить в точности влияние размера пор в исследовании, аналогичном проведенному Уилсоном и сотр. [45], когда сравнению подвергались два различных типа кремнезема. Мы описали применение колонки рэдиалпак C_{18} для полупрепаративного разделения сложных смесей пептидов и белков в количестве до 20 мг. На рис. 6.16 даны хроматограммы смеси С-аполипопротеинов из человеческих липопротеинов весьма низкой плотности; хроматограммы получены с применением двух различных градиентных программ. В данном случае на колонке рэдиалпак C_{18} (размер пор 90 Å) достигнуто четкое отделение аполипопротеина С-I от С-III_{1,2} и С-II. При тех же условиях разделения на колонке μ -бондапак C_{18} (размер пор 125 Å) получен широкий пик без разделения смеси. В данном случае также разделение проводили на двух различных видах кремнезема при применении двух различных подходов к связыванию. Ясно, что предстоит сделать многое для выяснения специфической природы взаимодействия белков с обращенно-фазными сорбентами. Тем не менее в на-

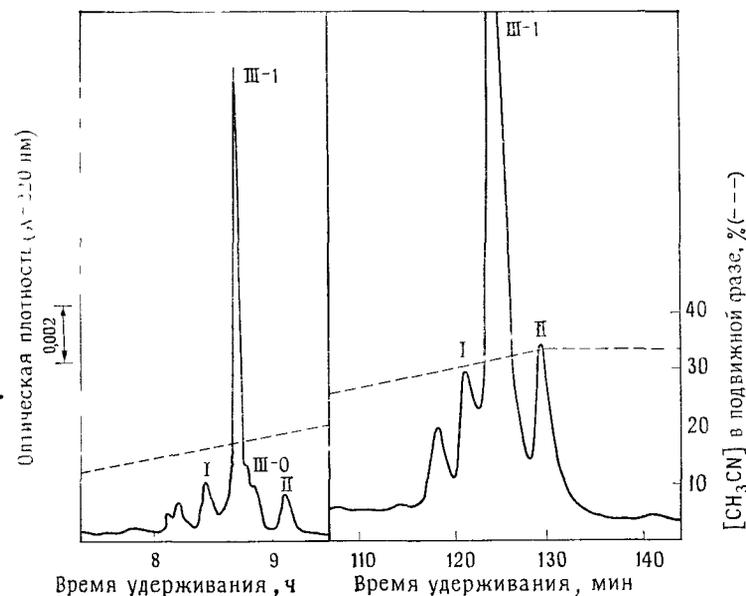


Рис. 6.16. Кривые элюирования смеси С-аполипопротеинов, полученных из липопротеинов весьма низкой плотности, при разделении на колонке рэдиалпак-резольв- C_{18} с различными градиентами ацетонитрила (см. штриховые линии). 0,1 мг смеси белков растворяли в 0,1 мл смеси 1% ТЭАФ — 6 М гуанидингидрохлорида и хроматографировали на колонке C_{18} , начиная с подвижной фазы — 1% раствора ТЭАФ, pH 3,2 [7].

стоящее время известно много случаев высокоэффективных обращенно-фазных разделений белков и полипептидов как в аналитическом масштабе, так и в количестве нескольких граммов на самых различных сорбентах.

Во многих случаях разделение белков в обращенной фазе лучше проводить при небольшом градиенте растворителя, чем в изократических условиях. Постепенное увеличение концентрации органического растворителя будет способствовать постоянному вытеснению белковых молекул с центров адсорбции до того, как наступит обратимое многоцентровое связывание. Отделение аполипопротеинов А-I, изображенное на рис. 6.14, проводили в градиенте изопропанола с целью элюирования белка из препаративной колонки. Эксперименты, направленные на обратную работу изократического отделения этого белка, показали, что белок или выходил в мертвом объеме при элюировании, или необратимо связывался, несмотря на использование подвижных фаз, которые отличались друг от друга ступенчатым (на 1%) приростом содержания изопропанола.

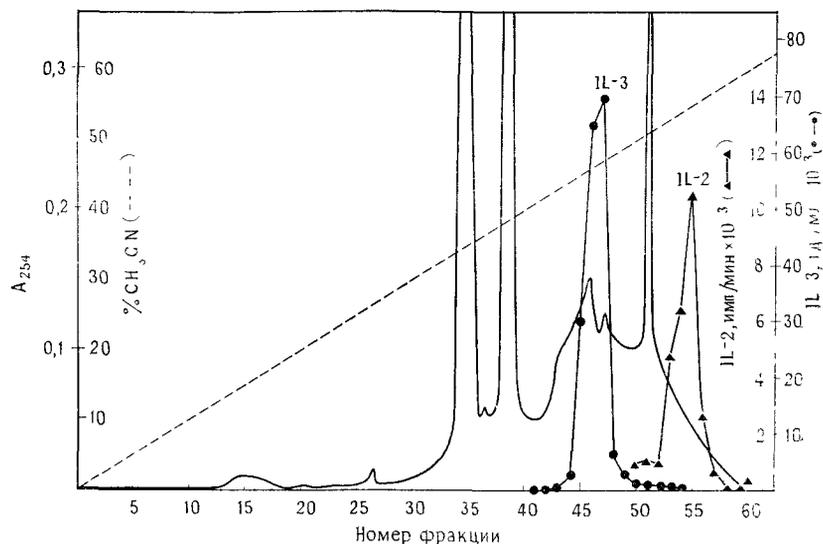


Рис. 6.17. Препаративная очистка смеси лимфокинов, полученных из стимулированных лектином клеток клональной линии LBRM-33, клон 5A4, Т-клеток лимфомы мышей. Использовали колонку семипреп- C_{18} фирмы Waters ($30 \times 0,78$ см). Подвижная фаза 0,1% трифтороуксусная кислота при градиенте ацетонитрила от 0 до 70% в течение 70 мин. Скорость потока: 2 мл/мин. Собирали фракции объемом 2 мл. Активность интерлейкина IL-3 была оценена по размножению клеток линии (FDCP-2), на которые влияет IL-3. Единицу активности определяли как обусловленное интерлейкином увеличение полумаксимального количества меченного тритием тимидина в объеме культуры 200 мкл. Активность IL-2 оценили по размножению линии цитотоксичных клеток, на которые влияет IL-2, путем измерения радиоактивности включенного меченного тритием тимидина.

Хроматографическое разделение на обращенной фазе оказалось весьма эффективным в препаративном получении лимфокинов [48], таких, как интерлейкины IL-1, IL-2 и IL-3 [49], и колониестимулирующих факторов (КСФ) [50]. Указанные гормоны производятся клетками иммунной системы и участвуют в регулировании всех аспектов иммунитета. Они активны при очень низких концентрациях (обычно 10^{-10} — 10^{-12} М), а их очистка затруднительна из-за склонности адсорбироваться на стекле и пластинках. Однако было показано, что в обращенно-фазной ЖХ при использовании системы трифтороуксусная кислота — ацетонитрил можно достичь весьма хорошего разделения (на уровне нулевой линии) с количественными выходами IL-2, IL-3 и гранулоцит — макрофаг колониестимулирующего фактора (ГМ — КСФ). Типичная картина отделения IL-2 и IL-3 от штамма ВРМ-33 клеток мышины Т-лимфомы [51] пред-

ставлена на рис. 6.17. Было сделано интересное наблюдение, состоящее в том что указанные интерлейкины очень стабильны в условиях элюирования (низкое кажущееся значение рН и высокие концентрации органического растворителя) и могут храниться в течение нескольких недель в буфере, используемом для элюирования, при температуре 4°C без потери активности.

6.5.2. Прочие способы разделения

Рубенштейн [52] предложил применять высокоэффективную ЖХ в нормальной фазе для разделения образцов белков, но за истекшее время такой метод не получил широкого применения. По всей видимости, многие белки не могут существовать в подвижной фазе, содержащей высокие концентрации органических растворителей.

Ситовая (гель-фильтрационная) хроматография находит все большее применение вследствие внедрения высокоэффективных колонок [53—56]. Такие колонки могут быть использованы с элюентами, имеющими нейтральное значение рН; добавления солей в разумных концентрациях достаточно для устранения помех от ионообменных эффектов. Однако, чтобы избежать воздействия гидрофобных характеристик матрицы, может возникнуть необходимость ввести модификатор в подвижную фазу, например 1% дезоксихолата [53], 0,3% додецилбензолсульфоната натрия [57], 5—10% пропанола [54], 20% этанола [56] или 0,1% полиэтиленгликоля [55]. При указанных ограничениях можно добиться быстрого разделения многих смесей белков на таких колонках по молекулярной массе. Основным недостатком высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии в настоящее время является низкое отношение объема пор к общему объему колонки [58] для нынешнего поколения сорбентов. В связи с этим часто возникает необходимость применения последовательного подключения двух [53, 55] или большего [54, 55] числа колонок с соответствующим ростом затрат; однако таким методом можно добиться хорошей очистки даже такого сложного белка, как лимфотоксин [55].

Способ, который пока еще находится на стадии оценки, — высокоэффективная аффинная хроматография [59—66]. В этом случае лиганд связан с колонкой, а образец подвергают отделению по его биологическому сродству к иммобилизованному лиганду. Получены многообещающие результаты, и можно ожидать, что по мере оптимизации состава сорбентов [65] и методов связывания лигандов [66] данный способ получит все более широкое применение в будущем.

Еще одним весьма интересным достижением является применение ионообменных колонок и метода хроматофокусирования

[67]. Указанным способом был разделен ряд белков при использовании выпускаемых хроматофокусирующих буферных систем. Получаемые при этом выходы в полупрепаративном масштабе (миллиграммы) были по существу количественными; кроме того, благодаря фокусирующему эффекту, присущему данному способу, степень выделения различных компонентов белков была выше, чем при применении любого другого способа, включая обращенно-фазную ЖХ.

6.6. Другие классы биохимических соединений

Успешное применение ЖХ в разделении пептидов и белков не представляется связанным с наличием каких-либо благоприятных свойств этих веществ. Напротив, другие классы соединений, в особенности липиды и нуклеиновые кислоты, по всей видимости, ведут себя более предсказуемым и объяснимым образом, чем полипептиды, в обычно имеющихся условиях ЖХ. В связи с этим более широкое применение ЖХ в препаративном разделении других классов биохимических соединений будет требовать лишь приложения таких же усилий исследователей, как при разработке способов разделения полипептидов.

ЖХ-разделение нуклеиновых кислот получило значительное развитие в работах Брауна и других исследователей [68, 69], но сведения о препаративном разделении только недавно стали появляться в литературе [69—72] в связи с ростом интереса к синтетическим олигонуклеотидам для целей генной инженерии. В настоящее время большое применение нашли ионообменное, гель-фильтрационное и обращенно-фазное разделения олигонуклеотидов на стадии окончательной очистки при их получении в качестве затравок и зондов. Высказывается мнение, что такие летучие буферы, как триэтиламиниацетат могут быть эффективно использованы при работе в режиме ситовой или обращенно-фазной хроматографии [71, 72].

Синтетические липиды [73, 74], фосфолипиды [75] и стероиды [76] образуют класс соединений, свойства которых позволяют считать, что в отношении этих соединений препаративная ЖХ может быть применена значительно более широко, чем в настоящее время. Низкая полярность большинства липидов позволяет применять адсорбционную хроматографию на колонках с кремнеземом без модификаторов [73, 75, 76] при использовании смесей органических растворителей в качестве элюента. Так, например, Пател и Спэрроу [77] описали разделение неочищенного фосфатидилхолина куриного желтка (5 г) на силикагеле при применении в качестве элюента смеси хлороформ — метанол — вода (60 : 30 : 4); степень извлечения выделенных фракций составляла 95%. Для разделения более полярных соединений,

таких, как лейкотриены [74] и стерилацетаты [76], можно также использовать обращенно-фазную хроматографию. Применимость нескольких хроматографических или близких к ним методов для разделения липидов дают основание считать, что большинство примеров препаративного разделения липидов нельзя будет считать обладающими достаточной новизной для того, чтобы заслужить право независимой публикации. Соответственно не следует ожидать, что в хроматографической литературе найдет отражение применение ЖХ в биохимии липидов.

Известны сообщения о препаративном обращенно-фазном разделении углеводов [78, 79], включая один из аминсахаров [80]. Здесь были применены колонки с кремнеземным сорбентом C_{18} [78, 79] и с аминогруппами [80]. В качестве элюента использовали смеси ацетонитрил — вода.

В целом биохимические соединения (здесь не обсуждаются полипептиды) характеризуются хорошим разделением и высокими степенями извлечения при применении различных методов, ЖХ, изученных исследователями. Обычно не требуется регулировать pH или вводить ионные модификаторы. Возможности применения препаративной ЖХ к разделению биохимических веществ таковы, что в скором времени краткий обзор работ в этой области станет невозможным.

Литература

1. *Bhown A. S., Bennett J. C.* in: Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed. *W. S. Hancock*, CRC Press, Boca Raton, 1984.
2. *Bohan T. P., Meek J. L.*, Neurochem. Res., **3**, 367 (1978).
3. *Hancock W. S., Sparrow J. T.*, A Laboratory Manual for the Separation of Biological Materials by HPLC, Marcel Dekker, New York, 1984.
4. *Hancock W. S., Harding D. R. K.* in: Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed. *W. S. Hancock*, CRC Press, Boca Raton, 1984.
5. *Snyder L. R., Kirkland J. J.*, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Ed. Wiley Inc., New York, 1979.
6. *Knox J. H.*, ed., High Performance Liquid Chromatography, Edinburgh University Press, Edinburgh, 1978.
7. *Hancock W. S., Sparrow J. T.*, J. Chromatogr., **206**, 71 (1981).
8. *Hancock W. S., Bishop C. A., Prestige R. L., Harding D. R. K., Hearn M. T. W.*, J. Chromatogr., **153**, 391 (1978).
9. *Bishop C. A.* in: Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed. *W. S. Hancock*, CRC Press, Boca Raton, in press.
10. *Lewis R. V., DeWald D.*, J. Liquid Chromatogr., **5**, 1367 (1982).
11. *Hancock W. S., Bishop C. A., Gotto A. M., Harding D. R. K., Lamplugh S. M., Sparrow J. T.*, Lipids, **16**, 250 (1981).
12. *Grant D. A. W., Cliffe S.* in: Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography IV, ed. *G. L. Hawk*, Marcel Dekker, New York, p. 83, 1982.
13. *Washburn L. C., Sun T. T., Byrd B. L., Callahan A. P.*, J. Nuclear Med., **23**, 29 (1982).

- 14 Gil-av E, Tishbee A, Hare P. E., J Amer. Chem. Soc., **102**, 5115 (1980).
- 15 Pietrzyk D. J., Stodola J., Anal. Biochem., **117**, 245 (1981).
- 16 Marshall G. R., Merrifield R. B., in: Biochemical Aspects on Solid Supports, ed G. R. Stark, Academic Press, New York, p. 111, 1971
- 17 Sparrow J. T., Unpublished observations.
- 18 Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Hearn M. T. W., Science, **200**, 1168 (1978)
- 19 Gabriel T. F., Michalewsky J., Meienhofer J., J Chromatogr, **129**, 287 (1976)
- 20 Gabriel T. F., Jimenez M. H., Felix A. M., Michalewsky J., Meienhofer J., Int J Peptide Protein Res, **9**, 129 (1977).
- 21 Beyerman H. C., Kranenburg P., Schaaper W. M. M., Voskamp D., Int J Peptide and Protein Res, **18**, 276 (1981).
- 22 Kullman W., J Liquid Chromatogr, **4**, 1121 (1981)
- 23 Hearn M. T. W., Hancock W. S., Trends in Biochemical Sciences **N58**, 1979
- 24 Bishop C. A., Harding D. R. K., Meyer L. J., Hancock W. S., Hearn M. T. W., J Chromatogr, **192**, 222 (1980)
- 25 Bishop C. A., Meyer L. J., Harding D. R. K., Hancock W. S., Hearn M. T. W., J Liquid Chromatogr, **4**, 661 (1981)
- 26 Hancock W. S., Harding D. R. K., Friedman Z., J Chromatogr, **228**, 273 (1982).
- 27 Ohlman C., Voskamp D., in: Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed W. S. Hancock, CRC Press, Boca Raton, 1984
- 28 Harding D. R. K., Bishop C. A., Tarttelin M. F., Hancock W. S., Int J Peptide Protein Res, **18**, 214 (1981)
- 29 Poll D., Knighton D. R., Harding D. R. K., Hancock W. S., J Chromatogr., **236**, 244 (1982).
- 30 Knighton D. R., Harding D. R. K., Napier J. R., Hancock W. S., J Chromatogr., **249**, 193 (1982).
- 31 Haschmeyer R. H., Haschmeyer A. E., in: Proteins: a Guide to Physical and Chemical Methods, J Wiley and Sons, New York, p. 352, 1973.
- 32 Mahoney W. C., Biochem. Biophys Acta, **704**, 284 (1982)
- 33 Bennett H. P. C., Solomon S., Goltzman D., Biochem J, **197**, 391 (1981)
- 34 Hayakawa K., Okada E., Higashikuze H., Kauramoto T., J Chromatogr, **256**, 172 (1983)
- 35 Zanelli J. M., J Chromatogr, **223**, 59 (1981).
- 36 Nice E. C., Capp M., O'Hare M. J., J Chromatogr., **185**, 413 (1979)
- 37 Lewis R. V., Fallon A., Stein S., Gibson K. D., Udenfriend S., Anal. Biochem, **104**, 153 (1980)
- 38 Wilson K. J., Honegger A., Stotzel R. P., Hughes G. J., Biochem J, **199**, 31 (1981)
- 39 Hancock W. S., Pownall H. J., Gotto A. J., Hancock W. S., J Chromatogr **216**, 285 (1981)
- 40 Hearn M. T. W., Hancock W. S., in: Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography II, ed. G. L. Hawke, pp 264, Marcel Dekker, New York, 1979
- 41 Strickler M. P., Gemski M. J., in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed. W. S. Hancock, CRC Press, Boca Raton, 1984
- 42 Titani K., Sasagawa T., Resing K., Walsh K. A., Anal Biochem, **123**, 408 (1982)
- 43 Li C. H., Chung D. in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed W. S. Hancock, CRC Press, Boca Raton, 1984.

- 44 Scoboda M. E., van Wyk J. J. in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed W. S. Hancock, CRC Press, Boca Raton, 1984
- 45 Wilson K. J., van Wieringen E., Klausner S., Berchtold M. W., Hughes J., J Chromatogr, **237**, 407 (1982)
- 46 Reier J. L. in Hormones and Drug Proc. of FDAUSP Workshop on Drug Reference Standards: Insulin, Somatostatin and Thyroid Axis Hormones, p. 492, 1982
- 47 Pearson J. D., Lin V. T., Regnier F. E. Anal Biochem, **124**, 217 (1982)
- 48 Aarden I. A. et al., J Immunol, **123**, 2928 (1979)
- 49 Lee J. C., Itapel A. J., Jh'e J. A. J Immunol, **128**, 2393 (1983)
- 50 Burgess A. W., Metcal, D. Blood **56**, 947 (1980)
- 51 Gillis S., Scheid M., Watson J. J Immunol, **125**, 2570 (1980)
- 52 Rubenstein M. Analyt Biochem, **98**, 1 (1979)
- 53 Robinson A. C., Talbert I., Biochem Biophys Res Comm, **95**, 90 (1980)
- 54 Pfeiffer R. L., Skea W. M., Waraska J., Cohen C., Burnworth L., in Biochemical/Biomedical Applications of Liquid Chromatography II, ed G. L. Hawke, Marcel Dekker, New York, pp. 43, 1979
- 55 Further J. P., Evans C. H. J Chromatogr, **248**, 427 (1982)
- 56 Hefti F., Anal Biochem, **121**, 378 (1982)
- 57 Mabuchi H., Akahashi H., J Chromatogr, **213**, 275 (1981)
- 58 Regnier F. E., Gooding K. M., Anal Biochem, **103**, 1 (1980)
- 59 Ohlson S., Hansson L., Larsson P. O., Mosbach K., FEBS Lett, **93**, 5 (1978)
- 60 Larsson P.-O., Glad M., Hansson L., Mansson M. O., Ohlson S., Mosbach K., Advan Chromatogr, **21** (1982)
- 61 Glad M., Ohlson S., Hansson L., Mansson M.-O., Mosbach K., J Chromatogr, **200**, 254 (1980)
- 62 Lowe C. R., Glad M., Larsson P.-O., Ohlson S., Small D. A. P., Atkinson T., Mosbach K., Chromatogr, **215**, 303 (1981)
- 63 Small D. A. P., Atkinson T., Lowe C. R. J Chromatogr, **216**, 175 (1981)
- 64 Kasche V., Buchholz K., Galonsky B. J Chromatogr, **216**, 169 (1981)
- 65 Walters R. R., J Chromatogr, **24**, 19 (1982)
- 66 Borchert A., Larsson P.-O., Mosbach K., J Chromatogr, **244**, 49 (1982)
- 67 Wagner G., Regnier F. E., Anal Biochem, **126**, 37 (1982)
- 68 Brown P. R., Krstulovic A. M., Anal Biochem, **99**, 1 (1979)
- 69 Payne S. M., Ames B. A., Anal Biochem, **123**, 151 (1982)
- 70 McLaughlin L. W., Romanuk E., Anal Biochem, **124**, 37 (1982)
- 71 Chow F., Kempe T., Palm G. Nucleic Acid Research, **9**, 2807 (1981).
- 72 Molko D., Derbyshire R., Guy A., Roget A., Teoule R., Boucherte A., J Chromatogr, **206**, 493 (1981)
- 73 Pettei M. J., Pulikewicz P. G., Nakanishi K., Tetrahedron Lett, **24**, 2083 (1977).
- 74 MacKay S. W., Mallen D. N. B., Shrubbsall P. R., Smith J. M., Baker S. R., Koenigsberger R. J. J Chromatogr, **219**, 325 (1981)
- 75 Geurts van Kessel W. S. M., Tuman M., Demel R. A., Lipids, **16**, 58 (1981).
- 76 Thowson J. R., Schroepfer G. J. J Lipid Res, **20**, 681 (1979)
- 77 Patel K. M., Sparrow J. T., J Chromatogr, **150**, 542 (1978)
- 78 Blumberg K., Linnere F., Pustilnik I., Bush C. A., Anal Biochem, **119**, 407 (1982)
- 79 Valent B. S., Darvill A. G., McNeil M., Robertson B. K., Albersheim P., Carbohydrate Res, **79**, 165 (1980)
- 80 Wingard R. E., Ng S., Dale J. A., Wang P. C., L. Liq Chromatogr, **1**, 775 (1978).

7

Прямое препаративное разделение энантиомеров жидкостной хроматографией на хиральных неподвижных фазах

У. Пиркл, Б. Хемпер

7.1. Введение

Разделение энантиомеров — одна из наиболее сложных встающих перед химиком задач очистки веществ из-за внутриснежного сходства подлежащих разделению компонентов [1]. С появлением современных методов жидкостной хроматографии [2] исследователи получили мощное средство для разделения даже очень близких соединений. В течение нескольких последних лет эти методы были успешно использованы для решения проблемы разделения энантиомеров. Имеются сообщения о ряде достаточно впечатляющих разделений энантиомеров. Многие из них описаны в обзоре Линднера [3], Блашке [4], Даванкова [5], Аудеберта [6] и Крулла [7].

Давно считали, что при хроматографии рацематов на хиральных адсорбентах можно в принципе разделить энантиомеры [8, 9]. Ранние попытки осуществить такое хроматографическое разделение были обычно недостаточно успешными в результате использования малоактивных хиральных адсорбентов и не очень эффективных методов хроматографии. Только недавно в литературе стали появляться сообщения, из которых следует, что такие прямые разделения могут стать легкими, полезными и иметь общий характер. Успех разделения нельзя приписать только развитию хроматографической техники или опыту хроматографистов; большой успех объясняется проводимыми в настоящее время разработками эффективных хиральных неподвижных фаз (ХНФ). В настоящее время осознают, что можно рационально разработать ХНФ, предназначенные для конкретных разделений, и что такие ХНФ могут быть привиты к подложкам, имеющим размеры частиц и механическую прочность, совместные с требованиями и высокими давлениями, используемыми в современной ЖХ. Можно ожидать, что исследователи будут в дальнейшем располагать набором хиральных колонок, который даст возможность непосредственно разделять действительно большие наборы соединений. Помимо очевидных аналитических применений такие колонки будут служить источником получения хиральных материалов известной энантиомерной чи-

стоты. Несомненно, такая методология будет быстро принята и использована в самых различных областях.

В данном обзоре рассмотрены современные успехи в разделении энантиомеров с помощью жидкостной хроматографии в препаративном масштабе. Мы будем считать «препаративным» разделение, которое позволяет получать расщепленный материал для последующего использования независимо от того, получают ли в результате разделения менее миллиграмма или несколько граммов материала. Кроме того, под этим подразумеваются методы, которые позволяют выделять энантиомерно чистые вещества, а не слегка обогащенные материалы. Это в значительной мере исключает обсуждение многих исторически важных, но малоэффективных расщеплений, рассмотренных в более ранних обзорах [10—13].

7.2. Хроматографические методы выделения энантиомеров

Хроматографические методы выделения энантиомерно чистых материалов из энантиомерно грязных смесей можно разделить на не прямые и прямые. Прямое разделение включает использование либо хиральной неподвижной фазы ХНФ, либо хиральной подвижной фазы, в то время как не прямой метод предполагает использование хиральных агентов для получения производных (derivatизаторов) с целью превратить смесь энантиомеров в смесь диастереомеров. Диастереомеры могут различаться по многим свойствам, включая хроматографическое поведение. Хотя настоящий обзор не охватывает не прямых методов [11, 14], мы сопоставим этот подход с прямыми методами.

Взаимодействие энантиомеров с хиральной неподвижной фазой ведет к образованию промежуточных диастереомерных адсорбатов, которые должны различаться по стабильности, если необходимо разделить энантиомеры. В не прямом методе диастереомерные соединения могут отличаться по стабильности, но такое отличие не является существенным для хроматографического разделения. Энантиомеры дают также переходные диастереомерные сольваты с хиральными подвижными фазами. В этом случае ситуация более сложная, но различие в стабильности обычно считают важным для любого разделения.

* В некотором смысле различия между аналитическим и препаративным разделениями являются естественными, так как аналитические опыты почти всегда используются в процессе оптимизации условий для препаративных разделений.

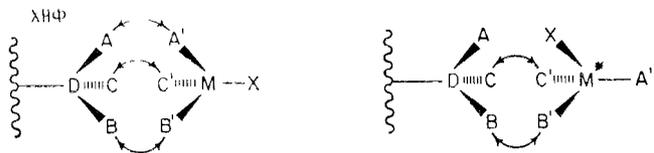


Рис. 7.1. Два возможных диастереомерных адсорбата, каждый из которых состоит из хиральной неподвижной фазы (ХНФ) и одного из энантиомеров (M или M^*) растворителя.

В принципе прямые методы более предпочтительны, так как стадии получения (дедериватизация) и разложения производных (дедериватизация) исключаются. Это особенно выгодно для соединений, которые имеют низкий барьер рацемизации и могут быть рацемизованы в процессе химических превращений. Помимо этого прямые методы являются абсолютными, поскольку энантиомерная чистота хроматографически разделенных полос не связана с энантиомерной чистотой хиральных дериватизирующих агентов. Например, энантиомерная чистота антиподов, полученных с помощью прямого разделения, зависит только от степени разделения хроматографических полос, и на нее не влияет непосредственно энантиомерный состав неподвижной фазы. Если зоны полностью разделены, два стереомера будут энантиомерно чисты. С другой стороны, если хиральный дериватизирующий агент, используемый для непрямого расщепления, не имеет полной энантиомерной чистоты, то расщепленные диастереомеры будут иметь ту же степень загрязнения, которую имел дериватизатор. Несмотря на эти недостатки, не прямые методы используют достаточно часто, и они дают достаточно хорошие результаты. В 1983 г. сделан обзор [14] хиральных дериватизирующих агентов, которые дают возможность получать хроматографически разделенные диастереомеры, и исследования в этом направлении продолжают.

Расщепление рацематов на хиральных колонках дает почти идеальный способ получения умеренных количеств каждого энантиомера в энантиомерно чистом состоянии. Масштаб такого разделения зависит от эффективности и размера используемой колонки и степени «хирального распознавания», которое дает ХНФ. Хиральное распознавание может иметь место только в том случае, когда имеется как минимум три одновременных стереометрически зависимых взаимодействия между неподвижной фазой и по меньшей мере одним из разделяемых энантиомеров [15]. Взаимодействием может быть проявление любого типа обычных межмолекулярных взаимодействий, например образования водородной связи, электростатического, диполь-дипольного взаимодействия, образования π -комплексов, стерического

отталкивания и гидрофильного или гидрофобного взаимодействия.

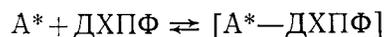
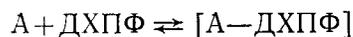
Обобщенная ХНФ, имеющая три потенциальных места взаимодействия A , B и C , показана на рис. 7.1. Структура молекулы ХНФ такова, что она содержит три центра взаимодействия, расположенные в определенном геометрическом порядке, и не позволяет разделяемым молекулам подходить к обратной стороне треугольника ABC . Молекула растворенного вещества M содержит три комплементарных (соответствующих) места A' , B' и C' , взаимодействующих при образовании диастереомерного адсорбата соответственно с A , B и C , как показано на рисунке слева. Ее энантиомер M^* может взаимодействовать с ХНФ таким образом, что в любой момент времени могут происходить только два из потенциально возможных взаимодействий. Если все три взаимодействия по своей природе являются взаимодействиями притяжения, то энантиомер M будет образовывать более стабильный диастереомерный адсорбат и поэтому будет предпочтительно удерживаться на ХНФ. Если одно из взаимодействий является отталкивающим, например взаимодействие между A и A' , то M^* будет удерживаться более сильно. Детальные знания природы образуемых диастереомерных адсорбатов позволяют не только определить, какие вещества могут быть разделены на данной ХНФ, но и знать порядок элюирования и коррелировать его со стереохимией.

При обсуждении хирального распознавания полезно рассмотреть, является ли этот процесс связанным с единственным хиральным местом (независимое поведение) или с совместным действием нескольких хиральных мест (кооперативное поведение). В растворе наблюдается независимое поведение. Кооперативное поведение будет иметь место только в том случае, если в растворе может быть образован полный ансамбль хиральных мест. Хотя при кооперативном поведении остается справедливым правило трех точек, не всегда бывает очевидно, какие взаимодействия имеют место. Излишне говорить, что может иметь место более чем трехточечное взаимодействие.

Ряд исследователей использовали добавки хиральной подвижной фазы (ДХПФ) для разделения энантиомеров на хиральных колонках. Как было доказано в лигандообменном варианте, этот подход достаточно эффективен при аналитическом разделении аминокислот и других бидентатных лигандов [16—19]. ДХПФ-метод привлекателен тем, что позволяет исследователю применять многие типы готовых колонок. С точки зрения препаративной хроматографии этот метод имеет ряд присущих ему недостатков. Во-первых, требуемое количество ДХПФ эквивалентно или превосходит количество расщепляемых рацематов.

Выделенные энантиомеры должны быть отделены обязательно от ДХПФ [20].

Как справедливо указали Даванков и Курганов [21], в ДХПФ-методе обычно трудно установить механизм, ответственный за удержание растворенного вещества. Если мы представим пару энантиомеров А и А* в растворе, содержащем ДХПФ, то можно написать два равновесия образования различных диастереомерных комплексов А и А* с ДХПФ, и любое из пяти соединений



может удерживаться в колонке. Поэтому разделение может быть обусловлено следующими причинами:

а) различие в адсорбции диастереомерных комплексов (А-ДХПФ) и (А*-ДХПФ) аналогично разделению диастереомерных производных;

б) сильная адсорбция диастереомера А и А* с ДХПФ, селективно «поднимающей» один энантиомер в подвижную фазу в результате предпочтительной сольватации;

в) неподвижная фаза, сильно адсорбирующая ДХПФ, действует как хиральная неподвижная фаза и селективно удерживает один энантиомер.

В случае (б) предпочтительно сольватируемый энантиомер выходит из колонки первым; в случае (в) он элюируется последним. Поэтому соотношение между порядком элюирования и абсолютной конфигурацией молекул может быть сложным из-за неопределенности того, какой из механизмов доминирует. В некоторых случаях ДХПФ может удерживаться неподвижной фазой даже после прекращения добавления ДХПФ в элюент. Такое «покрытие» неподвижной фазы ДХПФ (модифицирование) позволяет превращать обычную хиральную колонку фактически в ХНФ.

7.3. Хроматографические свойства хиральной неподвижной фазы (ХНФ)

Поскольку этот обзор посвящен препаративным разделением энантиомеров, полезно обсудить сначала аналитические разделения как предшествующие препаративным. Современное развитие ХНФ, эффективных для препаративной работы, может быть приписано главным образом исследованиям, выполненным на аналитическом уровне. Например, возможность разделения энантиомеров на данной ХНФ может быть быстро оценена при использовании небольших количеств рацемата. Хорошо разде-

ляемые энантиомеры потенциально являются кандидатами для включения в «обратную» (способную к взаимообмену) ХНФ, которая должна разделять соединения, аналогичные используемым в начальной ХНФ (см. ниже). Любые ХНФ, которые работают хорошо на аналитическом уровне, можно использовать в препаративных колонках. Так как препаративные хиральные колонки должны иметь свойства, характерные для любого препаративного разделения, задачи метода препаративной жидкостной хроматографии в целом соответствуют и задачам разделения энантиомеров. Рассмотрим несколько хроматографических параметров, которые специфично применимы к ХНФ.

ХНФ должна иметь подходящий коэффициент разделения α для двух энантиомеров. Коэффициент α определяется как отношение факторов емкости более сильно удерживаемого энантиомера k_2' к менее удерживаемому энантиомеру k_1' . Необходимое значение α для разделения данного количества образца будет зависеть как от размера, так и от эффективности колонки. Обычно в препаративных разделениях намеренно используют перегрузку колонки образцом для того, чтобы получить наибольшее количество разделенного материала в наиболее короткое время. В этих условиях как эффективность колонки, так и значение α могут быть резко уменьшены по сравнению со случаем использования малых нагрузок. Поэтому образцы, имеющие большие значения α , в условиях перегрузки разделить проще, и они позволяют получать наибольший выход материала. Образцы с малыми значениями α , возможно, следует разделять в условиях отсутствия перегрузки и, может быть, с использованием циркуляции. С точки зрения препаративного разделения энантиомеров главный успех будет обеспечен благодаря использованию более эффективных ХНФ.

Эффективность данной хроматографической системы, измеренная в теоретических тарелках, сильно зависит от оборудования, размера частиц и величины поверхности адсорбента, а также скорости подвижной фазы. Однако на общую эффективность хроматографического процесса [22] влияют также кинетические свойства неподвижной фазы. Если адсорбционно-десорбционный процесс протекает медленно, хроматографическая полоса будет размыта. В частности, массообмен на ХНФ затруднен, когда растворенные вещества адсорбируются сильно, что необходимо учитывать при конструировании ХНФ. Чтобы увеличить величину α , следует увеличить различие в стабильности диастереомерных адсорбатов. Это достигается наиболее просто, когда адсорбционные энергии велики. Таким образом, факторы, увеличивающие α , могут влиять нежелательным образом на форму полосы. Увеличение температуры будет способствовать улучшению формы полосы, но в то же время может при-

вести к уменьшению значения α . При комнатной температуре скорость потока для оптимальной эффективности может быть меньше, чем этого хотелось бы при препаративном разделении. Препаративные системы, использующие микропроцессорный контроль, могут сделать «эффективным» многократное разделение небольшого масштаба, так как разделения могут выполняться в течение круглых суток без привлечения внимания оператора.

Идеальные ХНФ должны, имея высокую емкость по образцу на грамм неподвижной фазы, не давать заметного уменьшения α при хроматографической эффективности. Хроматографическим параметром, включающим оба этих фактора, является разрешение R_s . При выделении двух компонентов мы в наибольшей степени заинтересованы в соотношении между размером образца и разрешением R_s , определяемым как отношение разности времен удерживания двух пиков к средней ширине пика у основания (о разрешении см. разд. (1.3)). Значения R_s позволяют сравнивать эффективность разрешения и оценивать чистоту собранных материалов. Внутри области линейной емкости величина образца не будет уменьшать удерживание или разрешение компонентов. Вне этого диапазона увеличение образца будет уменьшать разрешение R_s и эффективность колонки [23]. Для препаративной работы полезно найти наибольшую величину образца, которая позволяет все-таки иметь значение R_s , равное единице или больше. Значение $R_s = 1$ означает двухпроцентное перекрытие площадей двух гауссовых пиков [2]. Большое значение R_s указывает на меньшее перекрытие и соответственно большую степень разрешения.

Емкость данной ХНФ для расщепления смеси рацематов может быть определена на основе аналитических разделений и использована для оценки условий, подходящих для больших препаративных колонн. В хроматографических системах среднего давления, способных разделять мультиграммовые количества материала [24], обычно применяют адсорбенты с большим размером частиц (40—60 мкм), и колонки имеют меньшее противодавление (0,35—1,4 МПа), чем в их аналитических аналогах. Большие по величине, нерегулярные частицы адсорбента часто имеют величину удельной поверхности, большую, чем сферические частицы, используемые во все большей степени для аналитических колонок. Поэтому препаративные неподвижные фазы часто могут иметь большую емкость на грамм, чем их аналитические аналоги [25]. Промежуточные полупрепаративные ($d_{\text{внутр}} = 10$ мм) колонки — это обычные большие аналитические колонки, причем их упаковывают малыми частицами адсорбента и используют в аналитических ВЭЖХ-системах. Их размер позволяет расщеплять миллиграммовые количества рацема-

тов за один опыт. Ниже мы попытаемся сравнить свойства различных ХНФ, применяемых в качестве высокоэффективных адсорбентов, по их емкости, коэффициентам разделения и эффективности по отношению к соответствующим рацематам. Эффективность особенно важна, так как ХНФ должна не только проявлять сильное различие в сродстве к энантиомерам, но и обладать хорошими хроматографическими свойствами. Очень часто авторы не приводят данных, касающихся качества колонок, заполненных ХНФ. Однако даже в этих случаях прямое сравнение все-таки иногда возможно.

7.4. ХНФ на основе природных материалов

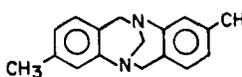
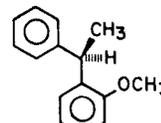
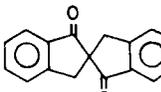
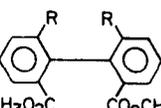
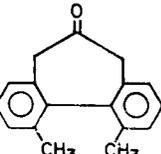
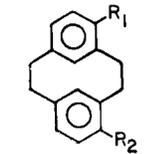
Первыми ХНФ были легко доступные хиральные твердые материалы, такие, как сахара, крахмал, целлюлоза и шерсть [10—13]. Хотя эти материалы дешевые и позволяют создавать большие колонки, они, как было найдено, по большей части плохо работают в качестве ХНФ. Два полисахарида — триацетилцеллюлоза и картофельный крахмал — составляют исключение из этого обобщения.

7.4.1. Микрористаллическая триацетилцеллюлоза

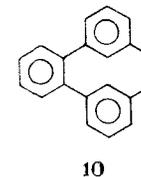
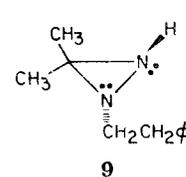
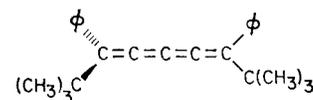
Микрористаллическую триацетилцеллюлозу широко использовали для расщепления все возрастающего числа рацемических смесей. Хессе и Хагель показали, что решающим для эффективности этих ХНФ является способ приготовления [26а, б]. Каждая единица D-глюкозы должна быть перацетилирована, причем наибольшей селективности достигают при ацетилировании *in situ* (на месте). Не должно быть перекристаллизации, поскольку при этом уменьшается разрешающая способность ХНФ, вероятно, за счет изменения вторичной структуры природного полимера. Используя ХНФ на основе производных целлюлозы, Хессе и Хагель осуществили первое количественное расщепление оснований Трегерса (1) (табл. 7.1).

Микрористаллическую триацетилцеллюлозу с размером частиц 58 мкм можно использовать как хроматографическую насадку, и она может выдерживать умеренные давления (0,2—1,1 МПа) без разрушения слоя или деструкции полисахаридной структуры. В качестве подвижной фазы наиболее часто используют этанол, хотя использовали также эфир и бензол [27, 28]. Линднер и Маншрек [29 а] приготовили аналитическую ЖХ-колонку, содержащую небольшие частицы (5—10 мкм) микрористаллической триацетилцеллюлозы, которая могла выдерживать давление до 19,5 МПа. Эту колонку использовали для полного

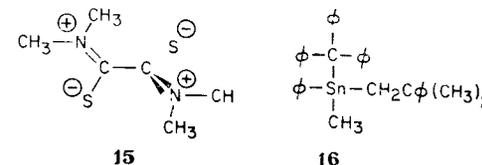
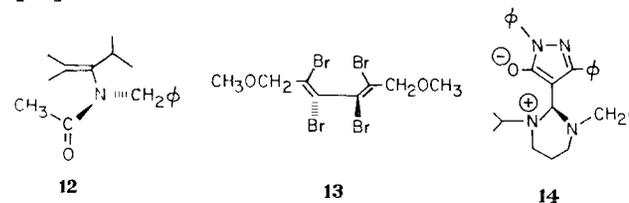
Таблица 7.1. Preparative chromatographic resolution of chiral compounds containing two aryl substituents, on microcrystalline triacetate cellulose

Рацемат	Масса образца, мг	Размеры колонки L X D, см	α	R_s	Литература
1 	100	16×2	2,37	>1	26a
	50	30×2,5	1,9	3,9	302
2 	250	40×3,1	2,63	>1	266
3 	125	0,8	—	>1	29a
	150	60×2,5	—	1,0	296
4 	50	30×2,5	2,1	3,8	30
5 	50	30×2,5	1,5	1,6	30
	50	30×2,5	1,2	1,3	30
6 	50	30×2,5	3,7	6,0	30
7 	50	30×2,5	1,2	1,4	30
	50	30×2,5	1,4	1,4	30
	50	30×2,5	1,4	1,9	30

разделения 1 мг *транс*-1,2-дифенилциклопропана (**3**) за одно разделение (табл. 7.1).

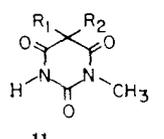


Шлогл [30] количественно расщепил соединение **4—7**, каждое из которых содержало два ароматических заместителя, на колонке размером 30×2,5 см, содержащей микрокристаллическую триацетилцеллюлозу (табл. 7.1). Были также разделены пентатетраен (**8**), диазиридин (**9**) и бензо[2,2]метацicloфан (**10**). Хотя хроматографические параметры не были приведены, разделение описывалось как «почти до нулевой линии» [27, 31, 32]. Соединения, не имеющие арильных заместителей, такие, как производные барбитурата (**11, б—д**), были также разделены на триацетилцеллюлозе (табл. 7.2). Количество барбитуратов, расщепляемых за один опыт, было между 160 и 300 мг рацемата на колонке (85×2,5 см), содержащей 205 г адсорбента (рис. 7.2) [33].



Триацетилцеллюлозу с успехом использовали для разделения соединений с лабильной хиральностью, обусловленной затрудненным вращением вокруг единичной связи углерод—уг-

Таблица 7.2 Preparативное расщепление барбитуратов на микрокристаллической триацетилцеллюлозе^a

Рацемат		R ₁	R ₂	α	R _S	Масса образца, мг
 11	а	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	2,3	2,3	301
	б	1-циклогексенил	CH ₃	1,7	1,5	160,6
	в	1-циклогексенил	C ₂ H ₅	2,0	1,7	205
	г	циклогексенил	CH ₃	1,9	1,5	200
	д	циклогексил	C ₂ H ₅	2,4	1,7	200,2

^a Колонка 85×2,5 см растворитель 95%-ный этанол; перепад давления 0,25 МПа

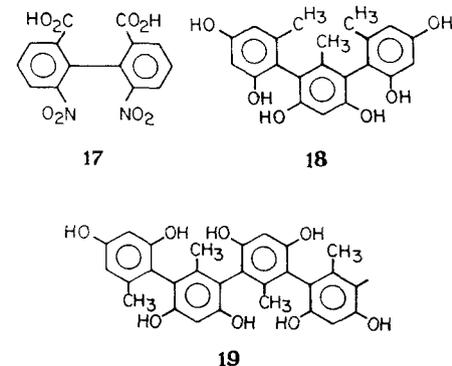
лерод или углерод — азот. Енамид **12** [34], гексадиен **13** [35], поляризованные алкены **14** [36] и N,N,N',N'-тетраметилдитиозамид **15** [37] были частично разделены на триацетилцеллюлозе. По-видимому, требуется метод циркуляции или отбора хроматографических пиков, для того чтобы получить энантимерно чистый материал. Хотя в предыдущих примерах энантимеры не были полностью разделены, очевидно, что метод дает возможность чрезвычайно мягкого разделения термолabile соединений. В сочетании с фракционной кристаллизацией даже частичное расщепление на хиральной колонке делает возможным получение довольно необычных соединений с высокой энантимерной чистотой. Например, комбинацией этих методов [38] было получено энантимерно чистое тетразамещенное оловоорганическое соединение **16**. Недавно Шлогл [39] частично расщепил некоторые рацемические 1,1,2,2-тетракарсилэтаны, имеющие C₂-симметрию [39].

Микрокристаллическая триацетилцеллюлоза является примером полезной «природной» ХНФ, имеющей физические свойства, подходящие для использования в хроматографии, и показывающей подходящую селективность для определенных хиральных молекул. К сожалению, механизм, ответственный за хиральное распознавание на таких ХНФ, до сих пор еще хорошо не понят. Хессе и Хагель [26 а, б] провели наиболее полное изучение взаимосвязи между структурой производных целлюлозы и их результирующими хроматографическими свойствами. Растворение и очистка микрокристаллической ХНФ в значительной степени уменьшают ее способность разделять энантимеры. Это наводит на мысль, что ХНФ обладает кооперативным, а не независимым поведением (разд. 7.2) в процессах хирального распознавания, так как рекристаллизация влияет на вторичную структуру природного полимера, но не на индивидуальные глюкозные единицы. Хотя соединения, аналогичные тем, что показаны, могут быть разделены на триацетилцеллюлозе, для этой

ХНФ все еще не определены закономерности, связывающие структуру и возможность разделения. По-видимому, вещества, которые могут быть разделены на этой ХНФ, подбираются более или менее эмпирически, и в достигнутом успехе имеется определенная степень удачи.

7.4.2. Картофельный крахмал

Картофельный крахмал использовали для разделения полярных биарильных соединений, таких, как 6,6'-динитродифеновой кислоты **17** и тримеров и тетрамеров орсина **18** и **19** соответственно [40 а, б]. В случае тримера **18** имеются *d,l*-формы и *мезо*-форма, причем отнесение зависит от расщепления *d,l*-форм [40а]. Все три возможные диастереомерные тетрамеры **19** могут быть раз-



делены на ХНФ. В качестве подвижной фазы обычно используют водные растворители; выбор буфера, pH и концентрации буфера являются критическими для процесса разделения. Было получено разделение до нулевой линии 500 мг одного из диастереомеров тетрамеров орсина **19** на колонке 136×5,2 см, содержащей картофельный крахмал с использованием лимоннокисло-го буфера в качестве подвижной фазы. Трудности preparативного разделения связаны в основном с временем, необходимым для разделения (4,5 сут), низкой емкостью колонки и необходимостью выделения разделенных материалов из большого количества водного буфера.

Возможно, что улучшенные ХНФ можно было бы получить из картофельного крахмала путем простой химической модификации гидроксильных групп полисахарида. К сожалению, отсутствуют сообщения, сравнивающие хроматографические свойства различных модифицированных картофельных крахмалов.

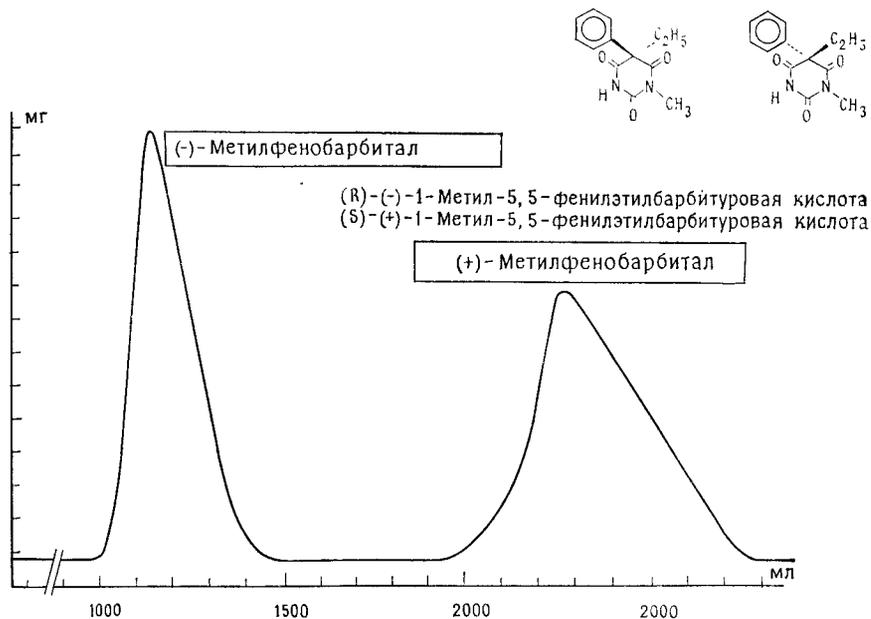


Рис. 7.2. Расщепление рацемата метилфенобарбитала [3]. Рацемат **IIa** расщепили хроматографически, используя в качестве адсорбента микрокристаллическую триацетатцеллюлозу. 205 мг адсорбента помещали в колонку размером 85×2,5 см. Проба: 301 мг рацемата. Элюент: 95%-ный этанол, $\Delta p = 0,25$ МПа. Полученные активные кислоты имели $t_{пл}$ 100 °С и $[\alpha]^{22} = -26,6^\circ$ (С, 0,645, этанол) (125 мг), и $[\alpha]_{365}^{22} = 26,8^\circ$ (С, 0,670, этанол) (127 мг).

7.5. Синтетические ХНФ

7.5.1. Разработка рационально сконструированных ХНФ

Синтетические ХНФ названы так, поскольку в противоположность ХНФ, рассмотренным ранее (разд. 7.4), в них не используются природные материалы ни в качестве хроматографического носителя, ни как источник хирального окружения. Синтетические ХНФ могут состоять из хиральных молекул, привитых к инертным подложкам (например, силикагелю, полимерам), полимерных материалов, полученных из хиральных мономерных единиц, или полимерных материалов, которые являются хиральными благодаря способу образования (например, присутствие хирального катализатора или хиральной матрицы в процессе полимеризации). В них может быть использовано широкое разнообразие хроматографических носителей, и они обеспечивают возможность введения почти бесконечного числа различных хи-

ральных молекул в ХНФ. Когда будет понят механизм хирального распознавания, специально сконструированные хиральные молекулы, привитые к современным хроматографическим подложкам, будут давать возможность прямого расщепления сотен и тысяч рацематов заранее предсказанным способом.

Бажук и сотр. [41] приготовили первые рационально сконструированные ХНФ, специально предназначенные для разделения *d,l*-ДОПА (рис. 7.3). Эти ХНФ включали в себя *l*-аргинин, привитый к сефадексу, целлюлозе или хлорометилированному полистиролу. Наилучшим оказался сефадекс, имевший коэффициент разделения $\alpha = 1,6$ и значение разрешения 0,9 для 20 мкг рацемического ДОПА на микроколонке (300×2,8 мм). После 50 повторных вводов пробы было получено достаточное количество материала для фармацевтических исследований и подтверждений полного разрешения. Аминокислота *l*-аргинин была выбрана для ХНФ на основе понимания правила трех точек (разд. 7.2, рис. 7.1). Объемные модели подтвердили, что *d*-изомер ДОПА лучше обеспечивает три электростатических взаимодействия с *l*-аргиномом, результатом чего является его предпочтительное удержание на ХНФ.

7.5.2. Хиральные краун-эфиры

Хроматографическое разделение аммониевых солей аминов, аминокислот и аминоксифиров было выполнено на ХНФ, содержащих хиральные краун-эфиры [42, 43]. Хиральные краун-эфиры или молекулы-хозяева состоят из циклических полиэфиров, включающих две 1,1'-динафтильные единицы известной конфигурации. Эти соединения были выбраны на основе предварительного изучения, показавшего образование диастереомерных комплексов типа хозяин — гость при взаимодействии с рацемическими аммониевыми солями при проведении экспериментов по двухфазной экстракции [44]. Две ХНФ были приготовлены с аналогичными хиральными хозяевами, причем одна с использованием силикагелевого носителя, а другая — путем прививки к хлорометилполистиролу **21**. В то время как ХНФ на основе **20** позволяла разделять до нулевой линии метильные эфиры аммо-

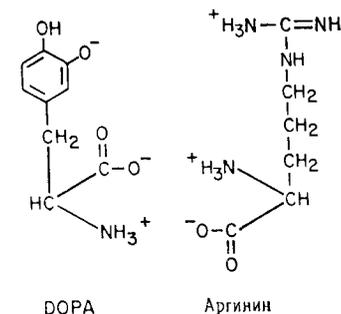


Рис. 7.3. Постулированные трехточечные притяжения между аргинином и диоксифениламином (ДОФА) приводят к увеличению удерживания *d*-ДОФА на колонке содержащей *l*-аргинин [41].

Таблица 7.3 Расщепление перхлоратных солей аминокислот и эфиров аминокислот $\text{ClO}_4^- \cdot \text{H}_3\text{NCH(R)CO}_2\text{R}$ на ХНФ-21^a

Вводимое вещество	R	R ¹	Масса, мг	α	R_S	$\frac{\text{CH}_3\text{CN}}{\text{CHCl}_3}$, %
22	CH ₃	<i>n</i> -хлорофенил	9,5	8,5	2,2	10
23	CH ₃	<i>n</i> -карбометоксифенил	9,5	12,6	2,3	10
24	CH ₃	фенил	9,5	18,5	4,5	10
25	H	фенил	10,1	24,3	0,74	10
26	H	метил	1,6	1,5	0,21	4

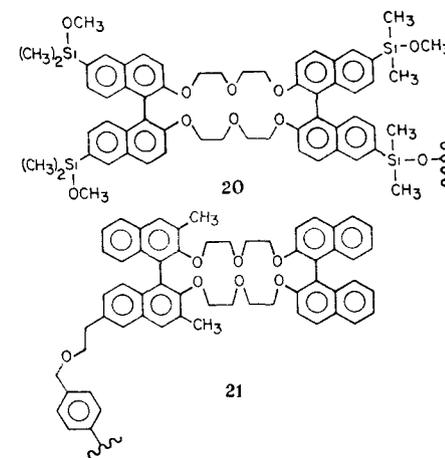
^a Колонка содержит 9,5 г ХНФ-21 в трубке из нержавеющей стали размером 600×7,5 мм (внутр диаметр)

ниевых солей только основных аминокислот, таких, как тирозин, триптофан, парагидроксифенилглицин и фенилаланин, ХНФ на основе **21** позволяла эффективно разделять перхлоратные соли многих α -аминокислот в виде как свободных кислот, так и их метильных эфиров. В целом для ХНФ на основе полимера получали большие значения α и лучшие формы пиков.

На колонке, содержащей ХНФ-21 [43], наблюдалась сильная зависимость коэффициента разделения α от количества введенного на колонку образца. Для перхлоратной соли фенилглицина **25** максимальное значение α получали для 10,1 мг материала на колонке, содержащей 9,5 г ХНФ (табл. 7.3). Для меньших и больших величин образца значение α уменьшалось. Интуитивно можно было бы ожидать, что значение α будет уменьшаться с увеличением нагрузки в результате перегрузки колонки, однако, как ни странно, наблюдается уменьшение с уменьшением нагрузки. Для того чтобы объяснить это, следует понимать, что удерживание компонента в хроматографической колонке является результатом всех действующих процессов удерживания. Если два вещества, разделяемых на колонке, энантиомерны, то для них будут идентичными многие из процессов удерживания за счет сольватации. В действительности только часть общего процесса удерживания отличает энантиомеры. В случае ХНФ-20 и **21** образование комплекса хозяин — гость дает различие в удерживании энантиомеров. При увеличении размера образца, вводимого в колонку, вклад комплексобразования хозяин — гость в общее удерживание энантиомеров может уменьшаться благодаря насыщению всех доступных мест хозяина. Следовательно, значение α «ослабляется» большим вкладом остающихся механизмов удерживания, которые не влияют на хиральное распознавание. Уменьшение значения α при введении малых образцов может быть обусловлено совершенно другими явлениями.

Разумно предположить, что не все места-хозяева обладают одной и той же степенью хирального распознавания. Если наиболее удерживающие места имеют более низкую степень хирального распознавания, чем менее удерживающие места, то при введении «малых» образцов может наблюдаться уменьшение значений α , поскольку наибольшая часть удерживания происходит на менее эффективных местах

Препаративное разделение двух производных аминокислоты ранее неизвестной конфигурации **22** и **23** было проведено на колонке (600×7,5 мм), содержащей ХНФ-21 (табл. 7.3). Хотя

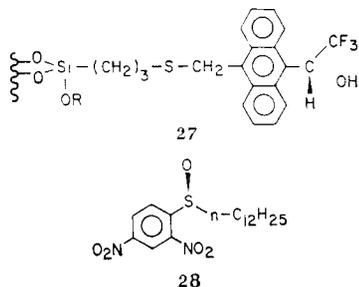


для образца, содержащего 9,5 мг, получали разделение до нулевой линии, для больших образцов (57 и 75 мг) получали перекрывающиеся полосы. При крупномасштабном разделении были собраны три фракции, содержащие наименее удерживаемый энантиомер, смесь и наиболее удерживаемый энантиомер. Средние фракции ряда опытов были собраны и вновь введены в колонку. Таким образом, были получены чистые энантиомеры для полного спектрального анализа. Из спектров циркулярного дихроизма и из порядка элюирования при хроматографировании энантиомеров **22** и **23** были определены их полные конфигурации. Таким же образом в результате двух проходов при разделении 25 мг каждого из метильных эфиров фенилглицина **24** были получены 20 мг *d*-изомера (96,9% э.и.) и 18 мг *l*-изомера (99% э.и.). При разделении перхлоратной соли аланина **26** было получено 6,1 мг *l*-энантиомера (89,8% э.и.) и 5 мг *d*-энантиомера (95,2% э.и.). При этом было проведено 5 опытов, в каждом из которых разделяли 5 мг. Собранные при первом разделении фракции вновь вводили в колонку, пока не получили названных выше количеств.

Хотя для получения ХНФ **20** и **21** требуется сравнительно длинный синтез, они стабильны и могут быть использованы в течение длительного периода времени. Ожидаемое время жизни этих ХНФ и коэффициент разделения, получаемый на **21**, в частности, оправдывает трудности и стоимость приготовления этих фаз. Однако эта ХНФ обладает низкой эффективностью в смысле ее хроматографического поведения. Хроматографические полосы широкие, и, следовательно, даже в случае больших α и низких скоростей потока трудно получить полное разделение в препаративных опытах. Это может быть обусловлено кинетическими аспектами образования комплекса гость — хозяин (т. е. медленным процессом адсорбции и десорбции). Следовательно, для получения максимальной эффективности на этих ХНФ необходимо использовать низкие скорости и относительно небольшие количества образца.

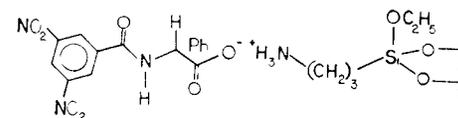
7.5.3. Карбинольные ХНФ

Первые ХНФ, полученные Пирклом и сотрудниками, были основаны на модели априорного хирального распознавания, которая объясняла как разделение, так и порядок элюирования ряда энантиомеров сульфоксида. Эти ХНФ **27** на основе производных фтороспиртов разделяют сульфоксиды, лактоны и производные аминов, аминокислот, спиртов и меркаптанов, содержащих кислотные функциональные группы [45]. Препаративно разделили 5 мг 2,4-динитрофенилдодецилсульфоксида **28** на колонке (250×10 мм), содержащей ХНФ **27**, привитую к нерегулярным частицам силикагеля размером 10 мкм. В качестве подвижной фазы использовали 20% раствор изопропилового спирта в гексане. Было получено разделение до нулевой линии ($\alpha=1,26$). Вероятно, другие рацематы, имеющие сравнимые значения α , могли бы быть расщеплены в аналогичном или большем масштабе, так как не наблюдалось перегрузки колонки.



7.5.4. Аминокислотные ДНБ

ХНФ, полученные на основе фтороспиртов, позволяют легко оценивать другие хиральные молекулы в качестве потенциальных ХНФ. Хиральное распознавание является взаимным. Поэтому неподвижная фаза, приготовленная соответствующим образом, с использованием одного энантиомера, полученного на ХНФ **27** должна разделять энантиомеры аналогов фтороспирта **30**. В этом смысле 3,5-динитробензоилпроизводные (ДНБ) аминокислот являются, видимо, подходящими для создания ХНФ. ХНФ **29**, приготовленная путем образования ионной связи 3,5-динитробензоилфенилглицина с γ -аминопропилсилилизированным кремнеземом [46], оказалась очень удачной и в настоящее время является коммерчески доступной [47]. Эта неподвижная фаза разделяет энантиомеры многих функционально различных классов веществ [48, 49]. Простое приготовление на основе легкодоступных хиральных материалов делает ее перспективной для использования в крупномасштабных препаративных системах.



29

На колонке 76×5,1 см (внутр. диаметр), содержащей хиральный адсорбент **29**, привитый к нерегулярным частицам силикагеля размером 40 мкм, можно разделять мультиграммовые количества различных по структуре хиральных соединений [50], примеры приведены в табл. 7.4. Обычно в одном опыте расщепляют 1 г или более рацемата, используя подвижную фазу такой полярности, чтобы общее время разделения не превышало 6 ч. Препаративное расщепление 1 г рацемата является рутинным в случаях, когда значение α равно по меньшей мере 1,3. При больших значениях α можно разделять большие количества за один проход. Например, разделение почти до нулевой линии получили для 3,0 г амида **33а** (рис. 7.4). Рутинным способом получали оба энантиомера с энантиомерным избытком по меньшей мере 96%. Из-за размытия заднего фронта хроматографических пиков зона, элюируемая первой, имеет обычно больший энантиомерный избыток (например, 99%), чем вторая (около 95%), причем действительные значения зависят от точки отбора двух пиков. 7 г амида **33б** ($\alpha=2,23$) расщепили за один проход. При сборе трех фракций внутренняя, или средняя, фракция содержала менее чем 5% всего количества материала, причем оба энантиомера были получены с чистотой более 99% (э. и.)

Таблица 7.4. Preparative расщепление рацематов на ХНФ 29^a (в граммовых количествах)

Соединение	R	Масса, г	α	Изопропанол в гексане, %
30a	H	1,0	1,46	2
30б	CH ₃	1,0	1,47	5
30в	CH ₃	2,0	1,47	5
31		1,0	1,86	5
32a	H	1,2	1,56	10
32б	CH ₃	1,1	1,68	10
33a	-изопропил	3,0	2,17	2
33б	-циклогексил	7,0 ^б	2,23	1
31		5,0	1,55	2
35		4,0	2,00	2

^a Колонка 76,2×5,1 см, содержит ХНФ 29 (частицы 40 мкм); скорость потока 55 мл/мин. Детектор УФ.

^б Для того чтобы получить две фракции высокой чистоты (см. текст), собрали между хроматографическими пиками и отбросили небольшое количество материала (менее 5%).

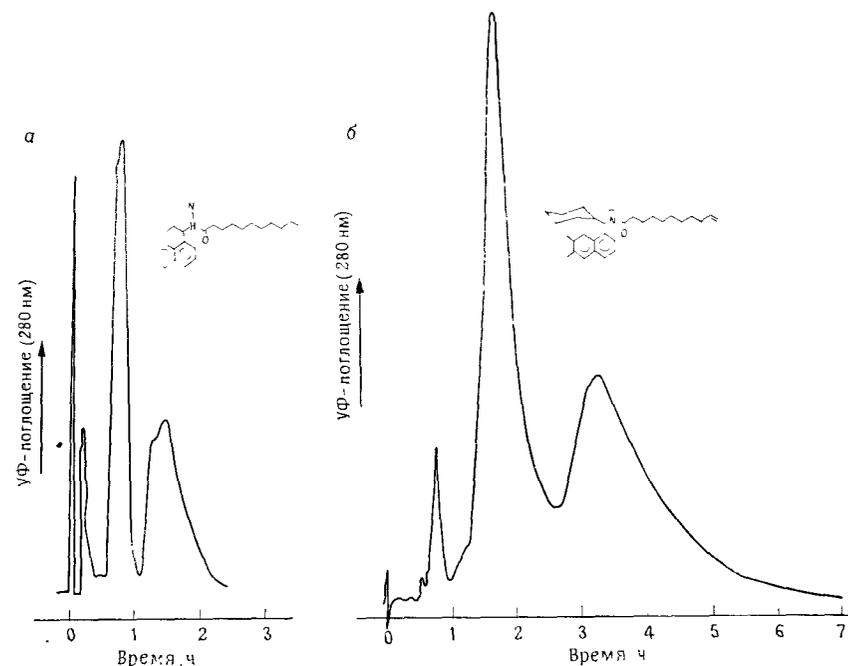


Рис. 7.4. Preparative расщепление в граммовых количествах хиральных амидов 33a и 33б на колонке, содержащей ХНФ 29. Колонка: 76,2×5,08 см, частицы нерегулярной формы размером 40 мкм; скорость потока: 60 мл/мин, детектор УФ, $\lambda=280$ нм. а — расщепление 3 г рацемата 33a (подвижная фаза: 2% изопропанола в гексане); б — расщепление 7 г рацемата 33б (подвижная фаза: 1% изопропанола в гексане).

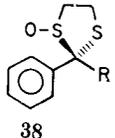
(рис. 7.4). Значительное энантиомерное обогащение может быть получено даже для еще больших образцов хорошо разделяемых соединений или для умеренных количеств материалов, имеющих меньшие значения α . В случае неполного разделения материал с высокой энантиомерной чистотой может быть получен либо с использованием циркуляционной техники, либо просто с помощью сбора большего числа фракций. При автоматизации хроматографической системы разделение могут выполняться без вмешательства оператора и разделяемые материалы могут быть автоматически объединены и сконцентрированы. Например, 14 г рацемического спирта 30a расщепили полностью в течение 16 ч за 4 прохода. Сбор фракций и ввод образца осуществлялся в соответствии с предварительно заданной программой.

Для того чтобы осуществлять хроматографическое разделение мультиграммовых образцов, требуется хроматографическая система большого масштаба. Можно обратиться к системам

среднего давления, используемым для предварительных разделений. Насос, работающий в автоматической системе, способен создавать скорости потока, превышающие 200 мл/мин, при давлении до 1,4 МПа. При работе с вышеупомянутой препаративной хиральной колонкой 76,2×5,1 см использовали скорость потока, равную примерно 60 мл/мин. Эта система, позволявшая вводить образец, следить за элюентом, детектировать и собирать хроматографические полосы, дистиллировать и повторно использовать растворитель, была описана прежде [24]. Для многих применений достаточно иметь только миллиграммовые количества разделенного материала. В этих случаях более подходящими являются полупрепаративные колонки, заполненные адсорбентами с малым размером частиц, и широко доступное оборудование для ЖХ. Такие аналитические колонки большого размера обычно показывают намного большую хроматографическую эффективность, чем препаративные колонки среднего давления, и позволяют разделять миллиграммовые количества соединений, имеющих значения $\alpha=1,1$. Опять-таки, соединения с меньшими значениями α могут быть разделены путем техники циркуляции.

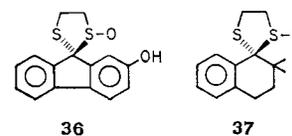
Полупрепаративная колонка размером 250×10 мм (внутр. диаметр), содержащая ХНФ 29, была первоначально использована для получения энантимерно обогащенного образца циклических сульфоксидов для ЯМР и изучения циркулярного дихроизма [51]. Первоначально материал, используемый для насадки, представлял собой силикагель нерегулярной формы со средним размером частиц 10 мкм. Следовательно, эта колонка не является такой эффективной, как соответствующие коммерческие варианты, в которых в качестве носителя используется сферический силикагель размером 5 мкм. Однако для начального применения (ЯМР-определение абсолютной структуры конфигурации) было желательно иметь обогащенный образец, в котором оба энантиомера присутствовали в соотношении 2:1. Так как не требовалось полное расщепление, то образцы сульфоксидов 36 и 37 с достаточным обогащением были получены путем введения 100 мг сульфоксида в колонку и сбора двух примерно равных фракций. Даже при этой комбинации, когда вводили большой образец, при наличии среднего коэффициента разделения ($\alpha \approx 1,25$) и достаточно низкой эффективности колонки (см. выше) были получены образцы примерно с 50% э.и. Для изучения спектров циркуляционного дихроизма 5 мг каждого рацемата полностью расщепили за один проход. На этой колонке расщепили 7,5 г сульфоксида 38e, причем первая фракция содержала 3,5 мг менее удерживаемого энантиомера (93,7% э.и.) и вторая — 4 мг более удерживаемого энантиомера (72,2% э.и.).

Таблица 7.5. Расщепление 2-фенил-2-алкил-1,3-дитиолан-1-оксидов на ХНФ [29]^a

Вводимое вещество	R	α
 38	а	H
	б	—CH ₃
	в	—CH ₂ CH ₃
	г	—CH(CH ₃) ₂
	д	Циклогексил
		1,05
		6/р ^б
		1,06
		1,26
		1,36

^a Колонка: 25×0,46 см (внутр. диаметр), содержащая ХНФ 29 на сферических частицах размером 5 мкм; подвижная фаза: 5% изопропанол в гексане; скорость потока: 2 мл/мин, детектор УФ ($\lambda=254$ нм).

^б Сокращение б/р (без расщепления) указывает на отсутствие расщепления, но наблюдалось уширение пика.



Сульфоксиды 38a—д в количестве от 1 до 5 мг расщепили для целей хиральнооптических измерений с использованием аналитической колонки 250×4,6 мм (внутр. диаметр), содержащей фазу ХНФ 29, привитую к сферическим частицам силикагеля размером 5 мкм [52]. Для сульфоксидов 38a и 38в—д было получено разделение энантимеров до нулевой линии при величинах образцов рацемата менее 1 мг (табл. 7.5). Для всех соединений, кроме 38б, было получено почти полное расщепление для образцов, содержащих 1—5 мг, путем подходящего выбора содержания 2-пропанола в подвижной фазе. Для 38б наблюдалось только расширение хроматографического пика после одного прохода. Путем циркуляции соединения 38б через колонку в течение 4 циклов и последующего сбора двух фракций было получено обогащение обоих энантимеров (25% э.и.).

Недавно Вимс и Янд [53] использовали аналитическую колонку этого типа для разделения тетрагидродиолов 39—41 ($\alpha=1,16, 1,18$ и $1,17$ соответственно) для исследования циркулярного дихроизма. Эти исследования явно демонстрируют, что хиральные аналитические ЖХ-колонки могут эффективно разделять количества веществ, достаточные для оптических исследований хиральных соединений.

Таблица 7.6. Сравнение хроматографического расщепления 2,2,2-трифторо-1-(9-антрил)этанола **30a** на аналитической колонке^а, содержащей хиральную неподвижную фазу **42**, при вводе образцов различного размера

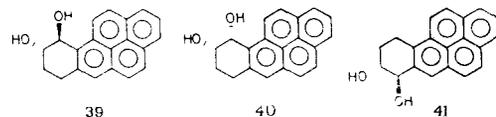
Масса образца ^г , мг	Скорость потока ^б , мл/мин	k'_1	k'_2	α	R_s	n_1^B	n_2^B
0,001	1	8,18	11,76	1,44	4,26	3180	4016
0,30	1	7,63	10,93	1,43	2,30	1058	1035
2,00	2	6,40	9,22	1,44	1,41	471	356
4,00	2	6,10	8,79	1,44	1,14	353	235
16,00	2	5,58	7,14	1,28	0,50	246	83

^а Аналитическая колонка размером 250×4,6 мм (внутр. диаметр) содержала фазу Regis Pirkle Covalent Phenylglycine. Элюат контролировали УФ-детектором при 254, 290 или 364 нм.

^б Подвижная фаза: 2%-ный раствор изопропанола в гексане.

^в n_1 и n_2 — число теоретических тарелок, рассчитанное по пику 1-го и 2-го энантиомера.

^г Дозированные объемы все были меньше 20 мкл, за исключением последнего случая, когда объем составлял 75 мкл.



Было детально исследовано [55] разделение 2,2,2-трифторо-1-(9-антрил)этанола **30a**, широко используемого хирального сольватирующего агента для ЯМР-исследований [54] на аналитической колонке, содержащей 3,5-динитробензоилфенилглицин, ковалентно связанный с аминопропилсилилизированным силикагелем **42**. Аналитические данные были использованы для точного определения оптимальных условий разделения 100 мг соединения **30a** на аналогичной полупрепаративной колонке. Данные, приведенные в табл. 7.6, были получены с использованием коммерчески доступной аналитической колонки 250×4,6 мм (внутренний диаметр) [47]. Изменение массы образца более чем на 5 порядков незначительно влияет на коэффициент разделения α . Уменьшение α от 1,44 (1 мкг образца) до 1,28 (16 мг образца) обусловлено большой перегрузкой, на что указывает резкое уменьшение числа тарелок n . На разрешение R_s и фактор емкости k' влияет масса образца, и оба параметра уменьшаются заметно с увеличением введенного образца. Для препаративной работы наиболее важен фактор разрешения R_s , являющийся единственным индикатором эффективности разделения. Для того чтобы расщепить значительные количества рацемата, лучше работать в условиях перегрузки колонки по массе, оптимизируя размер образца с тем, чтобы получить необходимое

Таблица 7.7. Препаративное расщепление хирального спирта **30a** на полупрепаративной колонке^а

Масса введенного образца, мг	α	R_s	% (э.и.) ^в	
			энантиомер, элюируемый первым	энантиомер, элюируемый вторым
25	1,43	1,10	98	98
25 ^б	1,31	0,76	>99,7	74
92	1,44	0,61	97	83

^а Колонка 250×10 мм (внутр. диаметр), заполненная фазой Regis Pirkle Covalent Phenylglycine. Элюент: 2% изопропанола в гексане; скорость подвижной фазы, 5 мл/мин; детектирование: УФ при 280 нм

^б Объем вводимого образца: 10 мл, в остальных случаях 400 мкл

^в Энантиомерный избыток определяли хроматографически на аналитической колонке.

разрешение R_s . Для больших образцов было эмпирически найдено, что существует примерно линейная зависимость между логарифмом массы образца и коэффициентом разрешения R_s . Было рассчитано путем экстраполяции, что на аналитической колонке значению $R_s=1$ соответствует масса 5,4 мг образца рацемата карбинола **30a**. Если пики имеют гауссову форму и фракции собирают с равной чистотой, то оба энантиомера карбинола должны быть получены с чистотой 98% [2, 56]. Такой подход является чрезмерно упрощенным, так как в препаративной работе используют условие перегрузки, и неизбежно будет наблюдаться размывание хвоста пика. Тем не менее это приближение служит в качестве разумной начальной точки определения оптимальных условий препаративного опыта.

Данные, полученные на аналитической колонке, были использованы для установления примерных условий разделения на полупрепаративной колонке большего диаметра (250×10 мм), содержащей в 4,7 раза больше ХНФ. Все условия аналитического эксперимента были в точности воспроизведены: объемная скорость потока была увеличена для достижения сравнимой линейной скорости потока, и размер образца был увеличен в 4,7 раза. Рассчитывали при введении 25 мг образца получить значение $R_s=1$. Как видно из табл. 7.7, препаративное разделение оказалось несколько более эффективным: $R_s=1,1$. Части из двух собранных фракций были проанализированы на аналитической колонке, и было найдено, что каждый энантиомер имеет чистоту 98% э.и. Общий результат аналогичного разделения 92 мг материала был хуже, хотя первый энантиомер был получен все-таки с чистотой 97% э.и. Наибольший выход был достигнут при использовании размера образца, позволяющего получать $R_s \approx 0,6$. При этом собирали первую полосу и подвер-

гали циркуляции второй энантиомер, чтобы получить его также с высокой энантиомерной чистотой. Для соединений, имеющих большие значения α , можно разделить еще большие количества материала за один проход. Наиболее часто встречающиеся ограничения могут быть связаны с ограниченной растворимостью рацемата в необходимом объеме вводимого растворителя.

Для препаративной работы нет необходимости вводить образец в большом объеме. Для больших значений α объемная перегрузка может даже иметь преимущества [57]. Было исследовано разделение хиральных спиртов **30a** в условиях объемной перегрузки, причем вводили 25 мг образца в 10 мл растворителя и сравнивали с рассмотренным выше разделением, когда вводили 400 мкл образца. Хотя значения α и R_s изменялись при вводе пробы в больших объемах, путем разумного выбора точки деления между двумя фракциями удалось получить первый энантиомер с чистотой более 99% э.и. (табл. 7.7). Из полученных значений и вида хроматограммы очевидно, что две фракции имели бы чистоту менее 98%, если бы была выбрана точка отбора, при которой обе фракции имели бы одинаковую чистоту.

Preparativное расщепление карбинола **30a** не является единственным случаем для этой колонки. Фактически каждый исследованный рацемат, имеющий достаточное значение α для величины образца, используемой в аналитической хроматографии, может быть препаративно разделен. Наиболее важными параметрами, влияющими на разделение (например, R_s) являются значение α , количество образца, подлежащее разделению, и размер колонки. ХНФ **42**, привитая к частицам сферического силикагеля размером 5 мкм, до нагрузки примерно 5 мг разделяемого вещества на 1 г сорбента имеет значение α , не зависящее от размера образца. Поэтому количество материала, которое можно разделить на данной препаративной колонке, может быть достаточно точно определено из поведения соединения при аналитическом разделении. Неподвижная фаза **42** обладает также хорошими кинетическими свойствами, допускающими достаточно высокие скорости потока. Для описанных выше полупрепаративных колонок используют скорость потока от 5 до 8 мл/мин и устанавливают полярность подвижной фазы таким образом, чтобы получить полное препаративное разделение примерно за 1 ч.

Та же полупрепаративная колонка была использована для разделения сульфоксида **37**, фталида **43**, diaзепинона **44** и гидантоина **45** (табл. 7.8). Интересно, что, хотя значения α , наблюдаемые для всех соединений, кроме сульфоксида, выше, чем для карбинола **30a**, разделение до нулевой линии нельзя получить, если вводить больше 25 мг каждого соединения. Другими словами, скорость искажения формы полосы с увеличением об-

Таблица 7.8. Preparativное расщепление на полупрепаративной колонке, содержащей ХНФ **42**

Вводимое вещество	Масса, мг	α	R_s	% э.и.		Содержание изопропанола в гексане, %
				Высокое R_f	Низкое R_f	
37	16	1,19	0,48	>99	50,3	10
	4	1,28	1,17	>99	96,3	10
	~10 ^a	1,18	0,76	>99	96,0	10
43	40	1,64	0,44	99,4	82,3	7,5
44	25	1,96	0,98	97	89	2
	50	1,94	0,65	>99 ^b	89 ^b	2
45	25	1,52	0,58	>99	84,6 ^b	7,5

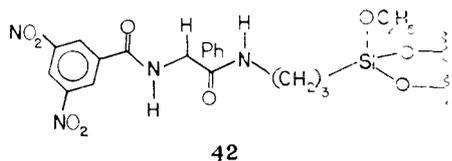
^a Обогащенный материал с низким R_f из опыта с массой образца 16 мг был повторно хроматографирован для получения двух энантиомеров с энантиомерным избытком >96%.

^b Небольшая часть из области наложения пиков, составляющая менее 5% общего количества, отброшена с целью получения более высокого обогащенного энантиомерного материала.

разца каким-то образом, очевидно, увеличивается параллельно возрастанию величины α . Отсюда следует, что количество вещества, которое можно разделить в случае соединений, имеющих большие значения α , может быть меньше, чем то, которое ожидают на основе величины α , полученной из аналитического опыта. Тем не менее 50 мг diaзепина **44** эффективно разделили, собирая три фракции, причем средняя фракция содержала менее 5% от общего количества материала. Чистота первой и последней фракций была эквивалентна в пределах экспериментальной ошибки чистоте двух фракций, собранных при опытах с разделением 25 мг. С точки зрения общей производительности

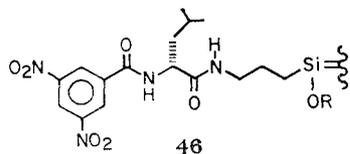
выгодно вводить большие объемы образца и собирать среднюю фракцию. В случае ценных рацематов средняя фракция может быть рехроматографирована.

Сульфоксид **37**, который имел коэффициент разделения 1,21 на аналитической колонке, содержащей **42**, расщепили на аналогичной полупрепаративной колонке. Это разделение демонстрирует преимущества сочетания двух пробегов для получения максимального количества материала за наименьшее время; в частности, эта методика полезна для соединений, имеющих небольшие значения α . Для того чтобы получить оба энантио-



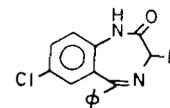
мера с чистотой более 96% э.и. в одном расщеплении, можно ввести только 4 мг рацемата. В то же время 16 мг частично разделили с разрешением $R_s=0,48$, причем первый энантиомер был получен с чистотой более 99% э.и., а второй был частично обогащен до 50,3% э.и. При рехроматографировании частично обогащенного энантиомера были получены две новые фракции: первый энантиомер (>99% э.и.) и более сильно удерживаемый энантиомер (96% э.и.). Таким образом, за два пробега были разделены 16 мг материала. Для того чтобы получить энантиомеры той же степени чистоты за одно разделение, потребовалось бы 4 отдельных опыта с введением 4 мг рацематов в каждом.

Была приготовлена аналогичная полупрепаративная колонка, содержащая ХНФ на основе производных L-лейцина **46**. Как правило, она обладает более высоким коэффициентом разделения при разделении энантиомеров диазепинонов. Следовательно, на **46** могут быть расщеплены большие количества этих рацематов, чем на **42**. Например, 100 мг диазепинонов **44**, **47** и **48** были расщеплены на полупрепаративной колонке с лейцином за



общее время 1 ч (табл. 7.9). Разделение до нулевой линии соединения **47**, показанное на рис. 7.5, подтверждает, что могли быть разделены еще большие количества образца. При сравнении результатов, полученных для разделения диазепинона **44**

Таблица 7.9 Препаративное расщепление бензодиазепинонов на полупрепаративной колонке, содержащей ХНФ **46**^a



Вводимое вещество	R	Масса, мг	α	R_s	% э. и.	
					Высокое R_f	Низкое R_f
44	—CH(CH ₃) ₂	100	3,10	0,56	>99 ^b	98,4 ^b
47	—CH ₂ O	95	3,14	0,93	>99	98,6
48	—CH ₂ CH ₂ SCH ₃	104	2,61	0,68	99,3	97,2

^a Колонка 250×10 мм (внутр. диаметр), содержащая ХНФ **46** на частицах силикагеля нерегулярной формы размером 10 мкм. Подвижная фаза: 5% изопропанола в гексане; скорость потока: 5 мл/мин; детектор: УФ (при 340 нм).

^b Подвижная фаза: 7,5% изопропанола в гексане. Для достижения более высокой энантиомерной чистоты часть элюата из области наложения пиков (менее 5% общей массы вещества) отброшена.

(табл. 7.8 и 7.9), видно, что выход за единицу времени в значительной степени зависит от конструкции ХНФ. Дальнейшие успехи в конструировании ХНФ в сочетании с использованием улучшенных носителей, как можно ожидать, приведут к получению достаточно эффективных хиральных полупрепаративных колонок.

ХНФ **29**, **42** и **46**, приготовленные на основе ДНБ-производных аминокислот, способны разделять буквально тысячи рацемических соединений [46—53, 58—60], причем на них возможно препаративное разделение многих соединений, которые до сих пор не удавалось разделить и исследовать. Заслуживает упоминания ряд ХНФ на основе соответствующих производных аминокислот, который, насколько нам известно, не был использован для препаративного разделения, хотя имеет потенциальные возможности для этого. Упомянутый ряд ХНФ готовится на основе γ -аминопропилсиланизированного силикагеля. Этот носитель, хотя, вероятно, и не является оптимальным, позволяет синтезировать эффективные колонки, обладающие сравнительно большим числом теоретических тарелок.

Первая ХНФ этого типа содержит N-3,5-динитрофенил-L-аланин, ковалентно связанный с γ -аминопропилсиланизированным силикагелем через амидную связь. Эта ХНФ была использована для разделения гептагелицена ($\alpha=1,06$) и L-аза[6]гелицена ($\alpha=1,06$) [61]. Даже на аналитическом уровне коэффициент разрешения R_s был менее 0,6 для обоих компонентов. Для

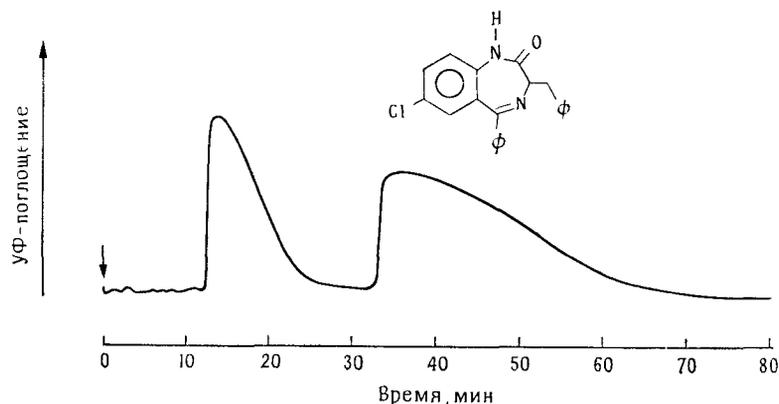


Рис 7.5 Preparative расщепление 95 мг рацемата 47 на колонке 250×10 мм ($d_{\text{внутр}}$), содержащей ХНФ 46 на основе *l*-лейцина (размер частиц ~ 10 мкм); скорость потока 5 мл/мин, подвижная фаза: 5%-ный изопропанол в гексане, давление 5,6 МПа

приготовления ХНФ широко применяются *N*-ацилпроизводные аминокислот. При сравнении разделяющей способности *N*-ацилпроизводных *L*-валина Хара и соотр. [62] установили, что *N*-формил-*L*-валиламинопропилсиланизированный силикагель должен быть наилучшим для разделения производных аминокислот [62]. Был получен коэффициент разделения 1,2—1,38 для *tert*-бутиловых эфиров *N*-ацетиламино кислот. Недавно, Аканья и соотр. [63] сравнили ХНФ, полученные на основе различных *N*-формиламинокислот (лейцин, изолейцин, фенилаланин, пролин и валин), и нашли, что фазы, полученные на основе изолейцин- и валинпроизводных, обладают коэффициентами разделения $>1,6$ для рацемического *N*-ацетиллейцин *tert*-бутилового эфира [63].

7.5.5. Хиральные винилполимеры

Окамото и соотр. [64] изготовил винильный полимер из трифенилметилметакрилата 49, имеющего спиральную полимерную цепь. Изотактический полимер с высоким оптическим вращением получен путем полимеризации с хиральными анионными катализаторами, такими, как (*R*)-*N*-(*L*-фенилэтиланилид)литий или (—)-спартаин-бутиллитиевый комплекс. Полученный хиральный полимер использовали для приготовления ХНФ, способных разделять хиральные ароматические углеводороды и соединения, обладающие ароматическими группами, примыкающими к хиральным центрам. Вероятно, кооперативное поведение спирально расположенных трифенилметильных групп приводит

Таблица 7.10 Расщепление рацематов на аналитической колонке, содержащей ХНФ 49

Вводимое вещество	Значение α	
	Мелко раздробленный полимер ^а	Силикагель с нанесенной ХНФ ^б
Би- β -нафтол	2,13	2,37
3 <i>trans</i> -Стильбенноксид	2,17	5,21
1 Основание Трёгера	1,17	—
50 Гексагелицен	>13	>50

^а Колонка $250 \times 4,6$ мм (внутр диаметр) заполнена раздробленным и фракционированным полимером 49 (размер частиц 20—44 мкм), подвижная фаза: метанол, скорость потока: 0,72 мл/мин

^б Колонка $250 \times 4,6$ мм (внутр диаметр) заполнена силикагелем с привитой фазой, на который нанесен растворимый полимер 49, подвижная фаза метанол, скорость потока: 0,5 мл/мин

к хиральному распознаванию соответствующих соединений, возможно, в результате процесса включения. Расщепление рацемической смеси гексагелицена на оптически активном полимере с (+)-вращением приводит к удерживанию (+)-энантиомера, который имеет такую же спиральность, как неподвижная фаза. В общем соединения, которые имеют правую спиральность (или *P*-спиральность) по отношению к их ароматическим группам, удерживаются предпочтительно на ХНФ с *P*-спиральностью [64б].

Первые ХНФ на основе (+)-политрифенилметилметакрилата 49, нанесенного на подложку из мелкоизмельченных частиц (20—44 мкм) нерастворимого полимера, дали наилучшие результаты при использовании в качестве подвижной фазы метанола, а не гексана. Например, для основания Трёгера значение α равно 1,37 для гексана и 1,77 для метанола. Улучшенная ХНФ может быть получена при покрытии дифенилметилсиланизированного силикагеля низкомолекулярным растворимым полимером 46. Хотя имеется несколько случаев, когда первая ХНФ дает лучшие разделения, в большинстве случаев колонки, содержащие ХНФ на основе силикагеля, имеют более высокие значения α , меньшие времена удерживания и большее число теоретических тарелок [64г]. Для сравнения в табл. 7.10 приведено несколько примеров.

ХНФ 49, конечно, является потенциальной фазой для preparative расщепления значительных количеств некоторых рацематов. Однако, насколько нам известно, имеется только два сообщения о preparative разделении на этой ХНФ [65, 66]. Полиядерный ароматический углеводород 1,4-диметилгексагели-

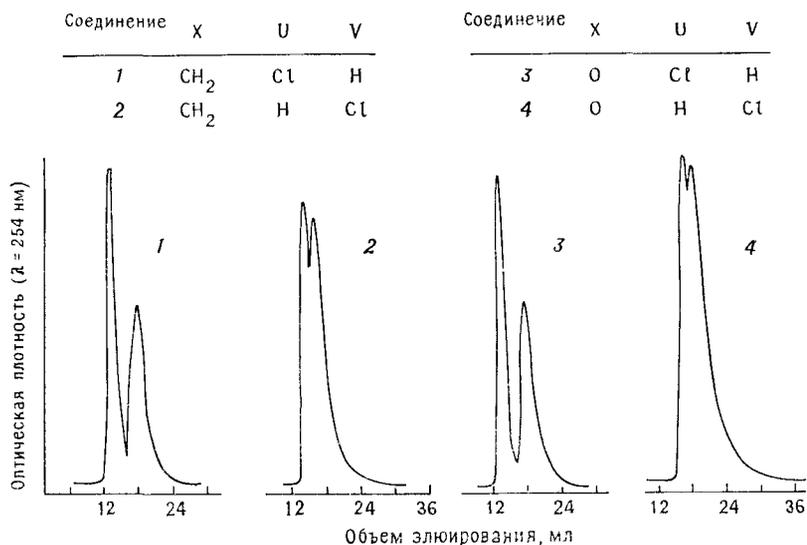
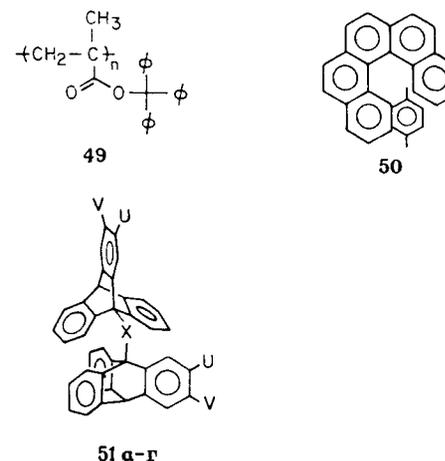


Рис. 7.6. Расщепление аналитических образцов *d,l*-изомеров **51a—г**. Соединения 1—4 соответствуют **51a, б, в и г** [66].

цен **50** был расщеплен с использованием мелкоизмельченного полимера, упакованного в стеклянную трубку 50 мм×12 мм (внутр. диаметр) [65а]. В случае гаксана в качестве подвижной фазы за один проход частично расщепили 400 мг рацемата. Объединяя первые фракции ряда опытов (в конечном счете в колонку было введено 6,4 г материала), получили 2,3 г (—)-энантиомера с 12% э.и. Исследователи недавно улучшили результаты расщепления хиральных краун-эфиров, используя ХНФ на основе силикагеля и метанол в качестве элюента [65б].

Новые энантиомеры соединений типа «зубчатой передачи» **51a—г** расщепляли на микропористом силикагеле, покрытом ХНФ **49** [66]. Аналитические хроматограммы, показанные на рис. 7.6, демонстрируют почти полное разделение **51a** и **51b**. При препаративном разделении 0,5 мг субстрата на колонке размером 250×7,2 мм (внутренний диаметр) при использовании метанола в качестве подвижной фазы и скорости потока 3 мл/мин получили менее удерживаемый энантиомер с высокой оптической чистотой. Удерживаемые энантиомеры очистили при повторном хроматографировании. Однако соединения **51b** и **51г** было трудно получить в энантиомерно обогащенной форме даже после повторного хроматографирования из-за малых коэффициентов разделения. Вероятно, препаративные количества соединений, которые имеют более высокое значение α (например, гелицены), можно было бы легко расщепить на этой ХНФ.



Полимеры, содержащие хиральные полости с функциональными группами, расположенными стереоспецифически, могут быть получены при полимеризации в присутствии хиральной полости. Используя производные сахара в качестве шаблонов, Вульф и сотр. [67] приготовили сополимерную ХНФ, взяв хиральный 4-винилборный эфир в качестве одной из мономерных единиц и затем (чтобы получить хиральные полости, содержащие функциональные группы борной кислоты) удалив хиральный шаблон путем гидролиза. Эта полимерная ХНФ может расщепить вещество, используемое в качестве шаблона — 4-нитрофенилманнопиранозид, с максимальным коэффициентом разделения 2,27. Однако низкая емкость и эффективность этой ХНФ ограничивает ее использование для препаративной работы. Даже при аналитическом разделении, упомянутом выше, не было получено разделения до нулевой линии из-за размывания пиков и довольно низкого числа теоретических тарелок (например, менее 100 т. т. на 1 м).

7.5.6. Полиамидные ХНФ

Полиметилакриламидные и полиакриламидные ХНФ, приготовленные на основе хиральных аминов и эфиров аминокислот, как было показано, расщепляют определенные рацемические фармацевтические препараты, содержащие амид или амидную функциональную группу [4]. Разделяемые на этих ХНФ рацематы подбирали в некоторой степени эмпирически, причем каждый рацемат испытывали на различных замещениях полиамидных ХНФ. Никакая конкретная полиамидная ХНФ не обладала преимуществами во всех случаях, и, как заметил Блашке, «в экс-

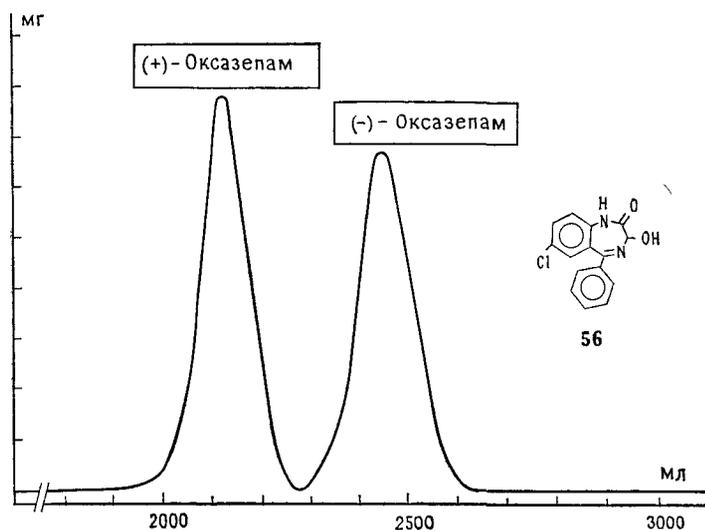
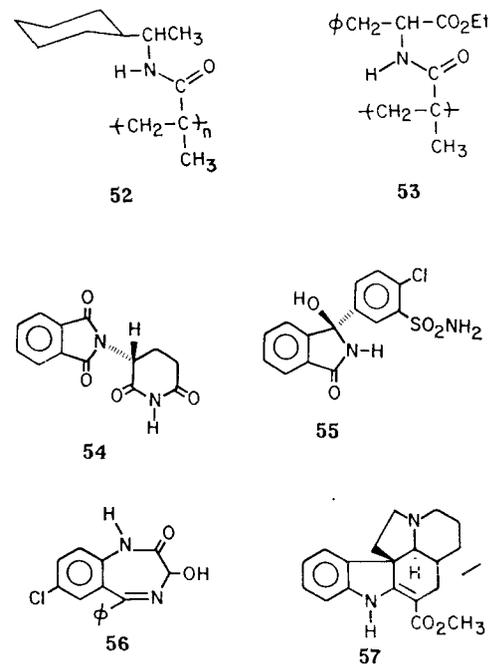


Рис. 7.7. Хроматографическое расщепление 45 мг оксазепам 56 на 250 г полиамида 53. Подвижная фаза: толуол/диоксан (1 : 1) [33, с. 1005].

периментах с новыми рацематами невозможно предсказать, на каком адсорбенте они будут расщеплены наилучшим образом» [4]. Дальнейшие сложности возникают в связи с тем, что способ приготовления полимерной ХНФ полностью зависит от ее эффективности с точки зрения хирального распознавания. Оптимизация достигалась с помощью систематического изменения условий полимеризации, причем исследовалась расщепляющая способность полученного полимера.

Для препаративных разделений, позволявших успешно расщеплять рацематы до нулевой линии, использовали две ХНФ 52 и 53 [33, 68—70]. При хроматографическом расщеплении 302 мг этилового эфира N-бензоилтирозина на колонке 650 × 25 мм (внутр. диаметр), содержащей 65 г ХНФ 52, получали две фракции со средней оптической чистотой 81%. Полное разделение до нулевой линии 500 мг талидомида 54 было возможно на той же колонке благодаря высокому коэффициенту разделения ($\alpha=2,0$), наблюдаемому для этого рацемата [69]. Полиакриламид 53, приготовленный из этилфенилаланата, был использован для расщепления хлорталидона 55 и оксазепам 56 [70]. Используя колонку 760 × 32 мм (внутр. диаметр), содержащую 250 г соединения 53, можно расщепить 530 мг хлорталидона. Психотропный оксазепам был также расщеплен на той же ХНФ. Из-за низкого значения α , равного 1,2, можно было разделить за один проход только 46 мг этого рацемата. Тем не

менее это расщепление великолепно демонстрирует пригодность метода, поскольку оксазепам расщепляется настолько легко, что это почти предотвращает использование нехроматографических методов (рис. 7.7) [33].



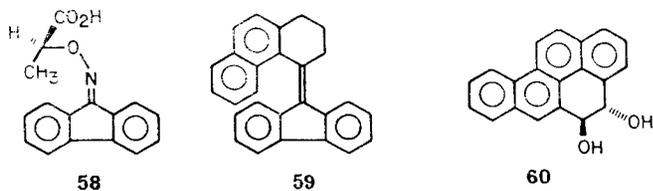
7.5.7. Циклодекстриновые полимеры

β -Циклодекстрины, циклические олигосахариды, состоящие из семи α -1,4-связанных единиц D-глюкозы, образуют комплексы включения с ароматическими соединениями в водной среде. Поскольку β -циклодекстрин является хиральным, включение энантиомерных гостей дает два диастереомерных комплекса. Различия в физических свойствах диастереомеров использовали для получения энантиомерно обогащенных образцов молекул гостей с помощью метода фракционной кристаллизации [71]. Водонерастворимые β -циклодекстриновые полимеры можно использовать в качестве ХНФ для расщепления рацематов. Колонка 820 × 10 мм (внутр. диаметр), содержащая большие частицы (100—400 мкм) β -циклодекстринового полимера, была использована для частичного расщепления 100 мг метилманделата [72]. Низкая эффективность неподвижной фазы не позволила добиться хорошего общего разделения, хотя было получено

значение $\alpha=1,09$. Жадон и сотр. [73] расщепили 8 мг винкадиформина **57** на трех последовательно соединенных β -циклодекстриновых полимерных колонках, каждая 750×16 мм (внутр. диаметр). На цитратном буфере (рН 4) в качестве подвижной фазы при скорости потока 50 мл/ч время полного разделения составило 24 ч.

7.5.8. ХНФ 58

Оптически активная [2-(2,4,5,7-тетранитро-9-флуоренилиденаминоокси)пропионовая кислота] **58** была использована для приготовления ХНФ, с помощью которой расщепляли хиральные ароматические углеводороды [74—77]. Колонку, содержащую силикагель или оксид алюминия, обрабатывали *in situ* с помощью **58**; в результате получали колонку с носителем, покрытым ХНФ, которая расщепляла гексагелицен ($\alpha=1,11$ и $1,20$ для силикагеля и оксида алюминия соответственно) и его производные [74, 75]. На колонке с модифицированным таким образом оксидом алюминия Вайнберг и сотр. [76] разделили до нулевой линии хиральные по своей природе олефины **59**. Элюирование проводили смесью бензол — гексан (95:5), причем было выделено достаточное количество материала для определения удельного вращения этих прежде неизвестных соединений.



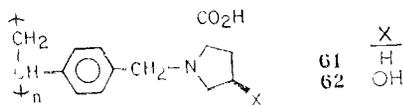
Гил-Ав и сотр. [74] сравнивали качество различных производных **58** и эффективность ХНФ, полученных путем их простого нанесения с помощью ковалентной прививки (через амидную связь к аминопропилсиланизированному силикагелю). Наивысшую эффективность и наилучшее разделение получили при нанесении самой кислоты **58**. На колонке $200 \times 2,3$ мм (внутр. диаметр) было получено 14 тысяч теоретических тарелок на 1 м по нафталину (подвижная фаза: гексан, $u=0,25$ см/с). Хотя о препаративном разделении на этой колонке сообщений нет, получили хорошее аналитическое разделение. Мутагенные и канцерогенные производные бенз[а]пиренов, такие, как диол **60**, разделили в аналитическом масштабе ($\alpha=1,31$) на (R)-(-)-изомере **58**, ковалентно привитой к силикагелю [77].

7.5.9. Лигандообменная хроматография

Лигандообменную хроматографию (ЛОХ) интенсивно использовали для аналитического разделения аминокислот и их производных [5]. Эти исследования привели к препаративному разделению аминокислот с использованием условий, найденных в аналитических разделениях. По существу имеются два варианта ЛОХ, причем первый включает хроматографическое разделение координационных комплексов металлов на ахиральных неподвижных фазах, а второй заключается в создании неподвижного хирального лиганда (ХНФ) для хроматографического разделения подвижных лигандов. В первом методе в подвижную фазу необходимо добавлять хиральные добавки; этот метод не применяют для препаративной работы, поэтому он не будет обсуждаться (см. выше). Были разработаны различные хиральные лиганды для создания ХНФ, подходящих для ЛОХ с использованием различных материалов насадки. Ниже будут рассмотрены их возможные применения для препаративных разделений.

Прямое разделение энантимеров с помощью ЛОХ зависит от образования диастереомерных координационных комплексов, состоящих из фиксированного или неподвижного лиганда, иона металла и хирального подвижного лиганда (т. е. вещества, которое должно быть разделено). Энантиоселективность является результатом образования смешанных комплексов с лигандами. Для того чтобы происходила дискриминация, эти комплексы должны значительно различаться по энергии и в то же время быть кинетически лабильными, чтобы проявлять способность к хроматографическому разделению. Следовательно, выбор фиксированного лиганда, иона металла, подвижной фазы (концентрации буфера, рН, концентрации иона металла и т. д.) и материала подложки — все вносит вклад в эффективность хроматографического процесса. Важность этих параметров для разделения энантимеров с помощью ЛОХ была рассмотрена в обзорной статье Давацковым [5].

Для аналитической работы были использованы различные полимерные носители, такие, как полиакриламиды, полиакрилаты, полиакриловые эфиры и полистиролы, привитые к силикагелю фазы, и липофильные неподвижные фазы, приготовленные путем нанесения липофильного хирального материала на алифатическую привитую фазу. До настоящего времени препаративные разделения выполняли почти исключительно на полимерных насадках. Однако материалы на основе силикагеля дают много преимуществ в смысле общей хроматографической эффективности и скорости. Первое сообщение об успешном расщеплении с помощью ЛОХ на L-пролине, привитом к хлорометилированному полистиролу **61**, приведено в работе [78].

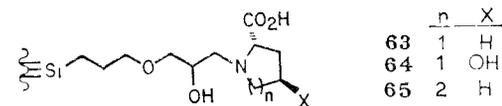


Приготовленная смола была насыщена ионами Cu^{2+} , упакована в колонку 475×9 мм (внутренний диаметр) и использована для разделения до пиковой линии 560 мг *d,l*-пролина. *l*-Изомер был элюирован водой, а оставшийся изомер элюирован с помощью 1 н. NH_4OH (рис. 7.8). Позднее Йозефович и согр. [79] сообщили о расщеплении 100 мг *d,l*-пролина с использованием аналогичной ХНФ и колонки тех же размеров. Время, необходимое для таких разделений, было очень большим (обычно 24—48 ч) из-за медленного процесса лигандного обмена и типа насадки (полимерные шарики большого размера). На большой колонке емкостью 1 л, содержащей 300 г ХНФ **61** (*l*-гидрокси-пролина, привитый к хлорометилированному полистиролу), расщепили 200 г *d,l*-пролина, а также 6 г *d,l*-треонина за один проход [80]. Вариант этой ХНФ с частицами меньшего размера применяли для одновременного радиохимического и энантиомерного расщепления радиохимически меченных аминокислот [81]. В идеальном случае методы очистки и разделения меченых соединений должны быть применимы к небольшим количествам материала, быть количественными и требовать небольшого времени. Приготовленные продукты с высокой радиохимической активностью являются дальнейшим ограничением с точки зрения возможных загрязнений и дезактивации разделяемых соединений под действием радиации. Меченный тритием валин был расщеплен менее чем на 2 ч путем достижения максимальной эффективности и минимального времени, требуемого для проведения одного разделения. Так как одновременно были нужны от 0,1 до 1 мг вещества, то процесс можно было оптимизировать за счет количества расщепляемого материала. Поэтому прямое хроматографирование является идеальным методом расщепления и очистки меченых соединений.

В недавнем прошлом большинство ХНФ на основе пролина и его аналогов готовили на силикагеле в качестве носителя. Прямое сравнение этих фаз затруднено многообразием используемых условий. Качество наблюдаемых разделений зависит от состава подвижной фазы, способа приготовления ХНФ, скоростей потока и т. д. По этим причинам, очевидно, аналогичные неподвижные фазы, приготовленные двумя различными исследователями, могут дать в значительной степени отличающиеся результаты. «Современные» насадки приводят к достижению более высокой хроматографической эффективности и меньших времен разделения для полного расщепления рацематов. Были

проведены систематические исследования, и была подтверждена возможность препаративных разделений.

Губиц и согр. [82] разработали ХНФ, состоящую из *l*-аминокислот, привитых через 3-глицидоксипропилтриметоксисилан к силикагелевому носителю. ХНФ **63—65** были использованы для расщепления большинства обычных аминокислот, причем ХНФ на основе *l*-пипеколовой кислоты **65** дала в целом наилучшие результаты. Эффективность до 3600 т.л. на 1 м была получена для закомплексованных лигандов на колонке длиной 25 см. Успех применения этих фаз был обусловлен, во-первых,



тем, что карбоксильная группа привитой аминокислоты свободна для образования комплекса с ионом металла и, во-вторых, гидроксильные группы в боковой цепи, образующиеся при раскрытии эпоксидных групп, способствуют улучшению хирального распознавания. Хотя роль гидроксильных групп еще не полностью понята, известно, что аналогичные фазы без таких гидроксильных групп либо очень слабо, либо совсем не разделяют энантимеры. Была продемонстрирована возможность использования таких ХНФ для препаративных работ. До 1,5 мг аминокислоты разделяли на аналитической колонке $250 \times 4,6$ мм (внутр. диаметр) без заметного уменьшения значений k' или разрешения.

К аминопропилсилилизированному силикагелю через амидную связь была привита также *l*-пролиновая ХНФ **66** [83, 84]. Хотя эта неподвижная фаза дает низкие коэффициенты разделения для триптофана, фенилаланина и тирозина [83], Линдер нашел, что она является эффективной для расщепления денатурированных производных аминокислот. Был получен коэффициент разделения 3,16 для замещенной аспарагиновой

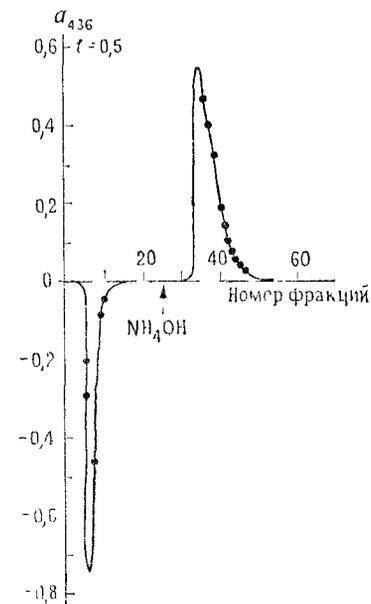
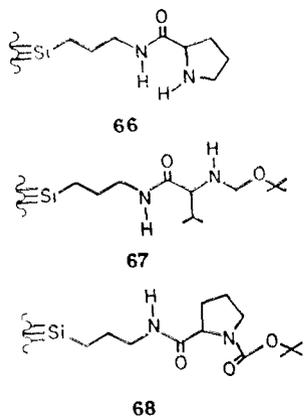
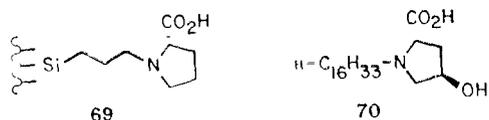


Рис. 7.8. Хроматография 0,5 г *dl*-пролина, с достижением в среднем в среднем оптического вращения фракций элюата [78a].

кислоты [84]. За исключением пролина, обычные аминокислоты могут быть разделены с помощью этой системы. Энгельгардт и сотр. [85] приготовили ХНФ на основе пролина и валина **67** и **68** соответственно для расщепления денсилпроизводных аминокислот. Полученные коэффициенты разделения менялись от 1 до 1,8. ХНФ на основе гистидина, привитого с помощью амидной связи, использовали для расщепления свободных аминокислот ($\alpha=1-1,9$) [86].



Две группы исследователей независимо приготовили ХНФ **69**, в которых γ -пролин привит в виде амна к γ -галогенопропилсиланизированному силикагелю [87, 88]. Хотя сообщения были посвящены механизму образования ХНФ, полученные коэффициенты разделения ($\alpha=1-4$) наводят на мысль о возможности препаративного применения.



Способ приготовления ХНФ путем нанесения ее на готовую колонку имеет много преимуществ при приготовлении хиральных колонок. К ним относятся легкость приготовления на основе коммерчески доступных колонок, возможность регенерации колонок, и, если это необходимо, регенерация разделяющего агента. При получении липофильных хиральных соединений нанесенные ХНФ могут быть приготовлены путем использования обычных обращенно-фазных колонок, содержащих алифатические привитые фазы. Даванков [89] расщепил немодифицированные аминокислоты с помощью системы, состоящей из обращенно-фазной псадки, покрытой N-алкил-1-оксипролином **70**.

Эта система позволила достичь наибольших коэффициентов разделения из известных до сих пор для ЛОХ аминокислот. При использовании условий обращенно-фазной хроматографии покрытые колонки не дают значительного истечения фазы и не меняют своей селективности по отношению к аминокислотным энантиомерам. Высокие коэффициенты разделения (до 16,4 для d,l-пролина), высокие эффективности (3000 т.т. для колонки 10 см) и малое общее время, необходимое для аналитического разделения (35 мин) наводят на мысль, что использование этих фаз для препаративных разделений представляет практический интерес.

7.5.10. Прочие методы жидкостной хроматографии

Аффинную хроматографию не использовали для разделения энантиомеров. Однако это, возможно, обусловлено тем фактом, что ее применения для разделения энантиомеров вообще практически не исследовались даже на аналитическом уровне. В 1973 г. Стюард и Дохерти [90] продемонстрировали разделение антиподов d,l-триптофана на бычьем сывороточном альбумине (БСА), закрепленном на агарозе. Недавно Алленмарк и сотр. [91] расширили применение этой ХНФ путем введения производных триптофана и хиральных производных серы. Альбуминагарозная неподвижная фаза имеет низкую емкость по отношению к рацематам, и наблюдаемые коэффициенты разделения для d,l-5-гидрокситриптофана уменьшаются заметно с увеличением образца даже в тех пределах, которые обычно рассматриваются как аналитические. Разделение N-ароиламинокислот (α до 3,6) и фармакологически активных сульфоксидов [92] было выполнено на улучшенной неподвижной фазе, в которой БСА закреплен непосредственно на силикагеле (10 мкм) [92]. Эта коммерчески доступная ХНФ может также обеспечить более высокую массовую емкость.

Были предприняты многочисленные попытки добиться расщепления энантиомеров на хиральных ионообменных смолах [13]. В первом таком расщеплении, позволившем разделить до нулевой линии *трео*-1-*пара*-нитрофенил-2-амино-1,3-пропандиол, применяем d-тартратную форму анионообменной смолы. При использовании этилацетата в качестве подвижной фазы получили полное разделение до нулевой линии аналитического образца, причем об образцах большого размера не сообщалось [93]. Ямагиши [94] обнаружил, что колонки для жидкостной хроматографии, заполненные продуктами присоединения хелатов металлов к глинам, могут частично расщепить 2,3-дигидро-2-метил-5,6-дифенилпиразин **71**. Удивительно, что при нанесении одних и тех же хиральных аддуктов хелатов металлов глиняные под-

ложки дают лучшее разделение, чем обычные катионообменные смолы (например, дауэкс или сефадекс).



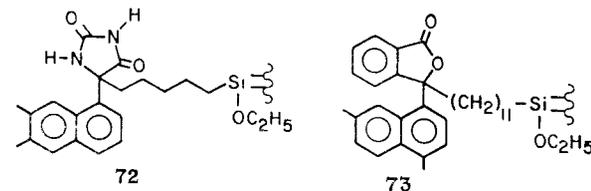
71

Как отмечалось раньше в разд. 7.5.4, взаимозависимая природа 1:1-процесса хирального распознавания может быть использована для развития имеющихся и создания новых неподвижных фаз. В принципе если ХНФ, приготовленная на основе единственного энантиомера соединения А, может расщеплять раствор энантиомеров В и В*, то колонка, сконструированная на основе одного энантиомера В, будет разделять энантиомеры А и А*. В другом случае относительная стабильность двух диастереомерных комплексов А : В и А : В* приведет к расщеплению. На практике, однако, эти два эксперимента не вполне эквивалентны, так как хроматографически мы имеем дело с диастереомерными адсорбатами, а не со свободными комплексами. Относительное положение подложки и комплекса может в корне изменять энергетическое различие между комплексами [95]. Тем не менее энергетическое различие между комплексами можно рассматривать в качестве первого приближения при учете различия в стабильности двух аналогичных адсорбатов.

При оценке возможности хроматографического расщепления различных рацематов на ХНФ некоторые хиральные молекулы могут быть выбраны в качестве потенциальных предшественников для второго поколения ХНФ. Этот повторяющийся процесс можно успешно использовать для получения третьего и даже четвертого поколения неподвижных фаз. Например, взяв первоначально ХНФ, полученные на основе фтороспиртов 27, расщепили производные аминокислот. После сравнения найденных коэффициентов разделения было приготовлено второе поколение ХНФ: 29, 42 и 46. Как было найдено, колонки, содержащие эти ХНФ, расщепляют не только хиральные спирты, но и множество других функционально различных хиральных молекул. Для ряда соединений с определенной функциональной группой структура рацемата может быть рационально оптимизирована для того, чтобы получить более высокие коэффициенты разделения и выделить отдельный энантиомер оптимизированного компонента для получения третьего поколения ХНФ. Три такие ХНФ третьего поколения 72, 73 и 74 были приготовлены и дали значительно более высокие коэффициенты разделения для определенных рацематов, чем «первое поколение» ХНФ 27 (табл. 7.11) [96—98]. Фактически, колонки третьего поколения обладают уникальными

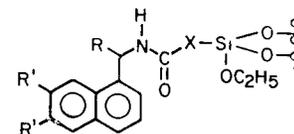
индивидуальными селективностями для определенных разделяемых веществ. В то время как ХНФ 74 превосходна для разделения ДНБ-производных аминокислотных эфиров и амидов типа 78 и 81, ХНФ 73 хорошо подходит, в частности, для расщепления производных аминов типа 79. Приведенные здесь данные являются только примерами, иллюстрирующими расщепляющие способности третьего поколения ХНФ. Уже расщеплены сотни аминов, аминокислот и производных аминоспиртов. Улучшение степени хирального распознавания по сравнению с более ранними неподвижными фазами наводит на мысль, что они будут пригодны для препаративных хиральных колонок. Единственным ограничением является доступность хиральных предшественников.

Недавно Пиркл и сотр. [98] и Ой и сотр. [99] независимо разработали ХНФ 76 и 77 соответственно, приготовленные на основе легкодоступного хирального 1-(α -нафтил)этиламина. Эти



72

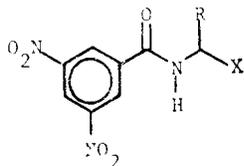
73



	X	R	R'
74	$-(\text{CH}_2)_{10}-$	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	$-\text{CH}_3$
75	$-(\text{CH}_2)_{10}-$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$
76	$-(\text{CH}_2)_{10}-$	$-\text{CH}_3$	$-\text{H}$
77	$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CONH}(\text{CH}_2)_3-$	$-\text{CH}_3$	$-\text{H}$

фазы отличаются от аналогичных по поведению ХНФ 74 только по способу закрепления на силикагеле. Они расщепляют производные кислот, аминов, аминокислот и аминоспиртов. Как правило, ХНФ 73 дает более высокие коэффициенты разделения для ДНБ-производных аминов, тогда как ХНФ 74, 75 и 76 предпочтительны для расщепления ДНБ-производных аминокислот. Расщепление метилового эфира N-3,5-динитробензоилфенилаланина на ХНФ 74 (рис. 7.9) может служить доказательством высокой эффективности с точки зрения как хирального распознавания ($\alpha=4,73$), так и числа теоретических тарелок (10 880 т. т. на 1 м), полученной с помощью этих ХНФ. Доступ-

Таблица 7.11. Сравнительное расщепление рацематов методом ХНФ первого и третьего поколений^а



Вводимое вещество	R	X	Коэффициент разделения α			
			ХНФ 27	ХНФ 72	ХНФ 73	ХНФ 74
78	C ₆ H ₅ CH ₂	CO ₂ CH ₃	1,10 ^б	2,04 ^б	1,42 ^в	4,73 ^б
79	C ₆ H ₅	CH ₃	1,19 ^б	1,18 ^б	1,7 ^в	1,50 ^б
80	C ₆ H ₅	C(CH ₃) ₂ H	1,35 ^в	1,72 ^б	1,53 ^в	3,36 ^б
81	C ₆ H ₅ CH ₂	CONH(<i>n</i> -C ₄ H ₉)	1,52 ^г	1,46 ^б	1,98 ^в	2,32 ^б

^а Подвижная фаза: растворы 2-пропанол — гексан следующих составов: ^б 1 : 4, ^в 1 : 9, ^г 1 : 19.

ность хиральных предшественников должна привести к конструированию нового поколения препаративных хиральных колонок.

7.6. Заключение

Развиты удачные системы для прямого препаративного расщепления энантимеров методом жидкостной хроматографии. Поскольку с помощью одной системы невозможно разрешить все проблемы расщепления, продолжают попытки разработать новые ХНФ для расщепления широкого ряда различных классов соединений и глубже понять процессы хирального распознавания. Это позволит в дальнейшем выбирать подходящую ХНФ для конкретного расщепления на основе понимания основных принципов хирального распознавания. Без сомнения, ХНФ станут обычными в лабораториях, заинтересованных в разработке и расщеплении хиральных соединений. Имеется растущая потребность в облегчении разделения многих биологически активных хиральных соединений с целью их оценки. Часто для целей испытаний достаточно умеренных количеств расщепленного материала. Прямое хроматографическое расщепление, по-видимому, является идеально подходящим для этих целей. Расщепление промежуточных продуктов в процессе синтеза позволит синтезировать более сложные хиральные продукты. Недавние публикации ясно демонстрируют рост интереса к прямому хро-

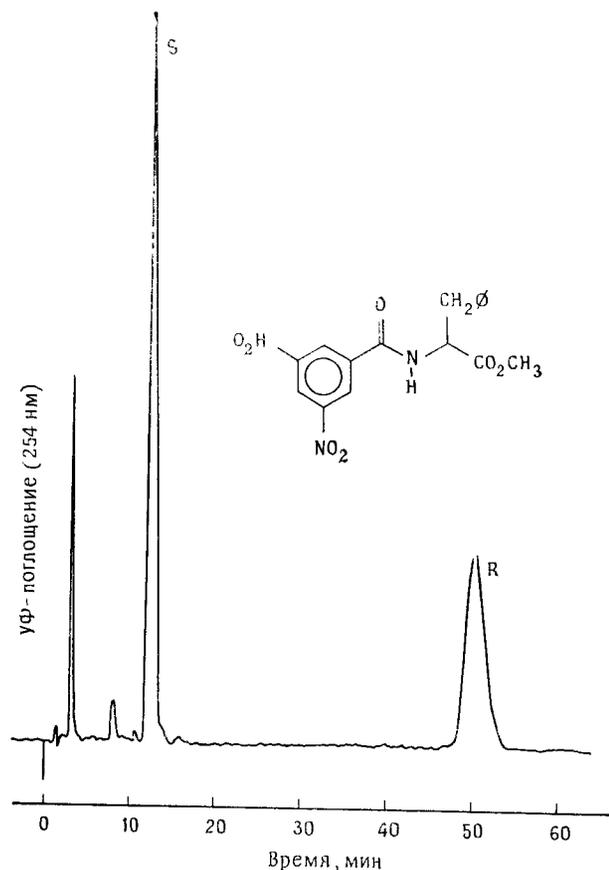


Рис. 7.9. Расщепление метилового эфира N-3,5-динитробензоилфенилаланина на ХНФ 74. Колонка 250×10 мм (d_{внутр}), размер частиц: 5 мкм; скорость потока: 2 мл/мин, подвижная фаза: 20% 2-пропанола в гексане; детектирование: УФ, 254 нм.

матографическому расщеплению оптических изомеров как среди хроматографистов, так и среди ученых других специальностей.

7.7. Дополнения

После подготовки и рецензирования этой главы появились многочисленные новые сообщения, относящиеся к этой быстро развивающейся области.

ХНФ, приготовленная на основе (+)-политрифенилметилметакрилата (см. разд. 7.5.5), в настоящее время коммерчески доступна [100]; она использована для расщепления 2,2'-диметил-

1,1'-биазулена [101], краун-эфиров, включающих гелицен в систему кольца [102]. В обоих случаях были получены спектры циркулярного дихроизма и таким образом определены абсолютные конфигурации разделенных энантиомеров. Кроме того, на этой ХНФ был расщеплен до нулевой линии перхлоротрифениламин, являющийся первым примером оптически активного соединения типа Ag_2Z , в котором Z не является хиральным центром [103]. Прежние попытки расщепить этот рацемат на триацетилцеллюлозе приводили к расщеплению фракции не более чем на 1% э.и. Однако на аналитической колонке $30 \times 2,2$ см (внутр. диаметр), содержащей упомянутый выше хиральный винилполимер, можно разделить до 6 мг за один проход лишь с частичным перекрытием полос расщепляемых энантиомеров ($\alpha = 2,9$).

Зсадон и сотрудники [104] достигли значительного улучшения препаративного разделения на их полимерной ХНФ, промышленно приготовленной на основе β -циклодекстрина на шариковом носителе (см. раздел 7.5.7). С помощью первоначальной оптимизации аналитических условий разделения винкадифформина 57 они нашли подходящие условия для разделения 500 мг этого рацемата на колонке препаративного размера 90×5 см (внутр. диаметр). Был также расщеплен структурный аналог (\pm)-квебрахамина. Меньший коэффициент разделения позволил хроматографировать только 200 мг рацемата за один проход.

Недавно Манншрек и сотр. [105] сообщили характеристики микрокристаллической триацетилцеллюлозы и определили также зависимость высоты тарелки (ВЭТТ) от линейной скорости, пористости, размера частиц и коэффициента емкости растворенного вещества. Хотя эти данные непосредственно относятся к аналитическому разделению энантиомеров, они являются полезными и для будущих препаративных разделений на аналогичных высокоэффективных ЖХ-колонках. Были сопоставлены результаты расщепления на триацетилцеллюлозе и хиральной полиамидной ХНФ [106] эфиров *N*-бензоиламинокислот, α -замещенных фенилацетамидов, *N*-замещенных ацетамидов, производных бензоина и различных лекарственных веществ, представляющих фармацевтический интерес. Хотя не было отмечено общей тенденции, для некоторых из этих соединений получили расщепление почти до нулевой линии. Семь спиральных фенантронов частично или полностью были расщеплены на триацетилцеллюлозе, и обогащенные материалы использовали для определения барьеров энантиомеризации этих термически лабильных соединений [107]. Частичное расщепление хиральных азокрасителей, полученных на основе миндальной кислоты, осуществили на картофельном крахмале, а также на порошкообразном шелке, в то время как на шерсти или целлюлозе не было получено заметного разделения [108].

Исакссон и сотр. [109] сообщили об очень интересном разделении рацемического спироацетала, главного компонента феромона пчел Адрены, на триацетилцеллюлозе. Используя колонку, содержащую 180 г ХНФ, они расщепили 140 мг *транс,транс*-2,8-диметил-1,7-диоксаспиро[5,5]ундекана за один проход, причем получили оба энантиомера с энантиомерным избытком более 98%. Хиральные спироацетали обычно присутствуют в качестве компонентов феромонов насекомых, причем они были идентифицированы в феромонах жука-короеда, ос, а также пчел. Это позволяет надеяться, что данная ХНФ позволит расщепить и другие спироацетали, представляющие биологический интерес.

Число сообщений о новых хиральных неподвижных фазах для жидкостной хроматографии действительно феноменально. Например, в течение 6-месячного периода с мая по октябрь 1985 г. появились сообщения не менее чем о 20 новых фазах. Хотя в этих статьях описаны только аналитические аспекты использования этих фаз, можно надеяться, что они позднее смогут быть использованы также для препаративных разделений. Херманссон разработал хиральную фазу, содержащую иммобилизованный белок плазмы, которая полезна для расщепления некоторых рацемических лекарств или их метаболитов [110]. ХНФ, приготовленная на основе иммобилизации сывороточного альбумина человека, была использована для расщепления эфиров окзепамов (с коэффициентом разделения 11,8) и эфира гемисукцината окзепамов [111].

Аминокислоты и их производные всегда были главными объектами большинства исследований хроматографического разделения. Следовательно, главная часть новых фаз разработана для разделения этих соединений. Например, эфиры *N*-ациламинокислот и (или) их амиды были расщеплены на диамидной фазе, приготовленной из *L*-валина [112], диамидной фазе, приготовленной на основе аминокислоты и хризантемовой кислоты, и на мочевино-амидной ХНФ, приготовленной из *L*-валина [113]. Рациональный подход к конструированию ХНФ привел Пиркла и сотр. [114] к усовершенствованной фазе, основанной на амиде *L*-(*L*-арил)алкиламина, который не только дает большой коэффициент разделения, но и обеспечивает наибольший коэффициент разрешения, известный в настоящее время для энантиомеров, производных аминокислот. Это является результатом комбинирования высокой энантиоселективности и хроматографической селективности выбранной ХНФ. Имеются также значительные успехи в создании ХНФ для лигандообменной хроматографии (см. разд. 7.5.9) немодифицированных аминокислот, которые обладают как улучшенной энантиоселективностью, так и эффективностью [115, 116].

Литература

- 1 Newman P, Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds, Optical Resolution Information Center, New York, Mislow K, Introduction to Stereochemistry, Benjamin W A, New York, p 119, 1965
- 2 Snyder L R, Kirkland J J, Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed., Wiley, New York, 1979
- 3 Lindner W, *Chemia*, **35** (1981) 294
- 4 Blaschke G, *Angew Chem, Int Ed Engl*, **19** (1980) 13
- 5 Davankov V A in J C Giddings, E Grushka, J Cazes, P R Brown (Eds), *Advances in Chromatography*, Vol 18, Dekker, New York, p 139, 1980
- 6 Audebert R, *J Liquid Chromatography*, **2** (1979), 1063
- 7 Krull I S, in J C Giddings, E Grushka, J Cazes, P R Brown (Eds), *Advances in Chromatography*, Vol 16, Dekker, New York, p 175, 1978
- 8 Henderson G M, Rule H G, *J Chem Soc*, (1939) 1568
- 9 Prelog V, Wieland P, *Helv Chim Acta*, **27** (1944) 1127
- 10 Buss D R, Vermeulen T, *Ind and Eng Chem*, **60** (1968) 12
- 11 Lochmuller C H, Souter R W, *J Chromatogr*, **113** (1975) 238
- 12 Losse G, Kuntze K, *A Chem*, **10** (1970) 22
- 13 Рогожин С В, Даванков В А — Успехи химии, 1968, т 37, с. 1327—1347
- 14 Pirkle W H Finn J, in J D Morrison (Ed), *Asymmetric Synthesis*, Vol 1, Academic Press, New York, 1983
- 15 Dagleish C E, *J Chem Soc*, **137** (1952) 3940
- 16 Gundlach G, Sattler E L, Wagenbach U, *Z Anal Chem*, **311** (1982) 684
- 17 Gilon C, Leshem R, Grushka E, *Pept Proc Eur Pept Symp 16th*, 700, 1981
- 18 Weinstein S, Engel M H Hare P E, *Anal Biochem*, **121** (1982) 370, Hare P E, Gil-Av E, *Science*, **204** (1979) 1226, Gil-Av E, Tishbee A, Hare P E, *J Amer Chem Soc*, **102** (1980) 5115
- 19 Gapuh Y, Miller N, Karger B L, *J Chromatogr*, **205** (1981) 325, LePage J N, Lindner W, Davies G, Seitz D E, Karger B L, *Anal Chem*, **51** (1979) 433
- 20 Pirkle W H Sikkenga D L, *J Chromatogr*, **123** (1976) 400
- 21 Davankov V A Kurganov A A, *Chromatographia*, **13** (1980) 339
- 22 Horvath C, Lin H-J, *J Chromatogr*, **149** (1977) 43
- 23 Snyder L R, *Anal Chem*, **39** (1967) 698
- 24 Pirkle W H, Anderson R W, *J Org Chem*, **39** (1974) 3901. Empty Pirkle Preparative Columns are commercially available from the Anspec Company, Inc and can withstand up to 200 psi
- 25 Done J M *J Chromatogr*, **125** (1976) 43
- 26 (a) Hesse G, Hagel R, *Chromatographia*, **6** (1973) 277, (6) *ibid*, **9** (1976) 62
- 27 Bertsch K Jochims J C, *Tetrahedron Letters*, (1977) 4379, Bertsch K, Rahman M A, Jochims J C, *Chem Ber*, **112** (1979) 567
- 28 Luttringhaus A, Hess U, Rosenbaum H. J, *Z Naturforsch, B* **22** (1967) 1296
- 29 (a) Lindner K R, Mannschreck A, *J Chromatogr*, **193** (1980) 308, (6) Mintas M Mannschreck A, Schneider J P, *J Chem Soc, Chem Comm*, (1979) 602
- 30 Schlotgl K Widhalm M, *Chem Ber*, **115** (1982) 3042
- 31 Mintas M Mannschreck A, Klasinc L, *Tetrahedron*, **37** (1981) 867
- 32 Witek M Vogtle F, Stuhler G, Mannschreck A, Lang B M, Irngartinger H *Chem Ber*, **116** (1983) 207

- 33 Newman P, *Optical Resolution Procedures for Chemical Compounds*, Vol 2, Part II, Optical Resolution Information Center, New York, p 1000—1006, 1981
- 34 Ahlbrecht H, Becher G, Blecher J, Kalinowski H-O, Raab W, Mannschreck A, *Tetrahedron Letters*, (1979) 2265
- 35 Becher G, Mannschreck A, *Chem Ber*, **114** (1981) 2365
- 36 Berg U, Isaksson R, Sandstrom J, Sjostrand U, Eiglsperger A, Mannschreck A, *Tetrahedron Letters*, (1982) 4237
- 37 Mannschreck A, Talvite A, Fischer W, Snatzke G, *Monatsh Chem*, **114** (1983) 101 For more recent examples see Wittlek M, Vogtle F, Stuhler G, Mannschreck A, Lang B M, Irngartinger H, *Chem Ber*, **116** (1983) 207, Vogtle F, Meurer K, Mannschreck A, Stuhler G, Puff H, Roloff R, Sievers R *Chem Ber*, **116** (1983) 2630
- 38 Eynde I V, Gielen M, Stuhler G, Mannschreck A, *Polyhedron*, **1** (1982) 1, Eynde I V, Gielen M, *J Organometallic Chem*, **198** (1980) C55
- 39 Schlogl K, Weissensteiner W, Widhalm M, *J Org Chem*, **47** (1982) 5025
- 40 (a) Hess H, Burger G, Musso H, *Angew Chem, Int Ed Engl*, **17** (1978) 612, (6) Haynes R K, Hess H, Musso H, *Chem Ber*, **107** (1974) 3733
- 41 Baczuk R J, Landram G K Dubois R J, Dehm H. C, *J Chromatogr*, **60** (1971) 351
- 42 Sousa L R, Sogah G D Y, Hoffman D H, Cram D J, *J Amer. Chem. Soc*, **100** (1978) 4569, Dotssev G, Sogah Y, Cram D J, *J Amer Chem. Soc*, **97** (1975) 1259
- 43 Sogah G D Y, Cram D J, *J Amer Chem Soc*, **101** (1979) 3035, *ibid*, **98** (1976) 3038
- 44 Kyba E P, Koga K, Sousa L R Siegel M G, Cram D J *J Amer Chem Soc*, **95** (1973) 2692, Helgeson R C, Timko J M Moreau P Peacock S C, Mayer J M, Cram D J, *J Amer. Chem Soc*, **96** (1974) 6762
- 45 Pirkle W H, House D W, *J Org Chem*, **44** (1979) 1957, Pirkle W H, House D W, Finn J M, *J Chromatogr*, **192** (1980) 143
- 46 Pirkle W H, Finn J M, Schreiner J L Hamper B. C, *J Amer Chem. Soc*, **103** (1981) 3964, Pirkle W H Finn J M, Hamper B C, Schreiner J, Prubish J R, *ACS Symp Ser*, No 185, 245, 1982
- 47 Chiral HPLC columns of this type are available from the Regis Chemical Co, Morton Grove, IL and from the J T Baker Chemical Co, Phillipsburg, NJ
- 48 Pirkle W H, Finn J M, *J Org Chem*, **46** (1981) 2935, Pirkle W H, Schreiner J L, *J Org Chem*, **46** (1981) 4988, Pirkle W H, Welch C J., *J Org Chem*, **49** (1984) 138, Pirkle W H, Welch C J, Mahler G S, Meyers A E, Fuentes L M, *J Org Chem*, **49** (1984) 2504, Pirkle W H, Tsipouras A, *J Chromatogr*, **291** (1984)
- 49 A portion of this work was presented at the 184th National Meeting of the American Chemical Society, Kansas City, Missouri, 1982
- 50 Pirkle W H, Finn J M, *J Org Chem*, **47** (1982) 4037
- 51 Pirkle W H, Hamper B C, in preparation
- 52 Hamper B C, Pirkle W H, presented at the 185th National Meeting of the American Chemical Society, Seattle, Washington, 1983
- 53 Weems H B, Yang S K *Anal Biochem*, **125** (1982) 156
- 54 Pirkle W H, Hoover D J, in N L Allinger, E L Eliel S H Wilen (Eds), *Topics in Stereochemistry*, Vol 13 Wiley, New York, p 263, 1982
- 55 Pirkle W H, Hamper B C, in preparation
- 56 Snyder L R, *J Chromatogr Sci*, **10** (1972) 200, 369
- 57 Cretier G, Rocca J L, *Chromatographia*, **16** (1982) 32
- 58 Allenmark Stig, Nielson L, Pirkle W H, *Acta Chem Scand B37* (1983) 325

- 59 *Kasai M, Froussios C, Ziffer H*, *J Org Chem*, **48** (1983) 459, *Kasai M, Ziffer H*, *J Org Chem*, **48** (1983) 712
- 60 *Wainer I W, Doyle T D, Hamidzadeh Z, Aldridge M*, *J Chromatogr*, **261** (1983) 123, *Wainer I W, Doyle T D*, *J Chromatogr*, **261** (1983) 123, *Wainer I W, Doyle T D*, *J Chromatogr*, **259** (1983) 465
- 61 *Lochmuller C H, Ryall R R*, *J Chromatogr*, **150** (1978) 511
- 62 *Hara S, Dobashi A*, *J Chromatogr*, **186** (1979) 543, *Hara S, Dobashi A*, *J Liq Chromatogr*, **2** (1979) 883, *Dobashi A, Oka K, Hara S*, *J Amer Chem Soc*, **102** (1980) 7122
- 63 *Akanya J N, Hitchen S M, Taylor D R*, *Chromatographia*, **16** (1982) 224
- 64 (a) *Yuki H, Okamoto Y, Okamoto I*, *J Amer Chem Soc*, **102** (1980) 6356, (6) *Okamoto Y, Okamoto I, Yuki H*, *Chem Lett*, (1981) 835
(b) *Okamoto Y, Okamoto I, Yuki H*, *J Poly Sci, Poly Lett Ed*, **19** (1981) 451, (r) *Okamoto Y, Honda S, Okamoto I, Yuki H*, *J Amer Chem Soc*, **103** (1981) 6971
- 65 (a) *Nakazaki M, Yamamoto K, Maeda M*, *J Org Chem*, **46** (1981) 1985
(6) *Nakazaki M, Yamamoto K, Ikeda T, Kutsuki T, Okamoto Y*, *J Chem Soc Chem Comm*, **14** (1983) 787
- 66 *Kawada Y, Iwamura H, Okamoto Y, Yuki H*, *Tetrahedron Lett*, **24** (1983) 791
- 67 *Wulff G, Vesper W*, *J Chromatogr*, **167** (1978) 171, *Wulff G, Grobe-Einsler R, Vesper W, Sarhan A*, *Makromol, Chem*, **178** (1977) 2817
Wulff G, Vesper W, Grobe-Einsler R, Sarhan A, *Makromol Chem*, **178** (1977) 2799
- 68 *Schwanghart A D, Backmann W, Blaschke G*, *Chem Ber*, **110** (1977) 778, *Blaschke G, Kraft H P, Schwanghart A D*, *Chem Ber*, **111** (1978) 2732
- 69 *Blaschke G, Markgraf H*, *Chem Ber*, **113** (1980) 2031
- 70 *Blaschke G, Kraft H P, Markgraf H*, *Chem Ber*, **113** (1980) 2318
- 71 For a review of cyclodextrin inclusion compounds, see *W Saenger*, *Ang Chem, Int Ed Engl*, **19** (1980) 344
- 72 *Harada A, Furue M, Nozakura S*, *J Poly Sci, Poly Chem Ed*, **16** (1978) 189
- 73 *Zsador B, Szilasi M, Tudos F, Szeithi J*, *J Chromatogr*, **208** (1981) 109
- 74 *Mikes F, Boshart G, Gil-Av E*, *J Chem Soc Chem Comm*, (1979) 99, *Mikes F, Boshart G, Gil-Av E*, *J Chromatogr*, **122** (1976) 205
- 75 *Vuman H, Helder R, Wunberg H*, *Recl Trav Chim Pays Bas*, **95** (1976) 211
- 76 *Feringa B, Wynberg H*, *Recl Trav Chim Pays Bas*, **97** (1978) 249
- 77 *Kim Y H, Tishbee A, Gil-Av E*, *J Chem Soc Chem Comm*, (1981) 75
- 78 (a) *Davankov V A, Rogozhin S V*, *J Chromatogr*, **60** (1971) 280 (6) *Rogozhin S V, Davankov V A*, *Chem Comm* (1971) 490
- 79 *Lozjonovicz J, Petit M A, Szubarga A*, *J Chromatogr*, **147** (1978) 177
- 80 *Davankov V A, Zolotarev Y A, Kurganov A A*, *J Liq Chromatogr*, **2** (1979) 1191
- 81 *Myasoedov N F, Kuznetsova O B, Ptrenik O V, Davankov V A, Zolotarev Y A*, *J Labelled Compd Radiopharmacol*, **17** (1979) 439
- 82 *Gulitz G, Jellenz W, Santl W*, *Chromatographia*, **16** (1982) 197
Gulitz G, Jellenz W, Santl W, *J Chromatographia*, **203** (1981) 77
Gulitz G, Jellenz W, Santl W, *J Liq Chromatogr*, **4** (1981) 701
Gulitz G, Jellenz W, Iofler G, Santl W, *J High Res Chromatogr*, **2** (1979) 145
- 83 *Foucault A, Coude M, Oberster I*, *J Chromatogr*, **185** (1979) 345
- 84 *Lindner W*, *Naturwissenschaften*, **67** (1980) 354
- 85 *Engelhardt H, Kromidas S*, *Naturwissenschaften*, **67** (1980) 353

- 86 *Watanabe N*, *J Chromatogr*, **260** (1983) 75
- 87 *Sugder K, Hunter C, Lloyd Jones G*, *J Chromatogr*, **192** (1980) 228
- 88 *Rourie Iotis P, Ungar K K, Kung'ur A A, Laitinen A*, *J Chromatogr*, **255** (1983) 51
- 89 *Davankov V A, Bochkov A S, Belov Y P*, *J Chromatogr*, **218** (1981) 547, *Davankov V A, Bochkov A S, Kung'ur A A, Roumeliotis C, Ungar K K*, *Chromatographia*, **13** (1980) 677
- 90 *Stewart K K, Doherty R F*, *Proc Nat Acad Sci USA*, **70** (1972) 2850
- 91 *Allenmark S, Bomgren B*, *J Chromatogr*, **252** (1982) 297, *Allenmark S, Bomgren B, Boren H*, *J Chromatogr*, **237** (1982) 473
- 92 *Allenmark S, Bomgren B, Boren H*, *J Chromatogr*, **264** (1983) 63, *Allenmark S, Bomgren B, Lagstrom P*, *Anal Biochem*, **136** (1984) 293.
- 93 *Gaal J, Inczedy J*, *Acta Chim (Budapest)*, **81** (1974) 439, *Gaal J, Inczedy J*, *J Chromatogr*, **102** (1974) 375
- 94 *Yamagishi A*, *J Chem Soc, Chem Comm*, (1983) 9, *Yamagishi A*, *J Chromatogr*, **262** (1983) 41
- 95 For recent examples of the effect of the support on the sense of chromatographic elution order, see *Y A Zolotarev and N F Myasoedov*, *J Chromatogr*, **264** (1983) 377, *A A Kurganov, A B Teolin and V A Davankov*, *J Chromatogr*, **261** (1983) 223, *W H Pirkle A Tsipouras, B C Hamper and B Bank*, *J Pharm Biomed Anal*, **2** (1985) 173
- 96 *Pirkle W H, Hyun M H*, *J Chromatogr*, **322** (1985) 309
- 97 *Pirkle W H, Sowin T J*, *J Chromatogr*, **387** (1987) 313
- 98 *Pirkle W H, Hyun M H*, *J Org Chem*, **39** (1984) 3043
- 99 *Oi N, Nagase M, Doi T*, *J Chromatogr*, **257** (1983) 111, *Oi N, Kitahara H*, *J Chromatogr*, **265** (1983) 117
- 100 Chiral HPLC columns containing (+)polytriphenylmethyl methacrylate are commercially available from Daicel Chemical Industries Ltd. Humu 671—12 (Japan)
- 101 *Tajiri A, Fukuda M, Hatano M, Morita T, Takase K*, *Angew Chem, Int. Ed Engl*, **22** (1983) 870
- 102 *Nakazaki M, Yamamoto K, Ikeda T, Kutsuki T, Okamoto Y*, *J Chem Soc Chem Comm*, (1983) 787
- 103 *Ikamoto Y, Yashima E, Hatada K, Mislow K*, *J Org Chem*, **49** (1984) 557
- 104 *Zsador B, Decsei L, Szilasi M, Tudos F, Szeithi J*, *J Chromatogr*, **270** (1983) 127
- 105 *Killer H, Rimbock K, Mannaschreck A*, *J Chromatogr*, **282** (1983) 89
- 106 *Blaschke G, Kraft H, Markgraf H*, *Chem Ber*, **116** (1983) 3611
- 107 *Scherubl H, Fritzche U, Mannaschreck A*, *Chem Ber*, **117** (1984) 336
- 108 *Konrad G, Musso H*, *Chem Ber*, **117** (1984) 423
- 109 *Isaksson R, Liljevors T, Reinholdsson P*, *J Chem Soc Chem Comm*, (1984) 137
- 110 *Hermansson J*, *J Chromatogr*, **279** (1983) 71
- 111 *Fitos I, Simonyi M, Tegyei Z, Otvos L, Kaszlar J, Kaszlar M*, *J Chromatogr*, **259** (1983) 494
- 112 *Facklam C, Pracejus H, Oehme G, Muech H*, *J Chromatogr*, **257** (1983) 118
- 113 *Oi N, Nagase M, Inada Y, Doi T*, *J Chromatogr*, **259** (1983) 487, *Oi N, Kitahara H*, *J Chromatogr*, **285** (1984) 198
- 114 *Pirkle W H, Hyun M, Bomgren B*, Presented at the Eighth International Symposium on Column Liquid Chromatography, May 20—25 1984 and subsequently published in *Int J Chromatogr*, **316** (1984) 585
- 115 *Kurganov A, Teolin A, Davankov V*, *J Chromatogr*, **261** (1983) 223, *Berezin B, Yamskov I, Davankov V*, *J Chromatogr*, **261** (1983) 301
- 116 *Zolotarev Y, Myasoedov N*, *J Chromatogr*, **264** (1983) 377

Препаративная ситовая хроматография

Г. Хегнауер

8.1. Введение

Ситовая (гельпроникающая) хроматография (СХ) представляет собой метод жидкостной хроматографии, в котором молекулы растворенного вещества разделяют в соответствии с их размером в растворе. Этот метод широко используют в аналитической практике для исследования поведения небольших молекул в растворе, анализа химических составов и определения средних молекулярных масс (M) и молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров. Колонку заполняют пористыми частицами, и разделение происходит в результате различия в распределении растворенных веществ снаружи и внутри пор материала, заполняющего колонку. Так как скорость диффузии растворенного вещества в поры обычно намного выше, чем линейная скорость подвижной фазы, то можно сделать предположение, что устанавливается диффузионное равновесие растворенного вещества между подвижной фазой и раствором в порах неподвижной фазы (насадки). Поэтому если нет адсорбции или других взаимодействий с неподвижной фазой, то разделение достигается за счет процесса физического рассеяния и время удерживания или объем элюирования (V_e) молекулы растворенного вещества зависит от доступного для нее объема пор. Если молекулы растворенных веществ имеют различные средние размеры или молярные объемы, то молекулы большего размера будут исключаться из пор насадки в большей степени, чем молекулы меньшего размера, и поэтому они будут элюировать первыми и иметь меньшие значения V_e . Таким образом, последовательность элюирования ряда растворенных молекул можно предсказать, и в отличие от других типов жидкостной хроматографии имеется минимальный объем элюирования, или мертвый объем (V_0), соответствующий объему подвижной фазы между частицами насадки в колонке, и максимальный объем элюирования (V_m), который равен сумме V_0 и объему всей жидкости, содержащейся внутри пор насадки в колонке. Для полимеров и некоторых низкомолекулярных гомологов было теоретически и экспериментально показано, что в интервале между V_0 и V_m объем элюирования линейно связан с логарифмом молярного объема или M растворенных соединений, т. е. логарифм $\lg(M) =$

$=f(V_e)$. Организация эксперимента и установление оптимальных условий разделения в СХ обычно намного проще, чем в других типах ЖХ.

В литературе часто встречаются синонимы термина «ситовая хроматография», такие, как и жидкостное исключение по размерам, «стерическое исключение», «гельпроникающая хроматография». Другой термин — «гельфилтрационная хроматография» — часто используют для обозначения ситовых разделений биологических молекул в водных средах на колонках, заполненных мягкими или полужесткими частицами геля.

Препаративная СХ является применением СХ для хроматографического выделения одного или большего числа компонентов (или фракций) из смеси с целью их идентификации, очистки или использования в других типах исследований. Методы препаративной СХ могут быть разделены на 4 категории по масштабам разделения или размеру фракций.

1. *Препаративно-аналитическая СХ.* Стандартное аналитическое оборудование и аналитические СХ-колонки 10—50 см длиной и 0,5—0,8 см (внутр. диам.) используют для оптимизации разделения. Путем одного или нескольких вводов пробы, содержащих от 5 до 100 мг в объемах от 0,1 до 2 мл, обычно можно получать фракции, содержащие количества вещества (10 мкг—10 мг), достаточные для спектроскопических или других типов хроматографических анализов. Сбор фракций обычно осуществляют вручную.

2. *Полупрепаративная СХ.* Описанную выше аналитическую систему автоматизируют для многократного ввода образца и сбора фракции, и (или) работают при более высоких скоростях подвижной фазы в СХ-колонках большего диаметра (0,8—2 см внутр. диам.), чем обычно в аналитических разделениях. Для того чтобы получить фракции, содержащие от 10 мг до 0,2 г, используют колонки большего диаметра и вводят большие объемы образца (0,1—10 мл), содержащие от 10 мг до 0,5 г вещества. Полупрепаративные фракции часто необходимы для более полной идентификации структуры разделенных компонентов, для очистки главных компонентов, применяемых в качестве стандартов для калибровки, и для очистки образцов при приготовлении пробы в других типах анализа.

3. *Стандартно-препаративная СХ.* Большие колонки (>50 см длиной и 2—6 см внутр. диаметром), заполненные относительно дешевой насадкой с размером частиц 30—60 мкм, и специальное оборудование позволяют работать с большими количествами подвижной фазы, вводить большие объемы пробы (10—100 мл), работать при высоких скоростях потока (10—140 мл/мин), следить за концентрацией растворенных веществ и собирать фракции. Путем однократного или многократного ввода образца,

содержащего 0,5—20 г, обычно получают фракции объемом 10—200 мл (0,2—2 г). Стандартно-препаративные разделения используют для очистки материала с целью получения полимерных фракций, имеющих различные молекулярные массы M и узкое молекулярно-массовое распределение (ММР) для исследования зависимости структура — свойства и использования в качестве стандартов, а также для выделения продуктов реакций или промежуточных продуктов для дальнейших исследований. Так как работы в стандартно-препаративном масштабе требуют больших количеств подвижной фазы, то вопросы стоимости и безопасности требуют специального внимания.

4. *Крупномасштабная препаративная СХ.* Рекомендуется в дополнение к специальному оборудованию, описанному в п. 3, автоматизировать процесс многократного ввода пробы, сбора фракций и предусмотреть регенерацию растворителя. С ростом масштабов разделения первостепенное значение приобретают такие вопросы, как стоимость, надежность, безопасность. Крупномасштабные разделения обычно позволяют получать фракции в пределах от 5 до нескольких сотен граммов, и их используют для фракционирования полимеров с целью получения образцов с узким ММР для исследования свойств и процессов переработки, производства стандартов, выделения промежуточных продуктов реакции в органических синтезах и в производстве для очистки больших количеств материалов с целью исследования или продажи.

Размер колонки является главным фактором, влияющим на масштаб препаративных разделений. С увеличением внутреннего диаметра колонки размер образца, объем вводимой пробы и скорость потока элюента могут быть увеличены. Для препаративных разделений обычно предпочтительно работать в условиях максимальных нагрузок и скоростей потока, позволяющих проводить разделение без заметной потери разделяющей эффективности. В самом деле, до тех пор пока поддерживается разумная скорость потока и колонки не перегружены образцом, разделяющая эффективность, определяемая числом тарелок, часто увеличивается с увеличением площади поперечного сечения для колонок идентичной длины. В общем как размер образца, так и объемная скорость потока могут быть увеличены пропорционально площади поперечного сечения колонки независимо от типа или размера частиц насадки. Из-за высокой стоимости насадок, имеющих частицы малого размера (меньше 10 мкм), чаще используют для стандартных и крупномасштабных разделений большие частицы (30—60 мкм) с широким распределением по размерам.

Хотя методы препаративной СХ применяются довольно хорошо, особенно в препаративно-аналитическом и полупрепара-

тивном масштабах, прогресс был небольшим, и в современной публикуемой литературе этому вопросу посвящено мало работ. В 1975 г. Купер, Хьюгес и Джонсон [1] составили обзор по развитию и применению СХ в препаративном масштабе. В 1979 г. Яу, Киркланд и Блей в монографии «Современная ситовая жидкостная хроматография» [2] рассмотрели экспериментальное оборудование и некоторые применения препаративной СХ. Более современные публикации по препаративной СХ рассматриваются в обзоре Хегнауера по СХ [3].

В этой главе обсуждается современное состояние препаративной СХ. В разд. 8.2 дан обзор специального оборудования, колонок и материалов для заполнения колонок, необходимых для полупрепаративной и стандартно-препаративной хроматографии. Общие требования и специальные методы препаративной СХ рассматриваются в разд. 8.3. Оптимизация препаративных разделений и исследования по оценке рабочих параметров обсуждаются в разд. 8.4. Наконец, в разд. 8.5 приводятся примеры применения и обзор опубликованной литературы по препаративной СХ.

8.2. Оборудование, колонки и материалы для заполнения колонок

В 1968 г. Бомбаф и сотр. [4] описали первый коммерческий прибор, разработанный для СХ стандартно-препаративного масштаба. Установка Ана-Прер выпускалась Хроматографическим отделением фирмы Waters при корпорации Millipore (Milford, MA, USA) и состояла из термостата, блока управления и коллектора фракций. В этой установке предусмотрена автоматизация ввода образца (петлевой дозатор) и сбора фракций (40 выходов). Он имел резервуар для растворителя на 106 л, предназначенный для непрерывной работы при температуре от комнатной до 135 °С. Максимальная скорость потока подвижной фазы составляла 140 мл/мин, максимальный объем вводимой пробы — до 100 мл, объем фракции можно было устанавливать от 200 мл до 1 л за цикл. Во многих разделениях использовали стальные колонки длиной 122 см с наружным диаметром 6,4 см, заполненные частицами стиролдивинилбензолного геля или пористого стекла. Поток элюата расщеплялся, обеспечивая поступление приблизительно 1 мл/мин в дифференциальный рефрактометр и счетчик типа сифона. Установку Ана-Прер широко использовали для препаративного фракционирования полимеров.

Другой прибор — Chromatorger, также производимый фирмой Waters, — описан Бомбафом [5] в 1970 г. Прибор работает в циркуляционном режиме и может включать до 4 больших колонок (122×6,4 см наружн. диам.) для разделения граммовых

количеств материала. Он использовался для разделений в стандартно-препаративном режиме материалов с малой молекулярной массой.

Коммерческий полупрепаративный высокоэффективный ситовый хроматограф HLC-807 фирмы Toyo Soda был описан Като и сотр. [6]. Прибор был оснащен 8 колонками, заполненными TSK-гелем типа G. Каждая колонка имела длину 61 см и внутренний диаметр 2,1 см, была заполнена смесью частиц стирол-дивинилбензолного геля диаметром примерно 20 мкм и номинальной пористостью 10^6 , 10^4 , 10^3 Å в соотношении 61 : 18 : 21 по объему. В качестве подвижной фазы использовали смесь метилэтилкетона (МЭК) и метилового спирта (88,7 : 11,3 по объему), скорость потока 8,5 мл/мин. Фракционируя образец полистирола со стандартным широким ММР, они вводили образцы, содержащие 0,13 г в 20 мл растворов с интервалом 1,5 ч. Вручную собирали 32 фракции, содержавшие до 110 мг полимера с достаточно узким ММР.

Во многих случаях препаративные СХ-приборы были собраны из коммерчески доступных компонентов и приспособлены для специальных применений. Например, Ло [7] собрал из готовых узлов прибор для стандартно-препаративного масштаба СХ; прибор включал колонку длиной 122 см и диаметром 5,12 см, заполненную частицами стирол-дивинилбензолного геля (стирагель фирмы Waters) с номинальной пористостью 250 и 1000 Å. Препаративное разделение полимера с низкой *M* проводили с хлороформом в качестве подвижной фазы при скорости потока 10—12 мл/мин и нагрузках 0,8—1 г (20%-ные растворы). Пробу вводили вручную, используя кран-дозатор с петлей объемом 5 мл. Элюат из препаративной колонки детектировали на РФ-детекторе и собирали с помощью коллектора фракции, имевшего сифон на 24 мл.

Пейросет и Панарис [8] разработали автоматический препаративный СХ-прибор для введения одного образца размером 1 г и фракционирования примерно 20 г полимера в день. Термостатируя колонки и систему ввода пробы и реконструировав РФ-детектор, Пейросет и сотр. [9] смогли провести препаративное разделение при повышенной температуре и получить фракции полиэтилена с узким ММР. Они использовали колонку длиной 122 см и внутренним диаметром 6 см, заполненную силикагелем сферосил (фирмы Rhone-Poulenc), в качестве подвижной фазы использовали 1,2,4-трихлорбензол со скоростью потока 50 мл/мин, разделение выполняли при температуре 150 °С.

Мантегью и Пикер [10] сконструировали прибор для препаративной СХ, позволявший разделять примерно 0,25 г образца за один ввод. Они использовали колонку из нержавеющей стали длиной 122 см, наружным диаметром 2,54 см и толщиной стенки

1 мм, заполненную частицами геля стиролдивинилбензола; объемом вводимой пробы составлял 17 мл и объем фракции — примерно 50 мл. Максимальный расход подвижной фазы составлял 42 мл/мин, в качестве подвижной фазы использовали хлороформ. Прибор не был автоматизирован.

Прибор для препаративной СХ биологических образцов заслуживает особого рассмотрения. В работе «Промышленная гель-фильтрация» Керлинг [11] обсуждает два типа препаративных СХ-разделений большого размера — групповое разделение и регулярное фракционирование — и дает рекомендации по требованиям к колонкам и оборудованию для каждого типа. Он определяет групповое разделение как разделение смеси на группы веществ с высокой *M* и низкой *M*, например разделение белков из осадителя. Рассмотрены факторы, влияющие на масштабирование, и приведены примеры применения.

Штробел [12] рассмотрел область применения крупномасштабной хроматографии для очистки биологических молекул и описал оборудование для крупномасштабных препаративных СХ-разделений. Специальные примеры включают разделение белков.

В настоящее время большая часть оборудования, используемого для препаративной СХ, специально разрабатывается или готовится путем модифицирования других типов приборов для жидкостной хроматографии. Хроматография препаративно-аналитического и в значительной степени полупрепаративного масштабов разделения может быть автоматизирована и приспособлена для рутинной работы на базе коммерчески доступного аналитического ЖХ-оборудования. Например, Сугнаукс и Дерасси [13] показали, как можно использовать для управления соленоидами, предназначенными для автоматического ввода пробы и сбора фракции, ЖХ-систему фирмы Waters с автодозатором WISP 710B, модулем обработки данных 730 и управляющей системой 720. Они создали полную программу AUTOPREP, написанную на языке Бейсик, которая позволяет определять пики с помощью отслеживания первой производной сигнала детектора, принимать логические решения, основанные на крутизне пика в начале и выдавать сигнал о том, нужно или не нужно собирать фракцию.

Как было указано выше, для препаративной СХ может быть использовано оборудование, начиная от грубых, но эффективных самодельных устройств и кончая очень сложной аппаратурой, контролируемой с помощью компьютеров. Во многих случаях для создания подходящего прибора можно использовать относительно дешевое, коммерчески доступное оборудование. Аналитическое оборудование легко приспособить для препаративной СХ в аналитическом масштабе. Однако для стандартно-

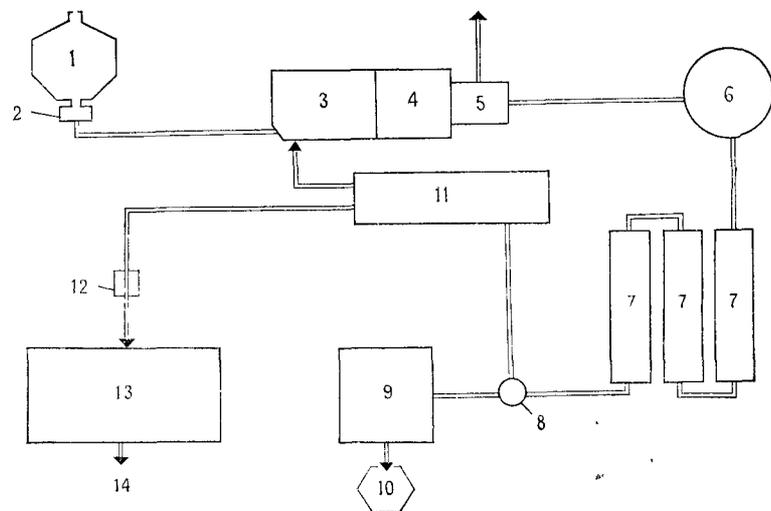


Рис. 8.1. Основные компоненты установки для препаративной СХ. 1 — резервуар для растворителя, 2 — устройство для дегазации и фильтр, 3 — система подачи растворителя, 4 — демпфер пульсаций, 5 — датчик давления, 6 — дозатор, 7 — колонка (колонки), 8 — кран делителя потока, 9 — монитор (детектор, самописец), 10 — сброс, 11 — линия рецикла, сбора фракций или промывки, 12 — сифон, 13 — коллектор фракций, 14 — выделение компонентов из фракций.

препаративной и крупномасштабной препаративной СХ требуется иное, более специальное оборудование.

Основные компоненты, необходимые для препаративной СХ, приведены на рис. 8.1. В табл. 8.1 указаны типичные колонки, материалы для заполнения колонок и подвижные фазы со ссылками на работы, в которых можно найти детальное описание приборного оформления для полупрепаративной и стандартно-препаративной СХ. Все колонки снабжены специальными концевыми соединениями для того, чтобы удерживать насадки, и выполнены из нержавеющей стали.

8.3. Общие требования и специальные методы

8.3.1. Подвижная фаза — элюент

При применении СХ для препаративных разделений необходимы большие объемы растворителей подвижной фазы (от 4 до 50 л в день). Это может создать проблемы в отношении токсичности и пожароопасности. Кроме того, хорошие растворители для определенных материалов (например, полимеров) часто являются канцерогенами (например, бензол и хлороформ) и могут обра-

Таблица 8.1. Характерные колонки, насадки, подвижные фазы и условия их использования в полупрепаративной и стандартно-препаративной СХ

Литература	Колонки и насадки	Подвижная фаза
Ло, 1969, [7]	122×5,1 см (внутр. диам.); 1 колонка, заполненная стирогелем в порядке убывания пористости (1000, 250 Å); $N=5000$ т. т/м	Хлороформ, 10—12 мл/мин, температура комнатная
Монтегью и Пикер, 1973 [10]	122×2,34 см (внутр. диам.), стиролдвинилбензолный гель, частицы 19—51 мкм; $N=3600$ —6600 т. т/м	Хлороформ, 42 мл/мин, температура комнатная
Като и др., 1975 [6]	61×2,1 см (внутр. диам.); 8 колонок TSK-GEL типа G (Toyo-Soda), стиролдвинилбензол, частицы 10 мкм, расположенные в порядке убывания пористости 10^6 , 10^4 и 10^3 Å	МЭК/метанол, 88,7:11,3 по объему, 8,5 мл/мин, $\Delta p=5$ МПа, 25 °С
Купер и др., 1975 [14]	122×5,8 см (внутр. диам.); 6,4 см (внеш. диам.) и 86×6,7 см (внутр. диам.) Колонка 1: стирогель 10^4 Å Колонка 2: пористое стекло корнинг (Electro—Nucleonics, Fairfield NJ) CPG 10—350, обработанное гексаметилдисилазином Колонка 3: CPG 10-2000 Колонка 4: CPG 10-120	ТГФ, 50—140 мл/мин, температура комнатная
Пейросет и Панарис, 1975 [8, 9]	122×6 см (внутр. диам.); 3 или 4 колонки в серии, заполненные сферосилом (Pechiney—Saint—Gobain), пористые, силикатные шарики размером 100—200 мкм, с номинальным диаметром пор от <100 до 16 500 Å, расположенными в порядке возрастания пористости	Толуол и ТГФ, 25—50 мл/мин, температура комнатная Трихлорбензол (ТХБ) 50 мл/мин, 150 °С
Миранелла и Баррелл, 1976 [15]	120×5,8 см (внутр. диам.); 1 колонка, заполнена биогласом (Bio-Rad Labs), дезактивированные пористые стеклянные шарики, 200—400 меш, номинальный предел исключения 350 Å	Тетрахлорэтилен, 4,9 мл/мин, температура комнатная
Вауган и Францисс, 1977 [16]	122×5,8 см (внутр. диам.); 1 колонка, заполненная в четыре слоя стирогелем в порядке увеличения пористости 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 Å	1,2-дихлорбензол, 15 мл/мин, 135 °С
Хеттори и др., 1978 [17]	122×5,1 см (внутр. диам.); 3 колонки, заполненные стирогелем в порядке убывания пористости 3· 10^3 , 10^5 , 10^4 Å	ТГФ, 30 мл/мин, 35 °С
Додгсон и др., 1978 [18]	120×6 см (внутр. диам.); 1 колонка, заполненная стирогелем, имеющим номинальную пористость 1000 Å (3/5) и 3000 Å (2/5), $N=3400$ т. т/м	Толуол, 20 мл/мин, температура комнатная
Лесек и Кви-ворон, 1979 [19]	150×2,6 см (внутр. диам.); 3 колонки, заполненные стирогелем 100 Å (15—25 мкм)	Диизопропиловый эфир 40 мл/мин, температура комнатная

зовывать опасные или взрывчатые соединения (например, пероксиды в случае тетрагидрофурана). При обсуждении элюента следует полностью осознавать потенциальные химические реакции и взаимодействия, а также физические свойства и растворяющую способность предполагаемого растворителя. Необходимо принять меры, предотвращающие вдыхание паров и абсорбцию растворителей через кожу. Заслуживают серьезного обсуждения контейнеры для хранения и использования растворителя, детекторы концентрации паров, сигнальные устройства, защитная одежда, соответствующая вентиляции и оборудованию для пожаротушения. Чрезвычайно важны чистота и консистенция подвижной фазы. Коммерчески перегнанные высокочистые растворители квалификации «для ВЭЖХ» отлично подходят для аналитических и полупрепаративных разделений, но достаточно дороги при использовании их в большем масштабе. Растворители квалификации «реагент» могут быть куплены в больших контейнерах (на 20—200 л), и их можно использовать для большинства разделения стандартно-препаративного масштаба. Такие растворители, как ТГФ и хлороформ, обычно включают стабилизирующие добавки. Бутилированный гидрокситолуол (БГТ) и бис(2-метил-4-гидрокси-5-*трет*-бутилфенил)сульфид (сантонокс R) обычно добавляют в количествах 0,05 масс. % в качестве антиоксидантов или ингибиторов к таким растворителям, как ТГФ, 1,2-дихлорбензол (ДХБ) и 1,2,4-трихлорбензол (ТХБ). Небольшие количества (0,75%) этилового спирта могут быть добавлены к хлороформу и другим хлорированным углеводородам для предотвращения образования фосфогена и HCl.

Для того чтобы разделить высокополярные или заряженные растворенные вещества, к таким растворителям, как диметилформамид (ДМФ) и N-метилпирролидон, добавляют неорганические соли (например, бромид лития), предотвращающие взаимодействие растворенных веществ между собой и с неподвижной фазой. Часто водные элюенты для разделения биологических молекул содержат соли, буферы и стабилизаторы.

Помимо чистоты, стабильности и безопасности идеальный элюент для препаративной СХ должен быть хорошим растворителем для широкого ряда растворенных веществ, не реагировать с ними, быть совместимым с неподвижной фазой (например, мягкие и полутвердые гели, применяемые в качестве насадочных материалов, должны хорошо в нем набухать, и растворитель не должен разрушать насадку), ингибировать взаимодействие между растворенным веществом и подвижной фазой, иметь низкую вязкость при рабочей температуре и должен быть достаточно летучим для того, чтобы его можно было удалить путем испарения при выделении разделяемых веществ из фракции. К со-

жалению, идеальные растворители трудно найти, и обычно останавливают свой выбор на наилучшем растворителе для конкретного применения.

В случае стиролдивинилбензолной насадки наиболее часто употребляется ТГФ. Он служит хорошим растворителем для многих веществ, имеет низкую вязкость и относительно летуч ($t_{\text{кип}}=66^\circ\text{C}$). Однако его стабильность и наличие нелетучих компонентов (БГТ и перекисей) в ТГФ побудило некоторых исследователей заняться поиском альтернативных растворителей для препаративной СХ низкомолекулярных соединений. Лесек и Квиворон [19] использовали диизопропиловый эфир вместо ТГФ для препаративной СХ низкомолекулярных соединений на стиролдивинилбензолных насадках. Диизопропиловый эфир относительно летуч ($t_{\text{кип}}=68,3^\circ\text{C}$) и несколько более стабилен, чем ТГФ. Однако, по мнению авторов [19], поскольку диизопропиловый эфир не является растворителем, в котором гель хорошо набухает, колонку следует заполнять, используя суспензию геля в диизопропиловом эфире. Эти исследования наводят на мысль также, что между растворенным веществом и неподвижной фазой происходит взаимодействие, которое влияет на СХ-механизм разделения и обеспечивает несколько лучшее разделение, чем следовало бы ожидать.

Подвижная фаза должна быть всегда смешана и отфильтрована до ее добавления в резервуар для растворителя. Растворители, такие, как ТХБ, до фильтрации следует пропустить через силикагель для удаления влаги и каталитических примесей. Для большинства растворителей рекомендуется пропускание через инертные мембранные фильтры с размером пор 0,5 мкм в устройствах, выполненных целиком из стекла. Для растворителей, очень полярных или предназначенных для работы при повышенных температурах, можно рекомендовать ультразвуковую обработку, промывку гелием или вакуумную фильтрацию с целью удаления растворенных газов.

8.3.2. Подготовка образца

Нерастворимые и другие посторонние материалы должны быть удалены из образцов до разделения. Твердые образцы следует растворить в хорошем растворителе, отфильтровать и, может быть, осадить, добавив плохой растворитель, для удаления загрязнений. Для очистки от микрогелей и посторонних частиц, которые могут забить фильтры или другие части колонок, можно использовать высокоскоростное центрифугирование. Для удаления солей и низкомолекулярных включений из образцов биологических полимеров часто используют диализ. Для фильтрации полукристаллических восков и полимеров, таких, как полиэти-

лен и полипропилен, которые растворимы только при повышенных температурах, необходима специальная нагреваемая аппаратура. Для полного растворения таких полимеров, если они находятся в высококристаллической форме, может понадобиться короткое выдерживание при температурах 160—180 °С.

Если растворы готовят для разделения методом высокотемпературной СХ, то ингибиторы окисления часто добавляют непосредственно в раствор полимера. Добавка 0,05% сантанокса R в растворе полиэтилена и работа в атмосфере азота могут предотвратить разложение полимера, по крайней мере в течение 24 ч при температуре 135 °С. Чтобы предотвратить микробиологическое воздействие и изменение при этом состава, к водным растворам биологических материалов добавляют консерванты и другие добавки.

С целью облегчения желаемого фракционирования иногда образцы могут быть модифицированы или приготовлены специально. Воган и Френсис [16] термически разрушали высокомолекулярный образец коммерческого полипропилена с широким ММР, чтобы получить фракцию со средней M и продукты с более узким ММР для препаративной СХ. Маришима и сотр. [20] применили новую двухстадийную СХ-схему для удаления материала с высокой M и получения грубых фракций поливинилацетата, прежде чем фракционировать олигомеры с помощью полупрепаративной СХ.

8.3.3. Емкость для растворителя

Емкость для растворителя должна содержать достаточное его количество (от 3 до 80 л), чтобы обеспечить постоянство состава элюента в течение одного или большего числа разделений. Резервуар должен быть инертным по отношению к растворителю, изолировать растворитель от атмосферы, допускать нагревание растворителя, и, возможно, промывку его с помощью инертного газа, а также иметь приспособление для перемешивания (например, магнитную мешалку) с целью предотвращения изменения состава и обеспечения постоянства свойств подвижной фазы. В дополнение к этому резервуар должен быть вентилируемым и включать устройство для слежения за уровнем растворителя и детектирования течей. Большинство резервуаров конструируется из нержавеющей стали и (или) стекла. Резервуар должен быть расположен выше уровня системы подачи растворителя, и растворитель должен проходить через фильтр (5—10 мкм) до его поступления в насос. В некоторых системах имеются устройства для нагревания, установленные между резервуаром и фильтром для удаления растворенных газов.

Додгсон и сотр. [18] описали резервуар для растворителей, включающий автоматический дистиллятор для подачи подвижной фазы (толуола) в специально сконструированный насос для препаративной СХ.

8.3.4. Система подачи растворителя

Система подачи растворителя состоит из насоса, переключающих кранов, фильтра, индикатора давления, демпфера пульсаций. Насос должен обеспечивать возможность подачи растворителя с регулируемой скоростью потока до 100 мл/мин и включать устройства для демпфирования пульсаций. Датчик давления целесообразно располагать между насосом и узлом ввода пробы. Из-за больших диаметров колонок и соединяющих трубопроводов высокие давления не достигаются, и в общем проблема течей не является серьезной. Если в коллекторе фракций не используют сифон, то рекомендуется при помощи какого-либо устройства измерять поток и поддерживать его постоянным, насколько это возможно.

Для обеспечения непрерывной подачи растворителя наиболее широко применяются плунжерные возвратно-поступательные насосы. Пульсации можно уменьшить с помощью специально сконструированных двухголовочных возвратно-поступательных насосов. Иногда системы подачи растворителя, применяемые в аналитической ЖХ, могут быть модифицированы для работы при более высоких скоростях потока. Внутренние объемы возвратно-поступательных поршневых насосов обычно достаточно малы, и с помощью этих насосов можно обеспечить циркуляцию элюата.

Лесек и Квиворон [19] использовали диафрагменный насос «Орлита» (Национальное общество Elf, Франция) для СХ в стандартно-препаративном масштабе. Насос позволял устанавливать скорость потока до 80 мл/мин, работать при высоких давлениях (21 МПа) и имел небольшой мертвый объем, позволяющий организовать циркуляцию.

8.3.5. Узел ввода пробы (дозатор)

Предпочтительной системой дозирования является шестиходовой кран-дозатор с петлей. Для стандартно-препаративной СХ петлю изготавливают из трубки нержавеющей стали (0,28—0,64 внутр. диам.) объемом 10—100 мл. Петлевые дозаторы могут быть автоматизированы с помощью соленоидных кранов, их заполняют либо самотеком под действием силы тяжести, либо с помощью небольших насосных устройств для подачи раствора образца в петлю. Обычно дозатор помещают после насоса вблизи входа в колонку.

Следует предусмотреть минимальное размывание, обусловленное дозатором. Высокие скорости потока и высокие противодавления, встречающиеся вблизи входа в колонку, могут вызвать течь дозатора. Максимальная разность давления некоторых кранов в схеме стандартно-препаративного разделения составляет только 0,77 МПа, и, как было найдено, соленоиды, управляющие кранами, нагревают их и протекающие через них растворитель и растворы образцов. С целью предотвращения нагревания Ванг [21] предложил использовать пневматически управляемые (с помощью сжатого воздуха) краны с дистанционным управлением от контрольных соленоидов, а также разработать краны, выдерживающие разность давлений по меньшей мере 3,5 МПа. Пейросет и Панарис [8] уменьшили эффекты размывания, применив набор из 5 двухходовых электроуправляемых клапанов для заполнения петли образцом и ввода пробы в колонку.

Система ввода пробы Лесека и Квиворона [19] состоит из шестиходового крана, петли на 100 мл, шприца для образца и шприца для растворителя. Дозатор располагается на входной стороне насосной системы параллельно резервуару для растворителя (рис. 8.2). Эта система предназначена для циркуляции элюата и имеет то преимущество, что исключается обычно высокое давление на дозаторе, расположенном между насосом и колонкой. Единственным недостатком является то, что элюент должен проходить через насосную систему перед тем, как вводится в колонку.

Загрузка образца в петлю может вызвать затруднения, если растворенные вещества слишком концентрированы или вязки. Растворенные вещества могут также образовывать осадки на уплотнениях, фильтрах и т. д. и вызывать неполадки в насосных устройствах для автоматического ввода пробы. Такие проблемы иногда встречаются в случае фракционирования растворов полимеров с высокой молекулярной массой, и их можно преодолеть, используя инертный газ для создания избыточного давления при загрузке образца в петлю.

Пейросет и сотр. [9] рекомендуют применять инертный газ для предотвращения окисления растворов образцов и промывания кранов дозаторов свежим растворителем при высокотемпературном (150 °С) разделении полиэтилена.

8.3.6. Колонки и материалы для заполнения колонок

Примеры колонок и материалы для заполнения колонок в препаративной СХ приведены в разд. 8.2. Так как колонки должны быть способны выдерживать умеренные давления и химические взаимодействия с различными подвижными фазами, то предпочтительным конструкционным материалом является нержавею-

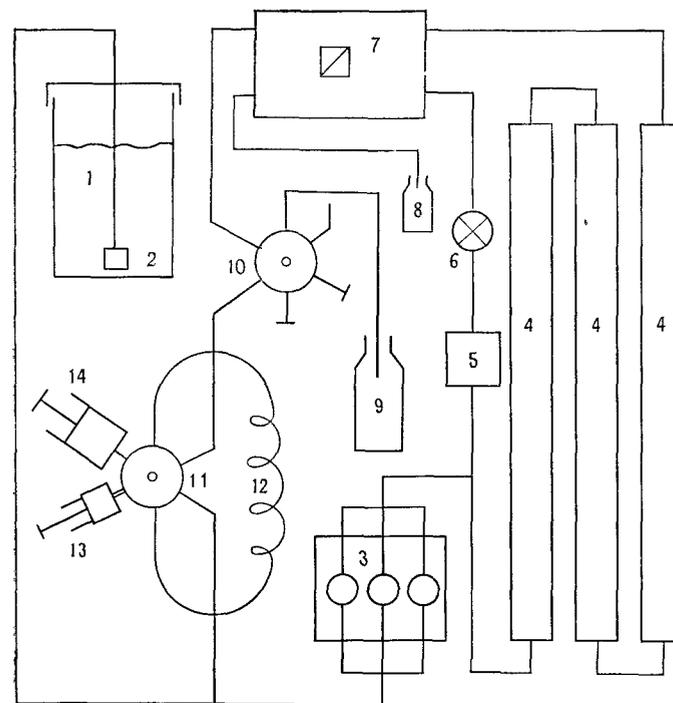


Рис. 8.2. Схема препаративной установки. 1 — резервуар для растворителя, 2 — фильтр, 3 — насос, 4 — колонки, 5 — датчик давления, 6 — кран, 7 — дифференциальный рефрактометр, 8 — сброс, 9 — коллектор фракций, 10 — 6-ходовой кран для циркуляции, 11 — 6-ходовой кран-дозатор, 12 — петля объемом 100 мл, 13 — шприц для ввода образца, 14 — шприц для растворителя [19].

щая сталь. При низких давлениях (менее ~1,5 МПа) и в случаях, когда растворители разрушают нержавеющую сталь (например, при использовании кислых водных растворителей, содержащих HCl), целесообразно применять толстостенные стеклянные колонки. Пористые пластинки (фритты) из нержавеющей стали или никеля с размером пор 5—20 мкм обычно помещают на концах колонки для удерживания насадки и обеспечения хорошего распределения подвижной фазы на входе в колонку. Концевые устройства и соединения должны быть разработаны таким образом, чтобы мертвый объем был минимальным. Следует также предусмотреть, чтобы во время заполнения и работы внутри колонки не образовывались мертвые пространства. Для заполнения колонок насадками из твердых материалов с частицами большого размера (более 20 мкм) рекомендуется методика заполнения сухой насадкой. Для заполнения

Таблица 8.2. Насадки для препаративной СХ

Тип	Поставщик	Примечание
Поперечно шитый гель сополимера стирола с дивинилбензолом (37—75 мкм) — стирагель	Waters (США)	Используют только с определенными органическими растворителями, нельзя использовать с ацетоном, спиртами или водными растворителями и при давлениях, превышающих 4,2 МПа
Пористые стеклянные шарики Порасил	Waters (США)	Поставляются как необработанные или дезактивированные сферические частицы (37—75 мкм)
Сферосил	Chrompack (Голландия) Rhône-Poulenc (Франция) RSL (Бельгия) Supelco (США)	Необработанные сферические частицы (<40 мкм)
Гель SI	E. Merck (ФРГ)	Необработанные частицы нерегулярной формы
Vit-X	Perkin-Elmer (США)	Химически дезактивированные частицы нерегулярной формы (36—44 мкм)
Корнинг-глас	Electro-Nucleonics (США)	Необработанные или модифицированные глицеральными группами частицы нерегулярной формы (37—74 мкм)
Полиакриламидный гель (акриламид поперечношитый N,N'-метиленбисакриламидом), Биогель P2	Bio-Rad Labs (США)	Нейтральный, гидрофильный гель, частицы 37—75 мкм, для работы с водными растворителями; не рекомендуется использовать при давлениях выше 0,7—1 МПа
Полисахаридные шарики (Декстраны поперечношитые эпихлоргидрином), сефадекс G-25	Pharmacia Fine Chemicals (США)	Относительно мягкий гель, частицы 10—30 мкм, для работы в водных растворителях; не рекомендуется работать при давлениях выше 1—1,4 МПа
Сефадекс LH-20		Гидроксил-пропилированный сефадекс С-25, для работы с полярными органическими растворителями, полужесткие частицы (25—100 мкм); не рекомендуется использовать при давлениях выше 1—1,4 МПа
Сульфированный поперечношитый гель сополимера стирола с дивинилбензолом, гидрогель	Waters (США)	Гель с частицами размером менее 37 мкм для работы в водных растворах, pH 7

Продолжение

Тип	Поставщик	Примечание
Винилацетатные сополимеры или гель EM	E. Merck (ФРГ)	Относительно мягкие частицы геля OR-PVA (30—63 мкм); для работы с ацетоном, спиртами и другими органическими растворителями; не рекомендуется работать при давлениях выше 0,7—1 МПа

частицами полутвердых или мягких гелей обычно необходима специальная методика (см. [2, разд. 6.3]).

Для аналитической и препаративной СХ подходят одинаковые типы насадок. Однако, поскольку скорость разделения и разрешение не являются в препаративной СХ столь критичными, а также по соображениям стоимости более часто используют частицы большего диаметра (37—75 мкм). Ряд изготовителей продают насадки, имеющие широкий интервал пористости (табл. 8.2). Таблицу 8.2 не следует рассматривать как полный перечень фирм-изготовителей и продуктов; их число непрерывно увеличивается. Пределы разделения и ограничения к применению тех или иных насадок следует тщательно учитывать при установлении параметров препаративных разделений. Для уменьшения стоимости и расширения пределов ситового разделения в одной препаративной колонке располагают слоями насадку различной пористости.

8.3.7. Детектирующая система

Для анализа элюата используют систему, состоящую из детектора и записывающего устройства. Детектор может быть подсоединен последовательно либо параллельно выходу колонки, а записывающая система непрерывно показывает сигнал детектора в зависимости от времени элюирования или объема. Для аналитической и препаративной хроматографии подходят одни и те же типы детекторов и самописцев, только они обычно нуждаются в модифицировании, а высокая чувствительность, необходимая для аналитической работы, не требуется и не всегда желательна в препаративной СХ из-за больших скоростей потока и высоких концентраций образца.

Целью детектирования является получение информации о разрешении и относительных концентрациях компонентов раз-

деляемого вещества, с тем чтобы помочь оператору решить, когда и как часто необходимо отбирать фракции. На практике такая система сообщает оператору о проблемах или нарушениях, происходящих в препаративной системе, указывая на изменение времен удерживания (объемов элюирования) или на другие изменения в хроматограмме.

В качестве детектора наиболее широко используют дифференциальный рефрактометр (РФ)—идеальный детектор для СХ, в которой состав подвижной фазы остается постоянным. Главным ограничением РФ-детекторов является детектирование компонентов, имеющих малое отличие в показателях преломления по отношению к значениям для подвижной фазы или компонентов, присутствующих при низких концентрациях. Небольшие флуктуации в составе подвижных фаз, содержащих смесь растворителей, а также изменения в давлении и температуре могут создать дополнительные трудности в применении РФ-детекторов.

УФ-детекторы со специальными ячейками, имеющими короткую длину, для препаративной ЖХ в настоящее время коммерчески доступны. Детекторы с изменяемой или сканируемой длиной волны (λ) для УФ- и видимой области спектра особенно полезны для детектирования специальных типов соединений, имеющих максимум поглощения в различных областях спектра (например, окрашенные соединения при $\lambda > 300$ нм). Действительно, эти детекторы могут быть настроены на детектирование при длине волны, отличной от длины волны абсорбционного максимума растворенного вещества; таким образом можно уменьшить чувствительность и вероятность перегрузки выходного сигнала детектора.

Для уменьшения противодавления, возникающего при высоких объемных скоростях, детекторы должны быть сконструированы из трубки большого внутреннего диаметра (0,75 мм или больше). Хотя такие модифицированные РФ- и УФ-детекторы имеются в продаже, существует необходимость улучшить конструкцию ячейки детектора для того, чтобы работать при высоких скоростях потока без создания большой разности давлений. Альтернативный подход заключается в использовании делителя потока между выходом колонки и коллектором фракций с тем, чтобы направить небольшую часть элюата в аналитический детектор. При таком подходе необходимо предусмотреть защиту ячейки детектора от высокого давления и обеспечить постоянство относительной скорости потока или доли элюата, попадающего в детектор, причем состав элюата, поступающего в детектор, должен быть идентичным составу элюата, поступающего в сифон или коллектор фракций.

8.3.8. Сбор фракций и выделение веществ

Для единичного разделения или для выделения одного или только нескольких компонентов часто достаточно собрать фракцию вручную. Однако для повторяющихся опытов и в тех случаях, когда есть необходимость выделить много фракций, сбор фракций должен быть автоматизирован. Так как небольшое изменение в скорости потока приводит к значительному изменению времен удерживания компонентов, разделяемых методом СХ, то при многократных разделениях рекомендуется использовать устройства сифонного типа или другие, основанные на измерении объема. Сифоны часто применяются в системах сбора фракции карусельного типа. Объем фракции зависит от емкости сифона. Элюат наполняет сифон, который затем опорожняется в контейнер, помещенный в коллекторе фракции. Опорожнение сифона служит сигналом для устройства задерживающего вращения карусели и переводящего затем другой контейнер в позицию для сбора следующей фракции. В приборе Ара-Прер использован детектор с фотоэлементом, который сообщает о сборе заранее установленного объема фракции в установленной камере, и 40-ходовой кран для распределения последовательных фракций в определенные контейнеры.

Объем собираемой фракции зависит от типа или целей фракционирования и от характеристик колонки (или колонок). Максимальный объем элюата, собираемый в течение одного опыта, приблизительно равен общему объему жидкости, содержащейся в порах СХ-насадки, т. е. $V_m - V_0$. Этот объем соответствует также максимальному общему разбавлению вводимого образца. Для операций очистки образца с целью удаления высокомолекулярных или низкомолекулярных включений может быть желательнее собрать одну большую фракцию образца, элюируемого в интервале между V_0 и V_m . В то же время могут понадобиться фракции небольших объемов для выделения высококачественных компонентов образца, присутствующих в небольших количествах. В любом случае рекомендуется провести пробный опыт и испытать полученные фракции в аналитической СХ, прежде чем начать многоцикловое фракционирование.

В зависимости от природы растворителя и растворенного вещества выделить вещество из фракции можно различными методами. В случае летучих растворителей наиболее простым и прямым методом является упаривание растворителя. Следует принять меры предосторожности, чтобы не перегреть или не загрязнить фракции (например, конденсированной водой) в процессе выделения. Большие объемы растворителя могут быть эффективно и надежно удалены с помощью вакуумного роторного испарителя. Сушка при температуре ниже точки замороз-

ния служит отличным методом удаления ряда растворителей, например воды, бензола, трихлорбензола и диоксиана, перевода фракции в менее плотную форму для более легкого оперирования. Фракции, содержащие добавки растворителя (например, антиоксидант в ТГФ), возможно, необходимо промыть, вновь растворить и осадить несколько раз, прежде чем они станут чистыми. Фракцию растворенных веществ, осаждающихся с трудом или имеющих тенденцию к образованию комплексов с растворителем подвижной фазы, можно выделить с помощью жидкостной экстракции, используя делительные воронки. Растворенные вещества, склонные к кристаллизации, иногда можно выделить после частичного удаления растворителя и добавления плохого растворителя или путем понижения температуры.

8.3.9. Повторное разделение и методы циркуляции

Фракции растворенных веществ, полученные с помощью препаративной СХ, могут быть разделены повторно для повышения их чистоты. Часто лучшие результаты достигают путем первоначального разделения образца на относительно большие по объему фракции с последующим разделением каждой фракции с помощью препаративного разделения и сбора малых по объему фракций. Такой подход был с успехом использован для получения полимерных фракций с узким молекулярно-массовым распределением (ММР) [8, 9]. Полимеры с широким ММР могут быть разделены на фракции, содержащие высокие, средние и низкие молекулярные массы M с более узким ММР, чем в первоначальном образце. При повторном фракционировании могут быть выбраны иные колонки и параметры разделения, если это необходимо для оптимизации разделения каждой фракции.

Разрешение в препаративной СХ может быть также улучшено путем направления элюата, вытекающего из колонки в насос и прокачивания его опять через колонку (для колонки). Этот процесс увеличивает эффективную длину колонки и в принципе может быть повторен до тех пор, пока образец, подлежащий разделению, занимает весь объем колонки. Циркуляция дает возможность уменьшить длину колонки (количество материала насадки) или число колонок и потому стоимость, необходимую для достижения конкретного разделения. Отсутствует промежуточная переработка растворенного вещества и требуется меньше растворителя. При уменьшении длины колонки уменьшается противодавление колонки. Это увеличивает время жизни колонки и позволяет использовать более высокие скорости потока, что уменьшает расходы на разделение и его время.

Размывание полосы, обусловленное инструментальными факторами, ограничивает число циклов. Кроме того, образец может иметь настолько широкое распределение, что при первом начальном цикле весь объем пор будет занят, и при циркуляции будет реализовано только очень небольшое улучшение в разрешении. Инструментальное размывание полосы связано с диффузией и является результатом многочисленных эффектов. При циркуляции мертвый объем насоса и соединяющих трубопроводов и соединений является главным источником размывания. Потери хроматографического разрешения связаны также с пульсациями и процессами смешивания во время прохождения элюата через насос. В действительности конструкция насоса — вероятно, наиболее критический момент, который следует обсуждать при циркуляционных разделениях. Как отмечалось в разд. 8.3.4, рекомендуется использовать поршневые возвратно-поступательные насосы. Двухголовочные возвратно-поступательные насосы могут исключить необходимость применения демпферов пульсации, устанавливаемых между насосом и колонкой, и поэтому уменьшить мертвый объем. Однако очень важно, чтобы вытесняемые объемы в цилиндрах и переключающих кранах были минимальными и в конструкции насоса были исключены смешивающие камеры. Поршни должны быть «настроены» таким образом, чтобы они подавали равные объемы; трубопроводы, соединяющие каждый цилиндр насоса с входом и выходом насоса, должны быть идентичными для уменьшения эффектов смешивания. Если использовать петлевой дозатор, то кран-дозатор должен быть повернут в положение загрузки после того, как образец введен, а длина байпасной трубки для предотвращения размывания полосы должна быть как можно более короткой.

Циркуляция образцов с широким распределением может быть осуществлена путем селективного удаления частей элюата и добавления растворителя в систему с помощью специального переключающего крана. После удаления полимерных фракций с высокими и низкими M соответственно вблизи V_0 и V_m размывание может быть уменьшено, что позволит обеспечить дальнейшую циркуляцию и лучшее разрешение фракций с промежуточными M .

Так как при циркуляции концентрации фракций разделяемых веществ уменьшаются, то объем фракций увеличивается с увеличением числа циклов. Поэтому может стать необходимым дополнительное время и оборудование для выделения вещества из фракций. Сбор фракций становится также более сложным, особенно если фракции должны быть селективно удалены на определенных стадиях процесса циркуляции. При наличии дополнительных переключающих кранов для регулирования процесса автоматизация становится более сложной, и при исполь-

зовании многократного ввода пробы воспроизводимость объема элюирования (времен) для фракции растворенных веществ становится абсолютно необходимой.

Рассматривая целесообразность циркуляции, следует тщательно взвесить преимущества и проблемы, возникающие при этом. В своих тезисах Ванг [21] описал прибор для фракционирования полимеров в стандартно-препаративном масштабе СХ с помощью циркуляции. Он сделал заключение, что метод дает преимущества при получении фракций с узким ММР, однако экспериментальные трудности значительны. Ванг отметил, что можно сконструировать и разработать автоматический прибор, который позволит преодолеть многие из этих трудностей, но сделал оговорку, что небольшое количество фракции полимера с данными ММР, полученное с помощью циркуляции, имеет ту же стоимость и требует тех же усилий, которые нужны для получения той же фракции крупномасштабным (большие колонки) препаративным СХ-методом.

С другой стороны, Лесек и Квиворон [19] достигли большого успеха в применении циркуляции для препаративных СХ-разделений соединений с низким M и отметили в качестве дополнительных преимуществ низкий расход растворителя и долгую жизнь колонки. Схема их прибора показана на рис. 8.2. Система подачи растворителя, отмеченная в разд. 8.3.4, состоит из дифрагменного насоса с малым мертвым объемом с тремя головками, смещенными на 120° по фазе. Дозатор расположен параллельно резервуару для растворителя между насосом и шестиходовым краном для циркуляции. В положении циркуляции элюат проходит через дозатор в насос, а в положении отбора фракций элюат направляется в коллектор фракций.

8.3.10. Регулирование температуры

Дозатор, колонки и другие части препаративной системы СХ, прямо влияющие на разделение образца, должны находиться при постоянной температуре. Рабочая температура зависит главным образом от характеристик растворимости, вязкости и летучести подвижной фазы. Высокая температура может требоваться для улучшения растворимости образцов или для уменьшения вязкости подвижной фазы. В противоположность этим требованиям компоненты системы для СХ, такие, как насос, детектор, коллектор фракции, могут быть не предназначенными для работы при повышенных температурах (выше 60°C); соображения летучести и безопасности могут также ограничить использование некоторых растворителей только умеренными температурами (меньше 40°C), а циклическое изменение температуры системы с ее повышением и понижением может обусловить появление течей.

Масса насадки в колонке (размер колонки) и объем подвижной фазы в препаративной СХ могут потребовать значительного времени для достижения системой термического равновесия. В дополнение к этому из-за размера и относительно большого времени опыта трудно поддерживать постоянную температуру. Это приводит к тому, что на времена элюирования и разделение компонентов в препаративной СХ в значительной степени влияют небольшие изменения в температуре. Систематические изменения температуры и скорости потока подвижной фазы (разд. 8.3.4) губительны для многоцикловых разделений.

Эффекты изменения температуры и скорости потока могут быть существенно смягчены введением сифонных устройств в коллектор фракций. Точное регулирование температуры в общем не является критическим фактором в тех случаях, когда используют сифон и когда подвижная фаза хорошо растворяет фракционируемый образец. В действительности при наличии сифонных устройств удовлетворительные результаты многоцикловых разделений могут быть получены при обычных температурах в лабораториях с контролируемой температурой и в случае колебаний температуры на $\pm 5^\circ\text{C}$.

8.4. Оптимизация препаративного разделения

Оптимизация препаративных разделений методом СХ зависит от правильного выбора рабочих параметров: подвижной фазы, температуры, концентрации раствора образца, объема вводимой пробы, скорости потока, размера колонки, типа расположения насадки, а также объема фракций. Эти параметры могут устанавливаться в широких пределах и в известной степени быть взаимозависимыми. Вопросы, связанные с выбором подвижной фазы, температуры и ограничениями, связанными с насадкой, уже были рассмотрены. Остальные параметры прямо зависят от размера колонки и требуемой производительности разделения.

В препаративных СХ-разделениях колонки часто перегружают и используют высокие скорости потока с целью добиться максимальной производительности, жертвуя при этом хроматографической эффективностью, измеренной числом теоретических тарелок N или разрешением R_s . Поэтому при оптимизации любого разделения необходимо знание относительной важности рабочих параметров и их влияния на качество хроматографического разделения. К счастью, теория и практика оптимизации аналитических СХ-разделений может в значительной степени помочь в выборе условий препаративной СХ. Например, желательно поддерживать ту же линейную скорость потока подвижной фазы в колонках, имеющих различный внутренний диаметр.

Для одних и тех же насадок объемные скорости для препаративных колонок F_P могут быть оценены из скоростей потока F_A , рекомендуемых для колонок аналитической СХ, согласно соотношению

$$F_P = (D_P/D_A)^2 F_A \quad (8.1)$$

где D_P и D_A — внутренние диаметры препаративной и аналитической колонок соответственно.

Если оптимальная скорость потока для аналитической колонки диаметром 0,77 мм равна 1 мл/мин, то рекомендуемая скорость потока для препаративных колонок диаметром 2 см и 6 см соответственно равна 6,75 и 60,7 мл/мин.

Купер и сотр. [1] рассматривали влияние экспериментальных параметров на эффективность препаративных СХ-разделений. Они цитировали работу Дарка и сотр. [22], в которой влияние скорости потока на разделение оценивают по разрешению $R_{1,2}$ двух стандартов полимеров с узким ММР:

$$R_{1,2} = 2(V_{e_1} - V_{e_2}) / (W_1 + W_2) \quad (8.2)$$

где для каждого компонента определяют объем элюирования пика V_e и ширину пика W в единицах элюируемого объема (на нулевой линии под элюируемым пиком) и обозначают индексом 1 и 2. На двух препаративных колонках (каждая длиной 122 см, наружным диаметром 6,4 см), заполненных стирогелем (10^6 и 10^4 Å), с толуолом в качестве подвижной фазы при 45 °С Дарк и сотр. [22] фракционировали 1 г образца, состоящего из равных количеств полистирольных стандартов с M 392 000 и 9700. При этом было найдено, что разрешение уменьшается с увеличением скорости потока: $R_{1,2} = 1,91$ при скорости потока 38 мл/мин и $R_{1,2} = 1,78$ при 83 мл/мин. Используя колонки для стандартно-препаративной СХ, заполненные пористым стеклом корнинг (Corning), обработанным гексаметилдисилазаном (фирмы Electro-Nucleonics), Купер и сотр. [14] исследовали влияние скорости потока на фракционирование полистирола с широким ММР. По их оценке, оптимальная скорость потока для колонки составила 50 мл/мин. Концентрация раствора образца (1,5 г на 100 мл), объем вводимой пробы (100 мл) и объем фракции (200 мл) поддерживались постоянными во всем диапазоне скоростей потока от 50 до 140 мл/мин. Качество разделения связывали с отношением молекулярных масс M_w к M_n в каждой фракции. Для определения среднечислового и среднемассового параметров M_n и M_w соответственно использовали аналитическую СХ и найденные значения брали для оценки размывания полосы. Оказалось, что как объем, замеренный сифоном, так и общий объем элюирования были постоянны во всем диапазоне скоростей потока, за исключением, возможно, фракции с наи-

Таблица 83 Значения M_w и M_w/M_n , полученные при стандартно-препаративном фракционировании методом СХ полистирола ($M_w = 257200$ г/моль, $M_w/M_n = 2,015$) [14]

Номер фракции	Скорость потока, мл/мин	M_w , г/моль	M_w/M_n
30	50	599 400	1,16
	80	470 000	1,22
	140	441 900	1,27
36	50	139 500	1,31
	80	120 500	1,26
	140	110 000	1,32
42	50	32 500	1,28
	80	22 600	1,31
	140	23 400	1,25

вышей M . Они не наблюдали заметного влияния скорости потока на параметр полидисперсности M_w/M_n (табл. 8.3). Авторы не предложили объяснения наблюдаемому уменьшению значения M_w с увеличением скорости потока. Их результаты наводят на мысль, что в стандартно-препаративном масштабе фракционирования полимеров можно использовать более высокие скорости потока, чем получаемые на основе данных работы аналитических СХ-колонок.

Из соображений массообмена следует ожидать, что скорость подвижной фазы меньше влияет на соединения с низкой M , чем на разделение полимеров с высокой M . Такие эффекты в действительности наблюдаются в аналитической СХ. Этому вопросу посвящено мало исследований, и требуется дальнейшее развитие теории, чтобы точно предсказать влияние скорости потока на разрешение как функции размера молекул и диаметра колонки. Лесек и Квиворон [19] исследовали влияние скорости потока в препаративной СХ соединений с низкой M . Они использовали три колонки, каждая 150 см × 2,6 см (внутр. диам.), заполненные стирогелем (15—25 мкм) с размером пор 100 Å, и диизопропиловый эфир в качестве подвижной фазы. Хотя число теоретических тарелок N резко уменьшается с увеличением скорости потока при низких нагрузках образца, по их наблюдениям, скорость потока мало влияет на число N при более высоких нагрузках в диапазоне скоростей от 5 до 40 мл/мин (рис. 8.3). График произведения числа тарелок на число граммов, фракционируемых в 1 мин, в зависимости от скорости потока показывает, что максимальная эффективность достигается при высоких скоростях потока и высоких нагрузках образца (рис. 8.4). Они также предупреждают, что N заметно уменьшается при этих условиях и его следует поддерживать выше некоторого минимального уровня, чтобы получить адекватное раз-

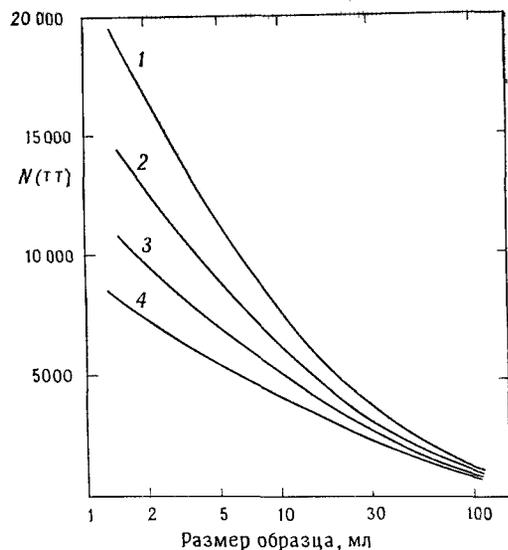


Рис. 8.3. График зависимости эффективности СХ-колонки от величины образца. 3 колонки $150 \times 2,6$ см ($d_{\text{внутр}}$), заполненные стирогелем-100 А с размером частиц 15–25 мкм. Подвижная фаза: диизопропиловый эфир. Скорость потока: 1 — 5 мл/мин, 2 — 10 мл/мин, 3 — 25 мл/мин, 4 — 40 мл/мин. Растворенное вещество: чистый гептан [19].

деление. Применяя соотношения, развитые для описания разделения двухкомпонентного образца в циркуляционной ЖХ, они рассчитали для своей препаративной СХ-системы число циклов, необходимое для достижения полного разделения обоих компонентов ($R_s = 1,5$), как функцию трудности разделения α , где

$$\alpha = (V_{e2} - V_0) / (V_{e1} - V_0) \quad (8.3)$$

Была также рассчитана производительность (разделенное число граммов в 1 мин), и было найдено, что она находится в хорошем соответствии с экспериментальными результатами для различных значений α . Например, 50 мл смеси гептана и бензола ($\alpha = 2,2$) разделяют в одном цикле с производительностью более 3 г/мин, тогда как для 50 мл смеси гептан — додекан ($\alpha = 1,1$) для разделения требуется 10 циклов и производительность составляет всего 0,1 г/мин.

Согласно рекомендациям Яу и сотр. (см. [2, гл. 7.4]), объем образца, вводимого в хроматограф аналитической СХ, должен быть меньше $1/3$ объема элюируемого пика на уровне нулевой линии, получаемого при вводе небольшого образца низкомолекулярного соединения, элюируемого вблизи V_m . Они предположили, что те же ограничения должны быть применимы в пре-

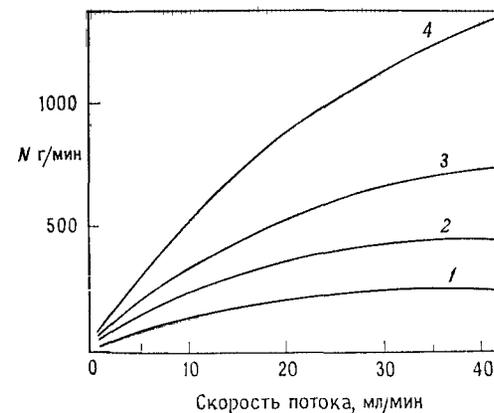


Рис. 8.4. График зависимости производительности числа тарелок на производительность (г/мин) от скорости потока. Условия те же, что на рис. 8.3. Нагрузки: 1 — 2 мл, 2 — 5 мл, 3 — 10 мл, 4 — 30 мл [19].

паративной СХ, и рекомендовали вводить образцы в препаративной СХ в виде относительно больших объемов с низкой концентрацией раствора, а не в виде малых объемов с большой концентрацией. Из большинства публикуемых работ очевидно, что в препаративной СХ допустимы объемы пробы, значительно больше, чем $1/3$ объема, измеренного на нулевой линии. Оптимальный вводимый объем зависит главным образом от диаметра колонки, ее длины и требуемого разрешения. Число тарелок, по-видимому, менее чувствительно к увеличению объема образца в тех случаях, когда увеличивается диаметр колонки [23]. Увеличение длины колонки (или циркуляция) улучшает разрешение, но имеет также обратный эффект, связанный с увеличением времени разделения и уменьшением при этом производительности. Преимущества использования больших объемов пробы в препаративной СХ-хроматографии полистиролов было продемонстрировано Като и др. [6]. Они нашли, что эффективность фракционирования (значение M_w/M_n на фракцию) заметно улучшается с увеличением вводимого объема при постоянной массе образца (рис. 8.5). Янча [24] показал, что отношение концентрации раствора полимера к вводимому объему может изменяться в широком диапазоне без значительного изменения разделения до тех пор, пока общее количество полимера, вводимого в колонку, остается постоянным и вводимый объем пренебрежительно мало влияет на общую ширину кривой элюирования. Следовательно, так как кривые элюирования для полимеров с широким ММР меньше зависят от увеличения вводимого объема, то для разделения полимеров с широким ММР можно

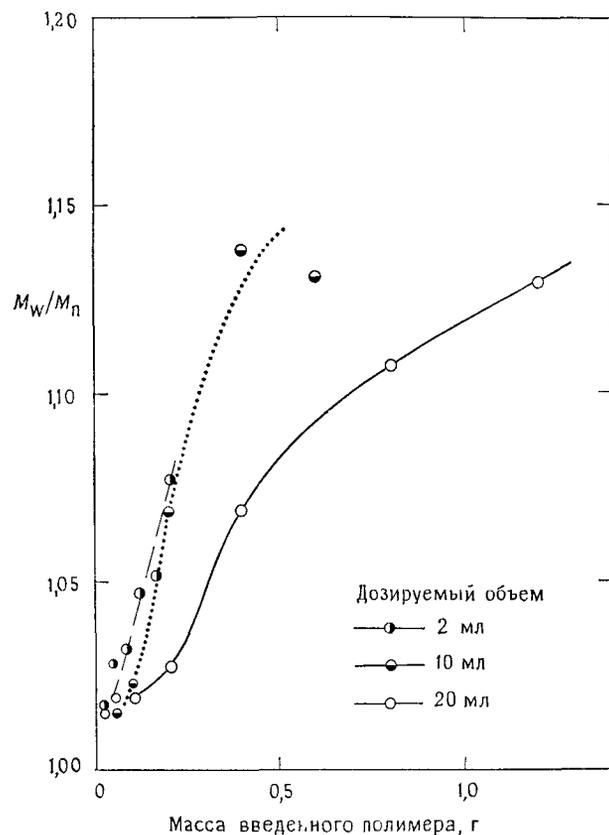


Рис. 8.5. Влияние величины вводимого объема пробы на эффективность (M_w/M_n) препаративного СХ-фракционирования фракции В полистирола [6].

использовать намного большие объемы образца. При многоцикловых препаративных разделениях объем образца должен поддерживаться постоянным, так как объемы элюирования растворенных веществ изменяются на половину изменения вводимого объема.

Существуют оптимальные концентрации растворов образца или размеры образца, за пределами которых объемы элюируемых растворенных веществ увеличиваются и число тарелок уменьшается. В аналитической СХ максимальный размер образца для низкомолекулярных образцов составляет 0,1—1 мг на 1 г насадки колонки [25]. В случае больших нагрузок при входе образца в колонку в месте ввода развивается неравновесная ситуация. В таких условиях колонка, как говорят, становится

«перегруженной». При разделении высокомолекулярных полимеров перегрузка колонки может быть также результатом двух других эффектов — уменьшения размера полимерной цепи, обусловленного изменением растворимости с увеличением концентрации образца, и эффекта вязкости, обусловленного увеличением вязкости раствора образца с увеличением концентрации. В препаративной СХ для получения необходимой производительности колонки обычно перегружают. Массу вводимого образца следует увеличивать до тех пор, пока разрешение или эффективность колонки (M_w/M_n на фракцию для полимера) являются достаточными. Так как в условиях перегрузки колонки изменяется как объем элюирования, так и разрешение, то концентрация образца должна оставаться постоянной в многоцикловых препаративных СХ-разделениях.

В идеальном случае следует избегать перегрузки колонок и использовать низкие концентрации образца (менее 2 мг/мл) при фракционировании высокомолекулярных полимеров с целью получения фракций с узким ММР. На практике препаративные СХ-колонки часто бывают перегруженными, и для получения относительно больших количеств фракций полимеров с узким ММР ($M_w/M_n < 1,1$) можно применить такие методы, как повторное разделение и циркуляция (разд. 8.3.9). Купер и сотр. [14] исследовали влияние концентрации полимера на препаративное СХ-разделение полистиролов с узким и широким ММР. Изменяя концентрацию образца в интервале 1—20 мг/мл, они обнаружили, что значительное влияние на объем элюирования оказывают как концентрация, так и молекулярная масса вводимого полимера: увеличение элюируемого объема с увеличением концентрации полимера, связанное с перегрузкой колонки, становится большим в случае увеличения M образца полимера. Они также нашли, что разрешение $R_{1,2}$ [уравнение (8.2)] пары полимеров с высокой M и узким ММР было хуже, чем для полимеров с меньшей M , и что значение $R_{1,2}$ заметно уменьшается с увеличением концентрации раствора от 1 до 10 мг/мл. В действительности при низких концентрациях (менее 10 мг/мл) они наблюдали, что полидисперсность (M_w/M_n) фракций пропорциональна количеству введенного образца. Они также сообщили, что первая элюируемая полимерная фракция имеет наиболее узкое ММР и полидисперсность относительно слабо зависит от количества введенного полимера. В общем эффект перегрузки становится особенно заметным, когда увеличивается M фракционируемого полимера. Аналогичные эффекты перегрузки наблюдали в стандартно-препаративной СХ полистиролов [10, 26, 27], полиметилметакрилатов [28] и поливинилхлорида [17]. Для того чтобы оптимизировать производство фракций с узким ММР, Монтегью и Пикер [10] предположили, что в случае полимеров,

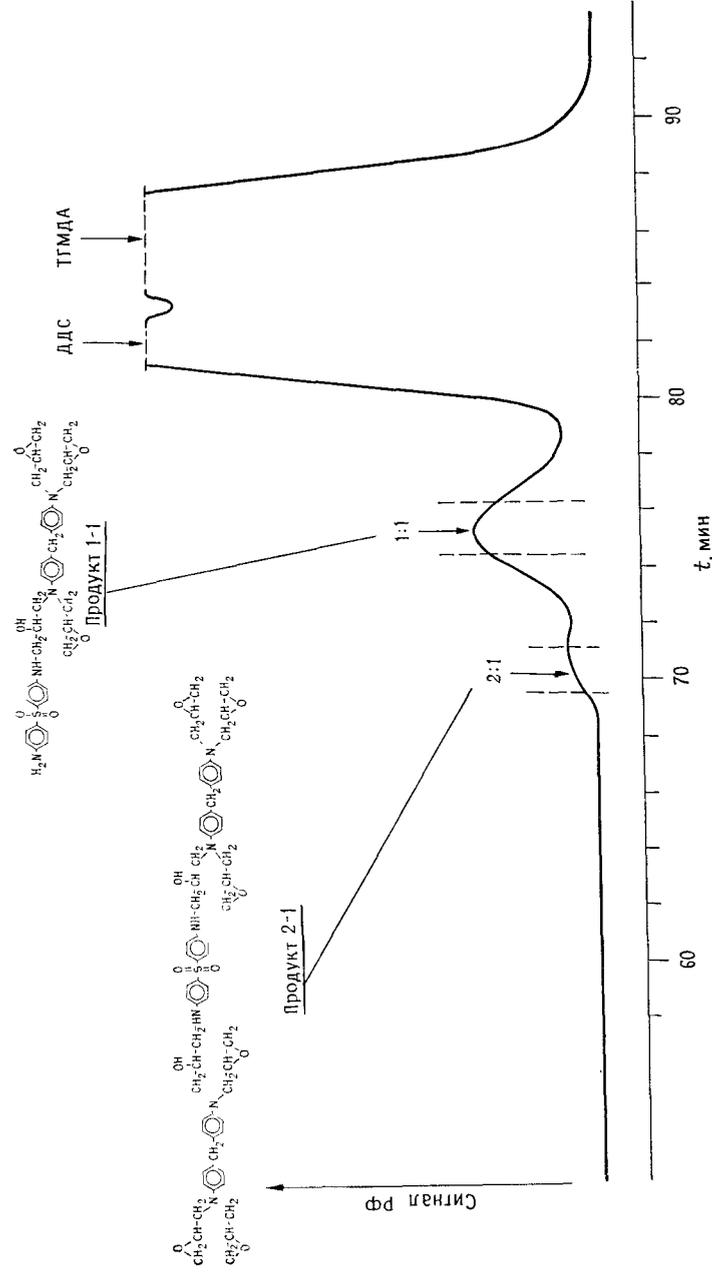


Рис. 8.6. Препаративная СХ смеси N,N'-тетраглицидилметилданилина (ТГМДА) и 4,4'-диаминодифенилсульфона (ДДС) (1 : 3 по массе); эпоксисмола реагировала 23 мин при 145 °С [31].

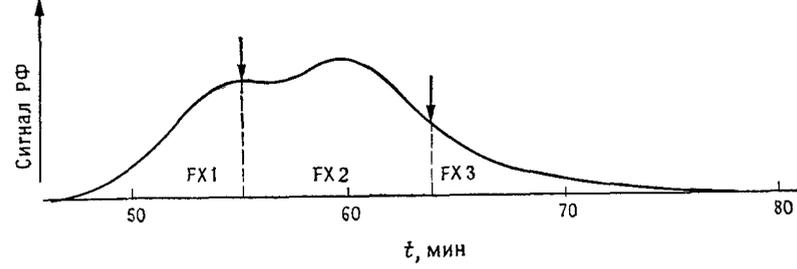


Рис. 8.7. Препаративное разделение фракций полистирола, содержащих привитые в центре и по краям диазогруппы [32].

имеющих различные M , следует использовать высокие нагрузки (большие концентрации образца и вводимые объемы) и выделять только начальную фракцию.

В целом можно ожидать улучшение качества и разделяющей эффективности с увеличением внутреннего диаметра колонки для СХ. Как уже обсуждалось в разд. 8.3.6, тип, пористость, стоимость и доступность материала насадки являются критическими факторами в создании и работе любой препаративной системы для СХ. Като и сотр. [6] показали преимущество использования насадок, имеющих малый диаметр частиц, для получения высокого разрешения в препаративной СХ высокомолекулярных полимеров. Альбрехт и Глэкнер [29, 30] исследовали влияние расположения насадки на элюирование и эффективность разделения полимеров с помощью препаративной СХ. Они нашли, что можно оптимизировать разделение путем расположения насадки в виде слоев в таком порядке, чтобы средний размер пор насадки убывал в направлении потока в колонке. Было в значительной мере уменьшено влияние концентрации, и причем при каскадном расположении насадки можно было увеличить выход полимера.

Оптимальный объем фракции прямо зависит от объема и концентрации вводимого образца и разделяющей способности и размера колонки. Для низкомолекулярных образцов или смесей полимеров и низкомолекулярных компонентов объем каждой фракции зависит от объема элюирования и разрешения каждого компонента и от того, необходимо ли выделять только некоторые определенные компоненты. Если пик интересующего компонента относительно хорошо разрешен, например как продукт 1 : 1 на рис. 8.6, то может быть собрана его центральная часть. Для перекрывающихся пиков (рис. 8.7) могут быть собраны фракции на фронте ($F \times 1$) и на хвосте ($F \times 3$), а также в центральной части ($F \times 2$) пика. В обоих случаях требуемая чистота каждого компонента определяет объем фракции. При препаративном

СХ-фракционировании полимеров полидисперсность фракций полимеров уменьшается с уменьшением объема фракции. Хаттори и сотр. [17] показали, что уменьшение объема фракции меньше влияет на уменьшение полидисперсности M_w/M_n , когда M фракции уменьшается или увеличивается объем элюирования.

Как отмечалось выше, повторное фракционирование и метод циркуляции способствуют увеличению выхода и уменьшению стоимости разделения. Благодаря уникальной природе СХ образцы можно также вводить последовательно с интервалом, соответствующим примерно объему V_0 , увеличивая выход образца, экономя объем растворителя и уменьшая время разделения.

Влияние изменения рабочих параметров на эффективность или разрешение в препаративной СХ по существу то же, что и в аналитической СХ. Однако относительная важность некоторых параметров зависит от типа и масштаба разделения. Стоимость, безопасность, доступность оборудования, ограничения системы и другие практические факторы ограничивают возможность варьирования рабочих параметров с целью улучшения эффективности колонки и обеспечения необходимой производительности. В препаративной СХ оптимизация не обязательно требует получения наивысшего числа тарелок или наилучшего разрешения. Оптимизации достигают при использовании наилучшей доступной технологии и при установлении рабочих параметров в пределах практических ограничений с целью сделать максимальным выход за единицу времени без значительного ухудшения разрешения. Если это возможно, то следует провести пробные опыты на хорошо охарактеризованных образцах, чтобы выбрать и оптимизировать условия разделения. Ниже суммировано влияние условий разделения на эффективность колонки (число тарелок и разрешение) и даны рекомендации по оптимизации препаративных СХ-разделений.

1. N и R увеличиваются с уменьшением скорости потока.
2. N и R увеличиваются с уменьшением размера частиц насадки.
3. N и R увеличиваются с уменьшением вводимого объема пробы.
4. N и R увеличиваются с уменьшением массы (концентрации) вводимого образца.
5. N и R улучшаются с увеличением диаметра колонки.
6. N увеличивается линейно с увеличением длины колонки.
7. Разрешение R низкомолекулярных соединений менее чувствительно, чем R высокомолекулярных полимеров, к увеличению скорости потока.
8. Повышение производительности лучше всего достигается путем одновременного увеличения диаметра колонки и скорости потока.

9. Эффективность фракционирования полимеров (M_w/M_n на фракцию) улучшается с увеличением объема вводимой пробы при постоянной массе образца.

10. Максимальная эффективность ($N \times$ число граммов, разделенных в 1 мин) достигается при увеличении скорости потока и увеличенной нагрузке.

11. Объем элюирования растворенного вещества V_e зависит от величины вводимого образца и его объема и увеличивается с их увеличением.

12. Объем элюирования фракции полимера, имеющей данную M_w , уменьшается с увеличением скорости потока. Величина этого эффекта, вероятно, также зависит от M , ММР, концентрации образца и величины вводимого объема.

13. Эффекты перегрузки уменьшаются, и выход образца может быть увеличен, если насадка в колонке расположена слоями с уменьшением размера пор в направлении потока.

14. Работа препаративной СХ-системы может быть подвергнута риску, если противодавление в колонке становится слишком большим. Высокое противодавление вызывает напряжение оборудования и может привести к спрессовыванию или дроблению некоторых материалов насадки. Противодавление увеличивается с увеличением скорости потока, длины колонки, вязкости подвижной фазы, с уменьшением внутреннего диаметра колонки, размера частиц насадки, пористости фильтра (фритты) и внутреннего диаметра соединений и трубопроводов.

15. Полидисперсность фракций полимеров уменьшается с уменьшением объема фракции.

16. Повторное фракционирование, циркуляция и последовательный ввод проб при V_0 увеличивает выход образца и уменьшает стоимость разделения.

Для того чтобы оптимизировать многоцикловые препаративные СХ-разделения, предложены следующие рекомендации.

1. Подбирайте размер колонки, материал насадки и другие требуемые компоненты системы (подвижную фазу, насосную систему, детектор и т. д.) в соответствии с разд. 8.3.

2. Оцените скорость потока [уравнение (8.1)] на основе оптимальной скорости потока для выбранного материала насадки на основе аналитических применений СХ.

3. Используя скорость потока, полученную согласно п. 2, низкий объем пробы и низкую концентрацию образца, проведите фракционирование стандарта с низкой M ; если необходимо фракционировать полимер, проведите разделение смеси полимерных стандартов с узким ММР.

4. Рассчитайте N и $R_{1,2}$ по стандартным аналитическим выражениям [например, уравнение (8.2)].

5. Оцените «идеальный» объем пробы как $1/3$ от общего объема, отсекаемого на нулевой линии пика низкомолекулярного стандарта.

6. Оцените максимальный размер образца для ввода пробы как 0,001 от общей массы сухой насадки в колонке и рассчитайте концентрацию раствора образца путем деления массы максимального образца на идеальный объем пробы. Для высокомолекулярных полимеров рекомендуются более низкие концентрации раствора.

7. Используя параметры, полученные в п. п. 2, 5 и 6, вновь определите N и $R_{1,2}$.

8. Удвойте объемную скорость потока или, если система имеет ограничения по конструкции насоса или высокое противодавление, используйте наивысшую доступную скорость потока и вновь определите N и $R_{1,2}$. Продолжайте увеличивать скорость потока с целью уменьшения времени разделения без потери необходимого разрешения.

9. Удвойте вводимый объем, не увеличивая массы вводимого образца. Оцените N и $R_{1,2}$. Увеличивайте вводимый объем до тех пор, пока не будет дальнейшего улучшения N или $R_{1,2}$.

10. Увеличивайте как скорость потока, так и концентрацию образца с целью получения максимального выхода образца без потери разрешения или ухудшения работы системы ниже предела, требуемого для адекватного разделения.

11. Выберите объем фракции, соответствующий типам выполняемого разделения и требованиям чистоты (полидисперсности). Для фракционирования полимеров объем фракции обычно равен удвоенному объему вводимой пробы.

12. Вводите образцы последовательно при объемах элюирования, близких V_0 . Рассмотрите также возможность автоматизации и использования повторного фракционирования или циркуляции для получения максимального выхода образца, улучшения разрешения и уменьшения стоимости разделения.

8.5. Применение

Препаративную СХ используют для широкого ряда материалов. Во многих лабораториях препаративно-аналитическую и полупрепаративную методику СХ применяют рутинно для выделения компонентов образца в количествах и с чистотой, достаточных для обеспечения их характеристики с помощью спектроскопических или других аналитических методов. Стандартно-препаративная и крупномасштабная препаративная СХ применяются реже. Некоторые современные примеры применения препаративной СХ обсуждаются в этом разделе. Дополнительные примеры приведены в табл. 8.4.

Таблица 8.4. Препаративные применения ситовой хроматографии

Система	Литература
Полистирол	6, 8, 10, 14, 21, 22, 26, 27, 32, 34
Полиэтилен	9, 35—38
Полипропилен	16, 38
Поливинилхлорид	8, 17, 39
Поливинилацетат	40—42
Олигомеры поливинилацетата	20, 48, 49
Поливиниловый спирт	43
Поливинилпирролидон	47
Полиметилметакрилат	28, 44
Полибутадиен	8, 45
Олигомеры полибутадиена с концевыми карбоксильными группами	7, 49
Полидиметилсилоксан	18
Полиуретан	46
Политетраметилэтиленгликоль	50
Олигомеры полипропилентерефталата	51
Олигомеры полиаценафтена	52
Сополимер стирола с винилстеаратом	15
Сополимер винилхлорида с винилацетатом	53, 54
Сополимер акрилонитрила с изобутиленом	29, 30
Сополимер стирола с акрилонитрилом	29, 30
Сополимер акрилонитрила с виниловым эфиром	55
Сополимер метилметакрилата со стиролом	56—59
Ацетат целлюлозы	60
Лигнин	61
Углеводы	62
Декстраны	47
Белки, биополимеры	11, 12, 63—70
РНАзы	71
Жиры/пестициды	72
Эпоксисмолы	31, 73, 74
Экстракты полимеров и соответствующие низкомолекулярные соединения	19, 75—77
Гуминовые вещества	78
Смазки	79
Асфальтены	33, 80—82
Битумы	83
Экстракты из углей	84—88

Промежуточные продукты синтеза эпоксисмол были выделены с помощью стандартно-препаративной СХ [31]. Для использования в качестве стандартов и реактивов при исследовании кинетики полимеризации смол требовались значительные количества (0,5—3 г) промежуточных продуктов. Для препаративной СХ был модифицирован прибор Prep LC/System 500 (фирмы

Waters) с заменой фирменного дозатора краном-дозатором с пеглей объемом 12 мл. Образцы разделяли на двух колонках $122 \times 5,1$ см (внутр. диам.), заполненных стирагелем 80—100 Å и 700—2000 Å при следующих условиях: концентрация образца — 200 мг/мл, подвижная фаза — ТГФ (для УФ-спектроскопии), скорость потока — 40 мл/мин, температура — окружающая, детектор — дифференциальный рефрактометр, время разделения — 94 мин. Образцы были приготовлены путем частичной полимеризации смеси очищенных мономерных компонентов эпоксиол: *N,N'*-тетраглицидилметиленадианилина (ТГМДА) и 4,4'-диаминодифенилсульфона (ДДС). Реакции заканчивали при низких степенях конверсии с тем, чтобы избежать образования высокомолекулярных цепей или поперечно-сшитых продуктов. Образцы растворяли в ТГФ и вводили в хроматограф последовательно с интервалом 60 мин. Как видно из рис. 8.6, высокочистые (97%) продукты 1-1 и 2-1 получили, собирая фракции вблизи центров соответствующих пиков. Оставшиеся фракции были отброшены.

С помощью системы Prep LC/System 500 было также проведено разделение фракций полистиролов, содержащих диазо-группы, привитые в центре и по концам [32]. Условия разделения были аналогичны описанным в [31], за исключением концентрации образца (100 мг/мл) и набора колонок (две колонки $122 \times 5,1$ см, заполненные стирагелем $5 \cdot 10^3$ — $1,5 \cdot 10^4$ Å и $5 \cdot 10^4$ — $1,5 \cdot 10^5$ Å). Образцы вводили последовательно с интервалом 50 мин и собирали фракции F×1 и F×3 на фронте и хвосте пиков соответственно, а центральную фракцию 2 отбрасывали (рис. 8.7). Фракционирование давало 0,3 г фракции 1 и 0,2 г фракции 3 за один ввод. Обе фракции имели достаточно узкое ММР: $M_w = 83\,000$ г/моль с $M_w/M_n = 1,05$ для фракции 1 и $M_w = 41\,000$ г/моль с $M_w/M_n = 1,04$ для фракции 3.

Като и сотр. [6] фракционировали полистирольный стандарт с широким ММР (NBS 706) с целью продемонстрировать преимущества колонок, заполненных маленькими частицами гелей, для получения фракций полимеров с узким ММР. Они использовали препаративный хроматограф HLC-807 (фирмы Toyo Soda), оснащенный восемью колонками, заполненными TSK-гелем типа G. Каждая колонка имела размер $61,4 \text{ см} \times 2,12 \text{ см}$ (внутр. диам.) и была заполнена частицами стиролдивинилбензольного геля размером 10 мкм (см. табл. 8.1). В качестве подвижной фазы для обеспечения ввода больших количеств образца без потери разрешения был использован тета-растворитель для полистирола. Образцы вводили последовательно с интервалом 90 мин и фракционировали при указанных ниже условиях: концентрация образца — 6,5 мг/мл, объем пробы — 20 мл, подвижная фаза — смесь МЭК с этанолом (88,3 : 11,3), скорость пото-

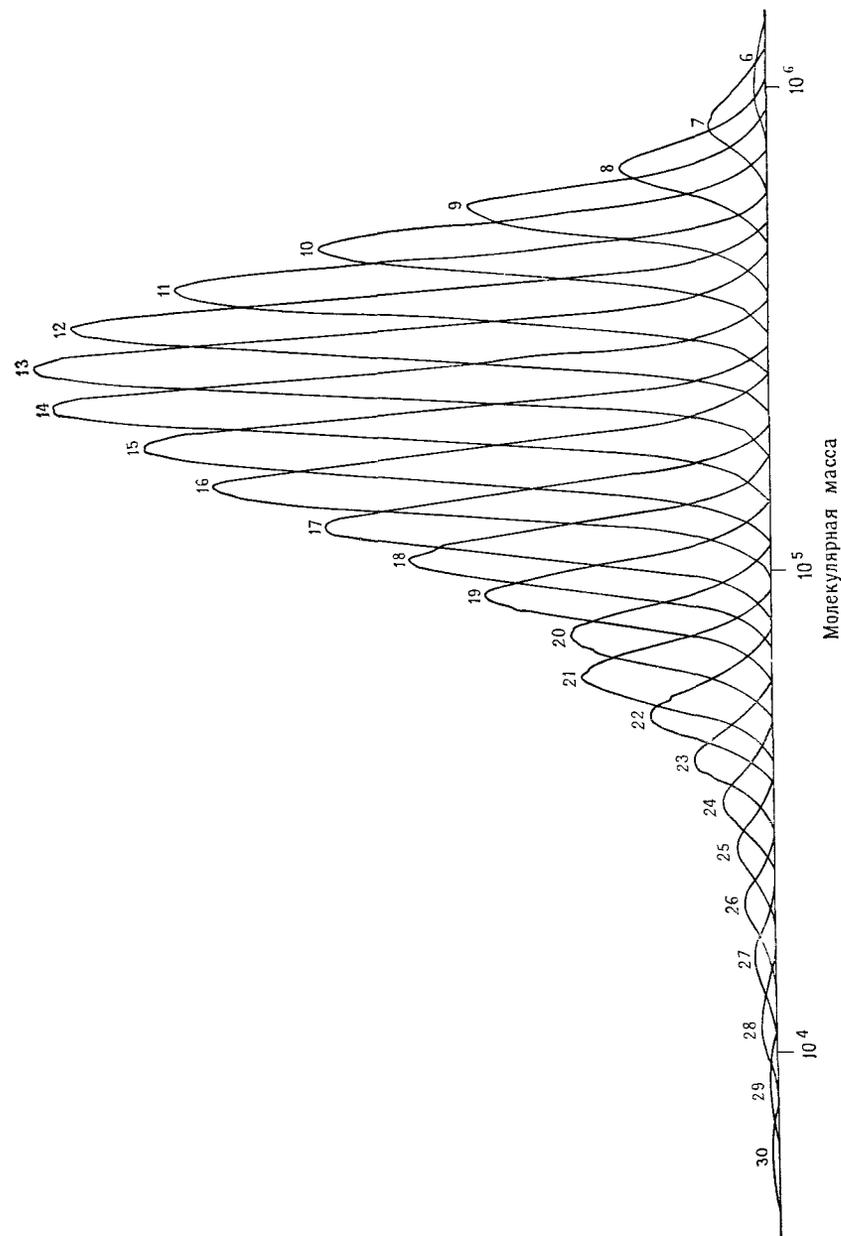


Рис. 8.8. Кривые молекулярно-массового распределения фракций, полученных при СХ-фракционировании полистирола NBS-706 [6].

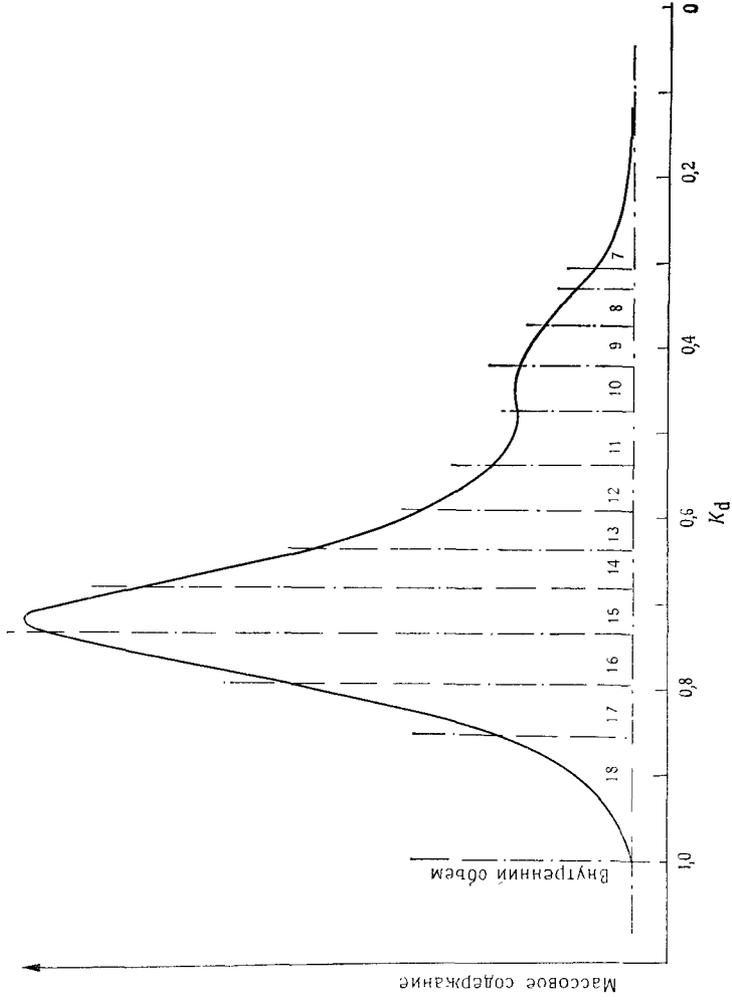


Рис. 8.9. Препаративная СХ асфальта с положенными указанными фракций [33].

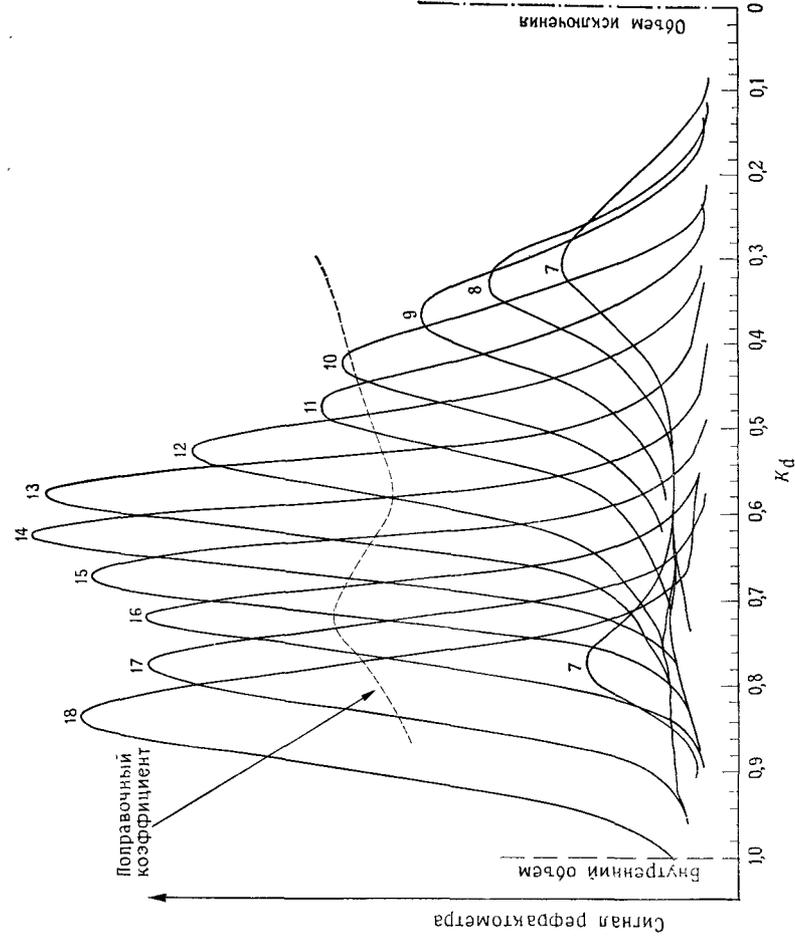


Рис. 8.10. Характеризация фракций препаративного СХ фракционирования с помощью аналитической СХ (РФ-детектор) [33].

ка — 8,5 мл/мин, температура 25 °С, объем фракции — 21,25 мл, время одного разделения — примерно 170 мин. Фракции собирали вручную в период элюирования между 90 и 170 мин. Среднечисловая и среднемассовая молекулярная масса полистирольного стандарта составляла: $M_n = 1,36 \cdot 10^5$ и $M_w = 2,72 \cdot 10^5$ г/моль. Молекулярные массы полимерных фракций находились в интервале $1,11 \cdot 10^6$ — $6,1 \cdot 10^3$ г/моль с полидисперсностью, возрастающей с увеличением M (рис 88) от $M_w/M_n = 1,017$ до 1,035.

Сач и сотр [33] с помощью препаративной СХ выделил фракции асфальтов с узким ММР на хроматографе (Chromatorger-101 фирмы Waters с двумя колонками размером 120×5 см (внутр диам), заполненными стирогелем 10^3 — 10^4 Å. Работали они при указанных ниже условиях: концентрация образца — 10 масс %, объем пробы — 80 мл, подвижная фаза — перегнаный хлороформ, скорость потока — 20 мл/мин, объем фракции — 125 мл. Фракции характеризовали с помощью аналитической СХ, высокоэффективной жидкостной хроматографии и осмометрии паровой фазы. Положение и распределение фракций, определенных с помощью аналитической СХ, приведены на рис 89 и 810. Абсциссы нанесены в значениях коэффициентов распределения $K_d = (V_e - V_0)/(V_m - V_0)$. Фракции 10—18 имели узкое распределение и M_n -значения по данным осмометрии менялись примерно от 600 до 10 000 г/моль. Высокомолекулярные фракции 7, 8 и 9 имели биомодальное распределение, приписываемое ассоциации, которая имеет место благодаря высокой концентрации образца, используемой при введении пробы в препаративной СХ. Полученные результаты показывают, что высокомолекулярные компоненты асфальтов проявляют сильные межмолекулярные взаимодействия в относительно разбавленных растворах.

Литература

- 1 Cooper A R, Hughes A J, Johnson J F, *Chromatographia* 8 (1975) 136—142
- 2 Yau W W, Kirkland J J, Bly D D, *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography*, Wiley Interscience, John Wiley and Sons, New York, 1979
- 3 Hagnauer G L, *Anal Chem*, 54 (1982) 265R—276R
- 4 Bombaugh K J, Dark W A, King R N, *J Polym Sci, Part C*, 21 (1968) 131—142
- 5 Bombaugh K J, *J Chromatogr*, 53 (1970) 27
- 6 Kato Y, Kametani T, Furukawa K, Hashimoto T, *J Polym Sci Phys*, 13 (1975) 1695—1703
- 7 Law R D, *J Polym Sci, Chem* 7 (1969) 2097—2116
- 8 Peyrouset A, Panaris R, *J Appl Polym Sci*, 16 (1972) 315—328
- 9 Peyrouset A, Prechner R, Panaris R, Benoit H, *J Appl Polym Sci*, 19 (1975) 1363—1371
- 10 Montague P G, Peaker F W, *J Polym Sci, Part C*, 43 (1973) 277—289
- 11 Curling J, *Am Lab*, May 1976, 47—58

- 12 Strobel G J, *Chem Tech (Heidelberg)*, 11 (1982) 1354—1357
- 13 Sugnaux F R, Djerassi C, *J Chromatogr*, 248 (1982) 373—389
- 14 Cooper A R, Hughes A J, Johnson J F, *J Appl Polym Sci*, 19 (1975) 435—450
- 15 Mirabella F M, Barrall E M, *J Appl Polym Sci*, 20 (1976) 959—965
- 16 Vaughan M F, Francis M A, *J Appl Polym Sci*, 21 (1977) 2409—2418
- 17 Hattori S, Hideyo E, Nakahara H, Kamata T, Hamashima M, *Polym J*, 10 (1978) 173—180
- 18 Dodgson K, Sympton D, Semlyen J A, *Polymer*, 19 (1978) 1285—1289
- 19 Lesec J, Quworon C, *J Liq Chromatogr*, 2 (1979) 467—484
- 20 Morishima Y, Fujisawa K, Nozakura S, *Polym J*, 10 (1978) 281—285
- 21 Wang P J, Ph D Dissertation (Univ Connecticut, Storrs CT USA), 140 pp, 1979
- 22 Dark W A, Levangle R F, Bombaugh K J, 5th International Seminar Gel Permeation Chromatography, London, 1968
- 23 Kir'land J J, *J Chromatogr*, 125 (1976) 231
- 24 Jarca J, *J Liq Chromatogr*, 4 (1981) 181—196
- 25 Kirkland J J, Antle P E, *J Chromatogr Sci*, 15 (1977) 137—147
- 26 Hattori S, Hamashima M, *Kobunshi Kagaku (Chem High Polymers)*, 27 (1970) 775
- 27 Kato Y, Sakane K, Furukawa K, Hashimoto T, *Kobunshi Kagaku (Chem High Polymers)*, 30 (1973) 558
- 28 Hattori S, Hamashima M, Nakahara J, Kamata T, *Kobunshi Kagaku (Chem High Polymers)*, 34 (1977) 503
- 29 Albrecht W, Gloeckner G, *Acta Polym*, 31 (1980) 149—154
- 30 Albrecht W, Gloeckner G, *Acta Polym*, 31 (1980) 155—161
- 31 Hagnauer G L, Pearce P I, in T. Provder (Ed), *Adv Chem Ser (Recent Advances in Size Exclusion Chromatography)*, Am Chem Soc, Washington, DC, 1984
- 32 Hagnauer G L, Sung C S, P. personal communication (1983)
- 33 Such C, Brule B, Baluja-Santos C, *J Liq Chromatogr*, 2 (1979) 437—453
- 34 Vaughan M F, in J H Spencer and R Dietz (Eds), *Ind Polymers, Characterization by Molecular Weight*, Transcripts Books, London, pp 111—117, 1973
- 35 Barlow A, Wild L, Roberts T, *J Chromatogr*, 55 (1971) 155—164
- 36 Drott E E, Mendelson R A, *Am Chem Soc, Polym Prepts*, 12 (1971) 277—281
- 37 Gianotti G, Cicuta A, Romanini D, *Polymer*, 21 (1980) 1087—1091
- 38 Ogawaad T, Inaba T, *J Appl Polym Sci*, 22 (1978) 2621—2631
- 39 Jisova V, Janca J, Kolinsky M, *J Polym Sci, Chem* 15 (1977) 533—536
- 40 Atkinson C M L, Dietz R, *Eur Polym J*, 15 (1979) 21—26
- 41 Dietz R, Francis M A, *Polymer*, 20 (1979) 450—451
- 42 Cane P, Capaccioli T, *Eur Polym J*, 14 (1978) 185—188
- 43 Atkinson C M L, Dietz R, Francis M A, *Polymer*, 21 (1980) 891—894
- 44 Provder T, Woodbrey J C, Clark J H, Drott E E, in M Eyrin (Ed), *Adv Chem Ser*, 125 (Polymer Molecular Weight Methods), Am Chem Soc, Washington, DC, pp 117—137, 1973
- 45 Mirabella F M, Barrall E M, Johnson J F, *J Appl Polym Sci*, 20 (1976) 765—771
- 46 Baker G K, *J Chromatogr*, 55 (1971) 173
- 47 Langhammer G, Seide H, *Plaste Kaut*, 17 (1970) 486—488
- 48 Heitz W, Ullmer H, *Makromol Chem*, 120 (1968) 58—67

- 49 Perrault G, Trembley M, Lavertu R, Tremblay R, *J Chromatogr*, **55** (1971) 121—136
- 50 Kato Y, Sakane K, Furukawa K, Hashimoto T, *Kobunshu Kagaku (Polym Sci Technol, Eng Ed)* **2** (1973) 815
- 51 Birley A W, Dawkins J V, Kyriacos D, *Polymer*, **21** (1980) 632—638
- 52 Springer J, Schmelzer J, Zeplichal T, *Chromatographia*, **13** (1980) 164—166
- 53 Janca J, Mrkvickova L, Kolinsky M, Brar A S, *J Appl Polym Sci*, **22** (1978) 2661—2668
- 54 Janca J, Kolinsky M, *J Appl Polym Sci*, **21** (1977) 83—90
- 55 Kenyon A S, Mottus E H, *Appl Polym Symp (J Polym Sci)*, **25** (1973) 57—67
- 56 Norris J F, Peaker F W, in J H Spencera and R Dietz (Eds), *Ind Polymers Characterization by Molecular Weight*, Transcripta Books, London, pp 118—127, 1973
- 57 Norris J F, Peaker F W, *Int J Appl Radiat Isotop*, **25** (1976) 143—144
- 58 Lovric L, Gallot Grubisic Z, Kunst B, *Eur Polym J*, **12** (1976) 189—193
- 59 Nunes R W, Haung S J, Johnson J F, *Polym Eng Sci*, **23** (1983) 1—5
- 60 Buleon A, Chanzy H, Froment P, *J Polym Sci Phys*, **20** (1982) 1081—1088
- 61 Kirk T K, Brown W, Cowling E B, *Biopolymers*, **7** (1969) 135—153
- 62 Wingard R E, Ng S, Dale J A, Wang P C, *J Liq Chromatogr* **1** (1978), 775—782
- 63 Lusk L T, Cronan C L, Chicoye E, Goldstein H, *J Am Soc Brew Chem*, **41** (1983) 31—36
- 64 Roumeliotis P, Unger K K, *J Chromatogr*, **185** (1979) 445—452
- 65 Von Bahr-Lundstroem H, Carlquist M, Mutz V, Joernvall H, in M Elzinga (Ed), *Methods Protein Sequence Anal (Proc 4th Int Conf, 1981)* Humana, Clifton NJ USA, 1982, pp 455—462
- 66 Wehr C T, Cunico R L, Ott G S, Shore V G, *Anal Biochem*, **125** (1982) 386—394
- 67 Galpin I J, Handa B K, Kenner G W, Moore S, Ramage R, in R Epton (Ed), *Chromatogr Synth Biol Polym (Lect Chem Soc Int Symp)*, Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, 1978, pp 331—338
- 68 Himmel M E, Squire P G, *J Chromatogr*, **210** (1981) 443—452
- 69 Hubbell C J, Stoops J K, *Arch Biochem Biophys*, **209** (1981) 81—84
- 70 Miyatake R, Kumanotani J, *Makromol Chem*, **177** (1976) 2749—2757
- 71 Graeve L, Goemann W, Foeldi P, Kruppa J, *Biochem Biophys Res Commun* **107** (1982) 1559—1565
- 72 Stalling P L, Tindle R C, Johnson J L, *J Assoc Off Anal Chem*, **55** (1972) 32
- 73 Hinton J G, *Br Polym J*, **15** (1983) 47—49
- 74 Кузаев А И —Высокомолекулярные соединения, 1980, т 22, с 2082—2087
- 75 Shoemaker R A, in T K Wu and J Mitchell (Eds) *Appl Polym Symp (J Polym Sci)*, **34** (1978) 139—143
- 76 Mulder J L, Buytenhuya F A, *J Chromatogr*, **51** (1970) 459—477
- 77 Moble A C, *J Agr Food Chem* **24** (1976) 321
- 78 Thurman E M, Malcolm R L, *Environ Sci Technol*, **15** (1981) 463—466
- 79 Ali A, Lockwood F, Klaus E E, Duda J L, Tewksbury F J, *ASLE Trans*, **22** (1979) 267—276
- 80 Kiet H H, Blanchard L P, Malhotra S L, *Sep Sci*, **12** (1977) 607
- 81 Brulc B, in J Cazes and X Delamare (Eds) *Chromatogr Sci Ser*, **13** (Lq Chromatogr Polym Relat Mater 2), 1980, 215—248

- 82 Guberto R G, Cronauer D C, Galya L G, *Fuel Process Technol*, **5** (1981) 103—118
- 83 Furimsky E, Champagne P J, *Fuel Process Technol* **6** (1982) 269—275
- 84 Wooton D L, Coleman W M, Taylor L T, Dorn H C, *Fuel*, **57** (1978) 17—21
- 85 Yokoyama S, Ounishu N, Itoh H, Takeya G, *J Fuel Soc Japan*, **53** (1974) 1033—1043
- 86 Nosyrev I E, Kuzaev A I, Kochkanyan R O, Baranov S N, *Solid Fuel Chem*, **15** (1981) 61—66
- 87 Schanne L, Haenel M W, *Fuel*, **60** (1981) 556—558
- 88 Jones A R, Guerin M R, Clark B R, *Anal Chem* **49** (1977) 1766—1771

Автоматизация 120, 197
 Адсорбент 28, 29, 76
 — стандартизация 28
 Анализ 5, 7
 — хроматографический 67
 Аппаратура 15, 67, 182, 187, 199

Безопасность 14, 104, 338

Ввод

— быстрый 170
 — питания 170
 — пробы 55

Время

— анализа 69
 — удерживания 31, 39, 44

Выделение вещества 10, 325

Выход препаративного разделения 39, 41, 45, 48, 51, 56, 338

Градиент

— использование в препаративной хроматографии 69, 100
 — непрерывный 67, 69
 — ступени 101
 — ступенчатый 67, 69

Градиентное элюирование 67, 100, 197, 247—249

— и циркуляция 197

Группы

— силанольные 29—30
 — силоксановые 29—30

Детектирование 12

— зон в ТСХ 139, 140
 — — парами под 140
 — — спедифическими реагентами 140
 — — флуоресценнбромидом 140
 РФ-детектором 55, 312, 324
 УФ-детектором 51, 324
 Детектор 12, 13, 50, 61
 — выбор 99, 117—119, 323
 — требования 117—119, 323

Емкость 47

— для растворителя 47, 96
 — по образцу 21, 31, 49, 60
 — системы 14

Загрязнения

— неподвижной фазы 75, 79
 — образца 75

Изотерма 27, 28, 49

Коэффициент

— емкости 20, 21, 25, 30
 — разделения 19—20, 24—25, 28, 34, 41, 60, 65
 — распределения 25, 41, 49, 69
 — — массового 20

Картриджи 108, 110, 194

Количество 15

Колонка 40, 51, 55

— большого диаметра 46, 69, 110

— геометрия 58

— для препаративной хр. 106
 — метод заполнения 32, 111
 — — аксиального сжатия 112, 189—190
 — — радиального сжатия 112
 — — суспензионный 111
 — — сухой 111—112
 — конструкция 32, 106, 320
 — — распределителя 55, 108, 202
 — нагрузка 27—28, 33
 — перегрузка 27—28
 — уравнивание 97—99
 — эффективность 25

Масштабирование 5, 56, 61, 67, 69, 73—74

Метод разделения 9

Нагрузка 28, 31, 34, 37—38, 40—41, 44—45, 49—50, 55, 60, 61
 — в препаративной ТСХ 131
 — в циркуляционном методе 42—48
 — и время удерживания 39—40
 — и форма пика 49—56
 — и эффективность 36
 — на колонку 12, 23, 27—33, 330

Насадка 28, 56, 70, 72, 311, 320

— выбор 74

— модифицирование поверхности 57, 74

— предыстория 57, 62, 77

— размер и объем пор 29, 63, 81—84

— размер частиц 32, 39, 57, 61, 79, 114

— структура 110—111

— удельная площадь поверхности 63, 81—83

— физические свойства 79

— химические свойства 56, 71

Насос 113, 114

— возвратно-поступательный 327

Оборудование 69

— крупномасштабное 15

Образец 31, 64, 69

— в ПТСХ 134—137

— деструкция 12

— емкость ПТСХ-пластин 135

— загрязнение 75, 77

— извлечение 63, 119

— — слоя 141—144

— количество 15, 49

— концентрация 13, 15, 49, 58, 334—335

— объем 333—334

— очистка 10

— подготовка 317

— природа 13

— размер 28, 29, 32

— растворение 101—104, 317

— сбор 119

— свойства 13

— сложность 13

— стандартный 13

— устойчивость 75

— фазовый состав 13

Объем элюирования 23

Оптимизация 18, 40, 53, 56

Перегрузка 27, 28

— массовая 38

— объемная 38, 89, 335

Пик 29, 219

— высота 50

— зависимость формы от нагрузки 49—50

— искажение формы 53—56

— неудерживаемого вещества 22

— площадь 50

— разрешение 22, 55

— ширина 22

Препаративная ЖХ 28, 32, 41

— — аналитического масштаба 182

— — в биохимии 227

— — — — аминокислот

— — — — белков 247—254

— — — — других классов соединений 254—255

- — — — пептидов 228—247
- — в органической химии 10
- — в фармацевтической промышленности 177—180
- — крупномасштабная 40, 56
- — лабораторного масштаба 187
- — оптимизация 19
- — — стандартно-препаративная 309
- — — полупрепаративная 309
- — — препаративно-аналитическая 309
- — промышленного масштаба 199
- — энантиомеров 258
- Примеси 15
- обогащение 89
- Производительность препаративного разделения 5, 338
- Процесс
- «Молекс»
- «Олекс»
- разделения 56
- «Сарекс» 164
- хроматографический 20, 29, 31
- Проявление в ПТСХ 137
- методом восходящего потока 137
- многократное 138

- Разделение** 12, 13, 15, 45—46, 54, 60, 69
- аналитическое 10, 42, 68
- безопасность 14, 104
- время 16, 41, 48, 338
- зависимость от нагрузки 34, 41
- коэффициент 19, 25
- крупномасштабное 13, 15—16, 18, 56, 69, 74, 155, 172, 310
- масштабирование 5, 56, 59—70
- — на основе аналитической ЖХ 59—63
- — на основе ТСХ 63—67, 149—152
- маломасштабное 15
- механизм 54, 71—74
- многоцикловое 15
- планирование 10—16
- препаративное 10, 18—19, 42, 51, 56, 69
- — неправильные представления 11
- — оптимизация условий 16—18, 41, 55, 70, 329, 337—340
- — сравнение с аналитическим 12, 19
- — степень 12, 60
- — стоимость 16, 18, 70, 94
- — целесообразность 14
- — цель 10, 14, 16, 70
- — частота 14
- трудности 44, 70
- Разделяющая способность 18
- Разрешение 22, 25, 34, 41, 61, 70, 335, 338
- Распределение
- гауссово 21, 23
- между фазами 73
- Растворитель 18, 46, 54, 55, 69, 95, 97, 101—102
- Расход 25

- Сбор фракций 26, 325
- Селективность 18, 44, 70, 77
- Силикагель 29—31, 54, 60—61, 63, 72, 74, 76
- Система
- автоматизированная 197
- аналитическая 18
- подачи растворителя 319
- противоточная 159
- с псевдодвижущимся слоем (ПДС) 163
- — комбинация с элютивной 169
- — сравнение с элютивной 167—168
- разделения 197
- — оптимизация 40, 55
- Скорость потока 5, 41, 50, 331
- линейная 62
- объемная 62
- Слон
- для аналитической ТСХ 132
- для ПТСХ 132

- закрепленные 140
- незакрепленные 140
- приготовление 132—133
- Смесь 5
- Степень извлечения 15
- Стоимость 14, 75
- рабочей силы 41
- разделения 14, 48
- растворителя 41

- Теоретические тарелки** 22—23, 28, 33
- высота 32, 36
- зависимость от различных факторов 24
- число 19, 23, 32, 334
- эффективное число 25, 38

- Установка**
- для препаративной СХ 321
- для циркуляционной ЖХ 199—200

- Фаза**
- неподвижная 19—20, 25, 28, 53—54, 70, 74—79. См. Насадка
- — хиральная 265—270
- подвижная 19—20, 25, 28, 53, 55, 60, 69, 75—79, 85, 314
- — для ПТСХ 138
- — емкость 113, 318
- — изоэлюотропная 90
- — обезгаживание 97
- — очистка 93—96, 226
- — поток ламинарный 114
- — — турбулентный 114
- — приготовление 96
- — различие в селективности 90
- — регенерация 201, 225
- — свойства 85—88
- — чистота 93
- — скорость 41
- Фракция 26, 51, 56, 62—63
- Фронтальное вытеснение 52—53

- Хроматографическая тарелка** 32
- Хроматография 5
- адсорбционная 28—29, 34, 41, 50, 71, 73, 92, 180
- аналитическая 10, 19, 26, 50, 56, 60, 64—65, 67—68
- аффинная 69, 71
- высокого давления 7
- высокоэффективная 5
- гель-проникающая. См. ситовая
- жидкостная 7, 9, 18
- — аналитическая 10, 12, 68
- — макропрепаративная 13, 15, 67
- — микропрепаративная 13, 15, 67, 69
- ионообменная 69, 71, 182
- лигандообменная 293
- на привитых фазах 47, 54, 181
- нормально-фазная 54, 73, 181
- обращенно-фазная 51, 73—74, 92, 181
- препаративная 10, 13, 22, 67
- система для 104
- распределительная 73, 92
- ситовая 69, 71, 84, 182
- — обращенная 85
- тонкослойная 18, 28, 63—67
- — аналитическая 26, 65, 131
- — многомерная 131
- — препаративная 22, 131
- — — применение 144—149
- циркуляционная 42, 50

- Циркуляция** 48—49, 115, 196, 214—221, 223—224, 332
- и нагрузка 42—48
- методы 326—328
- с отбором пика 46—47, 50, 53, 55, 115—117, 196

- Чистота** 14, 51
- степень 13, 15, 26—27, 52, 63

- Элюент** 31. См. Фаза подвижная
- система подачи 112

Элюирующая сила 69, 87—91	— колонки 33, 36—37, 55, 89, 330, 337
Элюотропные ряды по Нееру 91	— — разделительная 36, 38, 89
Эффективность 5, 23, 34, 36, 38, 41, 47, 338	— — — в СХ 330, 337
— и нагрузка 36	— — собственная 36—39, 55

Оглавление

От переводчика	5
Предисловие	7
1. Принципы препаративной жидкостной хроматографии.	
<i>П. Макдональд, Б. Бидлингмейер</i>	9
1.1. Введение	9
1.2. Планирование разделения	10
1.2.1. Постановка проблемы	10
1.2.1.1. Препаративное или аналитическое разделение?	10
1.2.1.2. Природа образца	13
1.2.1.3. Практические соображения	14
1.2.2. Выбор цели разделения	14
1.2.3. План препаративного ЖХ-разделения	16
1.3. Достижение разделения	19
1.3.1. Коэффициент разделения α	19
1.3.2. Число тарелок N	22
1.3.3. Зависимость разрешения от α и N	25
1.3.4. Степень разделения, необходимая в препаративной ЖХ	26
1.4. Нагрузка колонки	27
1.4.1. Нагрузка или перегрузка?	27
1.4.2. Качественная модель нагрузки колонки	29
1.4.3. Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой	34
1.4.3.1. Нагрузка и α	34
1.4.3.2. Нагрузка и эффективность	36
1.4.3.3. Нагрузка и время удерживания	39
1.4.3.4. Нагрузка в циркуляционном методе	42
1.4.4. Влияние нагрузки на форму пика	49
1.4.4.1. Изменение формы пика с увеличением нагрузки	49
1.4.4.2. Дополнительные причины искажения формы гауссова пика	53
1.5. Масштабирование разделения	56
1.5.1. Масштабирование на основе аналитической ЖХ	56
1.5.1.1. Общие соображения	56
1.5.1.2. Пример последовательного подхода к масштабированию	57
1.5.2. Масштабирование на основе данных ТСХ	63
1.5.3. Масштабирование разделения с градиентным элюированием	67
1.6. Выбор препаративной системы разделения с учетом материалов для насадки и элюентов	70
1.6.1. Неподвижная фаза	70
1.6.1.1. Химические свойства неподвижной фазы	71
1.6.1.2. Физические свойства	79
1.6.2. Подвижная фаза	85
1.6.2.1. Химические и физические свойства	85
1.6.2.2. Практические советы	93
1.6.2.3. Техника безопасности	104

17 Системы для препаративной ЖХ	104
171 Колонка для препаративной ЖХ	106
1711 Конструкция колонки	106
1712 Структура насадки	110
172 Система подачи элюента и введения образца	112
1721 Сопоставление турбулентного и ламинарного потоков	114
1722 Циркуляционные системы	115
173 Детектирование	117
174 Сбор образцов и их извлечение	119
175 Автоматизация	120
18 Заключение	120
Литература	122
2. Препаративная тонкослойная хроматография. Й. Шерма, Б. Фрайд	131
21 Введение	131
22 Слои для ПТСХ	132
23 Нанесение образца	134
24 Проявление	137
25 Детектирование зон	139
26 Удаление веществ из слоя	141
27 Применение ПТСХ	144
271 Жиры и липиды	144
272 Лекарства и фармацевтические препараты	147
273 Красители и пигменты	148
274 Разные соединения	149
28 Перенесение результатов ТСХ на препаративную жидкостную хроматографию	149
Литература	152
3. Увеличение эффективности в крупномасштабной хроматографии. Ф. Ванкат	155
31 Введение	155
32 Неэффективность препаративной элюентной хроматографии	156
33 Противоточные системы	159
34 Системы с псевдодвижущимися слоями	163
35 Гибридные методы. Комбинация системы с псевдодвижущимся слоем и элюентной хроматографии	169
36 Другие методы крупномасштабной хроматографии	172
37 Принятые обозначения	172
Литература	174
4. Препаративная жидкостная хроматография в фармацевтической промышленности. А. Верли	177
41 Введение	177
42 Главные области применения препаративной ЖХ в фармацевтической промышленности	177
421 Препаративная ЖХ в поиске новых лекарственных веществ	177
422 Препаративная ЖХ при биологических испытаниях	178
423 Препаративная ЖХ при исследовании стабильности лекарств	179
424 Препаративная жидкостная хроматография в производстве	179
43 Используемые хроматографические системы	180
431 Адсорбционная хроматография	180
432 Хроматография на привитых фазах	181
4321 Обращенно фазная хроматография	181
4322 Нормально фазная хроматография	181
433 Ионообменная хроматография	182

434 Ситовая хроматография и другие методы	182
44 Аппаратура и примеры	182
441 Препаративная ЖХ аналитического масштаба (миллиграммы)	182
4411 Приборы	82
4412 Примеры	183
442 Препаративная ЖХ лабораторного масштаба (граммы)	187
4421 Приборы	187
4422 Примеры	191
4423 Некоторые тенденции в препаративной ЖХ лабораторного масштаба	196
443 Препаративная ЖХ промышленного масштаба	193
4431 Аппаратура	199
4432 Примеры	201
45 Заключение	202
Литература	203
5. Препаративная жидкостная хроматография для химика-синтетика. Дж. Уайтселл	206
51 Введение	206
52 Моделирование на ЭВМ	210
53 Реальные системы	221
54 Практические вопросы	225
Литература	226
6. Применение препаративной жидкостной хроматографии в биохимии. У. Хэнкок, Р. Престидж	227
61 Введение	227
62 Общие требования к разделению аминокислот и полипептидов	228
621 Природа неподвижной фазы	228
622 Природа подвижной фазы	229
623 Природа органического модификатора	233
624 Некоторые комментарии о препаративном разделении	234
63 Препаративное разделение аминокислот и пептидов	234
64 Применение тонкослойной хроматографии в обращенной фазе для контроля препаративного разделения	245
65 Препаративное разделение белков	247
651 Разделение в обращенной фазе	247
652 Прочие способы разделения	23
66 Другие классы биохимических соединений	251
Литература	255
7. Прямое препаративное разделение энантиомеров жидкостной хроматографией на хиральных неподвижных фазах. У. Пиркл, Б. Хемпер	28
71 Введение	258
72 Хроматографические методы выделения энантиомеров	259
73 Хроматографические свойства хиральной неподвижной фазы (ХНФ)	262
74 ХНФ на основе природных материалов	265
741 Микрокристаллическая триацетилцеллюлоза	265
742 Картофельный крахмал	269
75 Синтетические ХНФ	270
751 Разработка рационально сконструированных ХНФ	270
752 Хиральные краун эфиры	271
753 Карбинольные ХНФ	274
754 Аминокислотные ДНБ	275
755 Хиральные винилполимеры	286

7.5.6. Полиамидные ХНФ	289
7.5.7. Циклодекстриновые полимеры	291
7.5.8. ХНФ 58	292
7.5.9. Лигандообменная хроматография	293
7.5.10. Прочие методы жидкостной хроматографии	297
7.6. Заключение	300
7.7. Дополнения	301
Литература	304
8. Препаративная ситовая хроматография. Г. Хегнауер	308
8.1. Введение	308
8.2. Оборудование, колонки и материалы для заполнения колонок	311
8.3. Общие требования и специальные методы	314
8.3.1. Подвижная фаза — элюент	314
8.3.2. Подготовка образца	317
8.3.3. Емкость для растворителя	318
8.3.4. Система подачи растворителя	319
8.3.5. Узел ввода пробы (дозатор)	319
8.3.6. Колонки и материалы для заполнения колонок	320
8.3.7. Детектирующая система	323
8.3.8. Сбор фракций и выделение веществ	325
8.3.9. Повторное разделение и методы циркуляции	326
8.3.10. Регулирование температуры	328
8.4. Оптимизация препаративного разделения	329
8.5. Применение	340
Литература	346
Предметный указатель	350

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».