

Стратегия препаративной ВЭЖХ-очистки

Авторы

Рон Гуилье (Ron Guilliet),
Сами Чанаа (Sami Chanaa)
и Лакшми Саббароо
(Lakshmi Subbarao)
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE

Введение

Препаративная жидкостная хроматография — это мощный метод выделения и очистки одного или нескольких целевых соединений из смеси. Препаративная жидкостная хроматография стала одним из основных методов очистки, применяемых в лабораториях по разработке новых лекарственных препаратов для разделения продуктов реакции, очистки природных соединений, выделения примесей и т. д. В большинстве случаев перед препаративной хроматографией выполняется аналитическое разделение, что позволяет подтвердить наличие целевого соединения в пробе. После разработки подходящей методики разделения она оптимизируется по чистоте, выходу и производительности и масштабируется до препаративных уровней.

В данном техническом документе компания Agilent описывает основные этапы масштабирования методики ВЭЖХ от аналитического разделения до препаративной очистки. Фундаментальные хроматографические и математические принципы, изложенные в данном документе, помогут вам предсказуемо и беспрепятственно перейти от аналитического разделения к полупрепаративной очистке.

Выбор подходящего режима разделения и неподвижной фазы

Первой задачей, стоящей перед хроматографистом, является выбор подходящего режима разделения (хроматографирования). Он зависит от химической и физической природы целевого соединения. В табл. 1 дано описание некоторых обычно используемых режимов хроматографического разделения.

Оптимизация разделения: подвижная фаза

При выборе подвижной фазы должны быть учтены следующие параметры:

- оптимизированная селективность разделения;
- чистота растворителя (малые концентрации нелетучих примесей могут увеличить уровень шума базовой линии);
- тип детектора (прозрачность в УФ, совместимость с МС);
- летучесть (для простоты выделения очищенной фракции);
- вязкость (высокая вязкость подвижной фазы требует повышенного давления);
- растворимость компонентов (растворимость образца в подвижной фазе);
- стоимость.

Табл. 1. Распространенные режимы хроматографирования

Обращенно-фазовый	Нормально-фазовый	Ионообменный	Вытесняющий	Хиральный
Большинство органических соединений	Липофильные соединения, такие как масла, жиры и липиды	Ионные соединения, такие как кислоты, основания, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты	Полимеры, в том числе белки и нуклеиновые кислоты	Энантиомеры
Водные растворы метанола или ацетонитрила с добавками	Органические растворители	Водные буферы, ионные растворы	Водные буферы, органические растворители	Водные или органические растворители

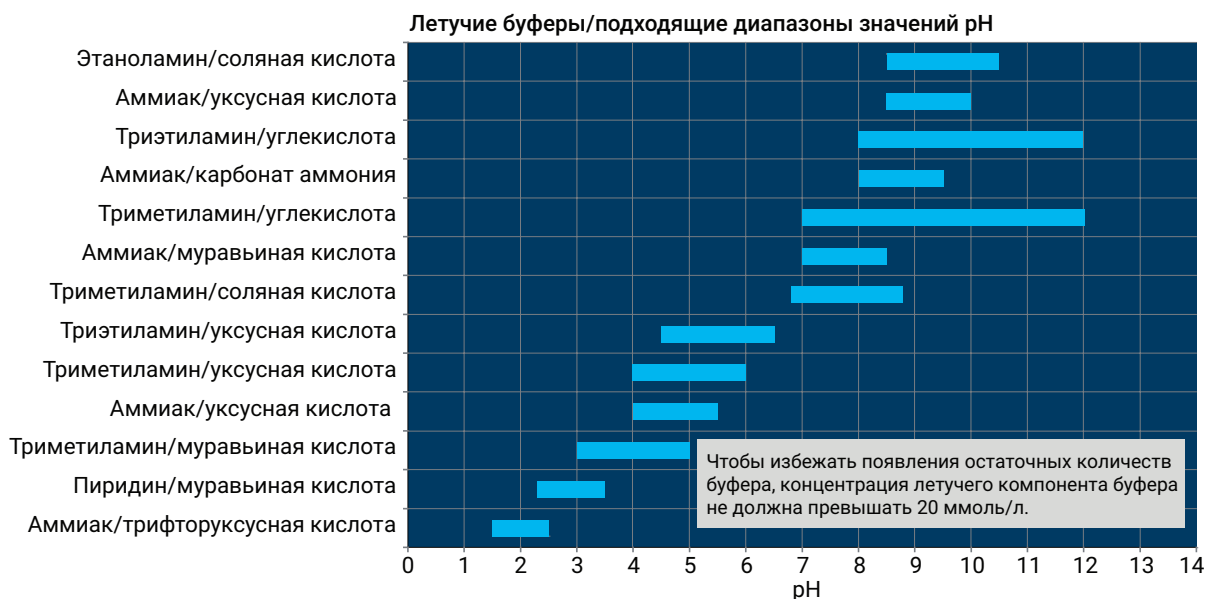


Рис. 1. Распространенные летучие буферы для ВЭЖХ

Оптимизация пропускной способности, количества образца и типа перегрузки

В препаративной ЖХ для увеличения пропускной способности колонку обычно подвергают перегрузке. Перегрузка вызывает изменение формы пиков: вместо гауссовой она становится более треугольной. Однако бессистемная перегрузка может привести к тому, что целевое вещество будет элюироваться совместно с примесями или выпадать в осадок. Для определения нужного количества пробы можно предварительно провести соответствующее исследование. Для экономии ценной пробы и сокращения расхода растворителя и объемов отходов это исследование можно выполнить на аналитической колонке.

Перегрузки можно добиться двумя путями.

- **Перегрузка по концентрации (по массе):** для определения максимальной концентрации пробы в колонку последовательно вводят пробы одинакового объема и увеличивающейся концентрации. Для разделения используется наивысшая концентрация, которая не вызывает расщепления пиков (что указывает на выпадение вещества в осадок) и совместного элюирования.
- **Перегрузка по объему:** для малорастворимых проб рекомендуется использовать перегрузку по объему. Последовательно вводят увеличивающиеся объемы пробы. Для разделения используется наибольший объем, который не вызывает совместного элюирования.

Возможно также использовать сочетание этих двух подходов. С практической точки зрения перегрузка по концентрации обычно предпочтительнее перегрузки по объему, так как для выделения целевого соединения требуется удалить меньший объем растворителя (испарением или сублимацией).

Результат данного исследования используется для определения возможной нагрузки при разделении в препаративных масштабах.

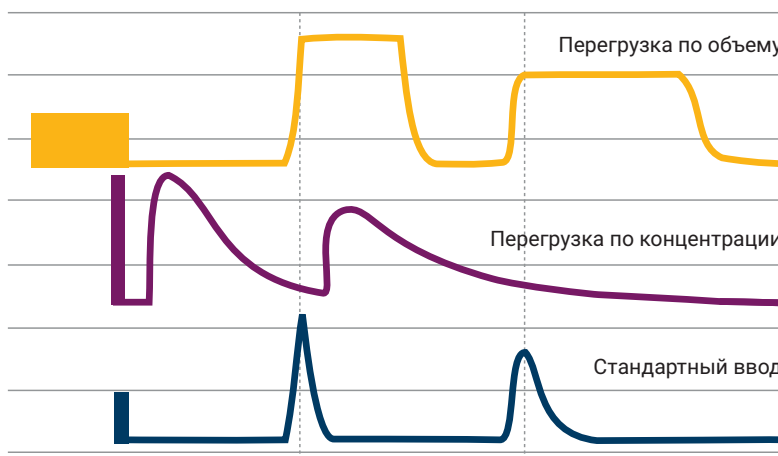


Рис. 2. Формы пиков при перегрузке по объему и концентрации

Масштабирование методики

Для оценки препаративной методики применяются три основных параметра: чистота, выход и пропускная способность. Так как эти параметры зависят друг от друга, препаративную методику невозможно оптимизировать одновременно по всем трем из них. Самый важный параметр для оптимизации зависит от области применения методики.

На рис. 3 хроматограмма 1 демонстрирует препаративное ВЭЖХ-разделение с очень высокой пропускной способностью, но плохой степенью разделения двух веществ. Для каждого из соединений можно выделить фракции с высокой чистотой каждого компонента, но при этом выход остается довольно низким. На хроматограмме 2 пики хорошо разделены, оба вещества можно получить очень чистыми и с хорошими выходами, но пропускная способность будет очень низкой. Хроматограмма 3 демонстрирует оптимизированную препаративную ВЭЖХ-методику, представляющую собой компромисс между всеми тремя параметрами.

Если аналитическая и препаративная колонка заполнены одной и той же неподвижной фазой с тем же самым размером частиц, то методика может быть быстро и линейно масштабирована от аналитической до препаративной. Такое масштабирование можно выполнить за три шага.

1. **Оптимизировать условия разделения.** Определить пробные условия разделения, такие как значение pH, подвижную и неподвижную фазы, и оптимизировать их для получения подходящего разделения пиков.

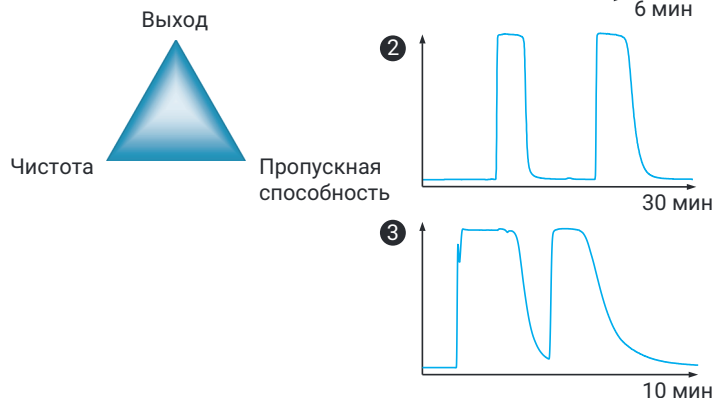


Рис. 3. Цели препаративной ВЭЖХ

2. **Увеличить вводимую пробу до максимума.** Определить емкость аналитической колонки, увеличивая количество вводимой пробы до достижения предела по разделению.
3. **Рассчитать параметры препаративного разделения по формулам линейного масштабирования.** При переходе от колонки с меньшим внутренним диаметром (аналитической) к колонке с большим внутренним диаметром (препаративной)

масштабируются два параметра: скорость потока и объем ввода. Все остальные параметры, такие как размер частиц, неподвижная и подвижная фазы, остаются теми же.

Линейные коэффициенты масштабирования скорости потока и объема ввода можно рассчитать, воспользовавшись уравнениями 1 и 2.

Правильное применение этих коэффициентов поможет вам добиться предсказуемого, беспрепятственного перехода к полупрепаративному масштабу очистки.

$$f_{p,P} = f_{a,A} \left(\frac{d_P}{d_A} \right)^2$$

Где

$f_{a,A}$ = скорость потока для аналитической колонки

d_P = внутренний диаметр препаративной колонки

d_A = внутренний диаметр аналитической колонки

Уравнение 1. Масштабирование скорости потока

$$V_{inj,P} = V_{inj,A} \left(\frac{d_P}{d_A} \right)^2$$

Где

$V_{inj,A}$ = объем ввода для аналитической колонки

d_P = внутренний диаметр препаративной колонки

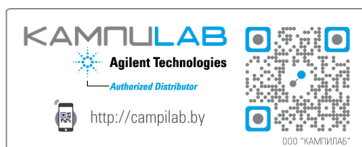
d_A = внутренний диаметр аналитической колонки

Уравнение 2. Масштабирование объема ввода

www.agilent.com/chem

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2018.
Напечатано в США 1 мая 2018 г.
5991-9229RU



 **Agilent**
Trusted Answers