



Препаративная ВЭЖХ

ВЭЖХ используется для отделения и очистки целевых соединений высокой чистоты из смешанного раствора после реакции синтеза или из природных экстрактов. Препаративная система ВЭЖХ должна предлагать возможности, отличные от нормальной системы анализа. Он используется для фракционирования высокочистых (а в некоторых случаях и больших количествах) соединений, необходимых для последующей оценки, анализа и обработки в кратчайшие сроки. Эта страница предоставляет знания, необходимые для выбора подходящей препаративной ВЭЖХ для предполагаемой цели, и знакомит с различными типами препаративных систем ВЭЖХ.

1 Установка целевого объема фракции

На выбор прибора и колонки существенно влияет требуемый объем фракции. Изучите препаративную ВЭЖХ, определив минимальный требуемый объем фракции.

2 Увеличение масштаба

- Проверка состава элюента
- Основные принципы увеличения масштаба
- Выбор прибора и колонки

Внедрение препаративных систем по назначению

Задача	Рекомендуемая система
Фракционирование для структурного анализа Очистка биохимических веществ Очистка для производства продукта	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Фракционирование десятков мг - Обычная ВЭЖХ (повторяющиеся операции фракционирования); ▪ Фракционирование сотен мг - Полупрепаративная система ▪ Фракционирование нескольких граммов - Крупномасштабная препаративная система
Фракционирование с высокой степенью чистоты (по возможности проверьте молекулярную массу).	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Повышенная эффективность очистки с использованием ELSD или LCMS ▪ Препаративная система LCMS / ELSD Высокая степень разделения эквивалентна увеличению длины колонки ▪ Препаративная система рециркуляции
Недорогое фракционирование	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Результаты, эквивалентные нескольким столбцам из одной системы <u>Preparative Recycle System</u>
Исследование условий и проверка чистоты с помощью единой системы	Анализ и фракционирование с помощью единой системы путем простого переключения линии потока Аналитическая / препаративная автоматическая система переключения
Быстрая проверка результатов фракционирования синтезированных / очищенных продуктов	Проверка взаимосвязи между образцами, результатами фракционирования (хроматограммы, спектры) и пробирками для фракций с первого взгляда <u>Open Solution</u>

* Не забудьте о мерах по устранению утечек растворителя.

В полу- или крупномасштабной препаративной системах используется большое количество растворителей, поэтому необходимо принять меры для предотвращения утечек жидкости. Например, расположите поддон под головкой плунжера, чтобы предотвратить утечку жидкости из уплотнения плунжера насоса. Будьте особенно осторожны при использовании легковоспламеняющихся растворителей. Рекомендуемые меры включают запрет на размещение оборудования, которое является потенциальным источником воспламенения, и заземление сливного бака для предотвращения возгорания из-за статического электричества.



Установка целевого объема фракции

- Выбор подходящего инструмента -

При фракционировании целевых компонентов с помощью ВЭЖХ для последующей обработки важно иметь возможность указать объем фракции или, по крайней мере, минимальный значимый объем фракции. Например, специальный коллектор фракций не требуется, если объем фракции порядка микрограммов является достаточным. Такое фракционирование может быть возможным с использованием прибора и колонки обычного размера. И наоборот, если требуется объем фракции порядка граммов, вероятно, потребуются препаративная шкала прибора и колонки. Следовательно, требуемый объем фракции существенно влияет на выбор правильной конфигурации HPLC и колонки.

(1) Понимание текущего статуса в общепринятом масштабе

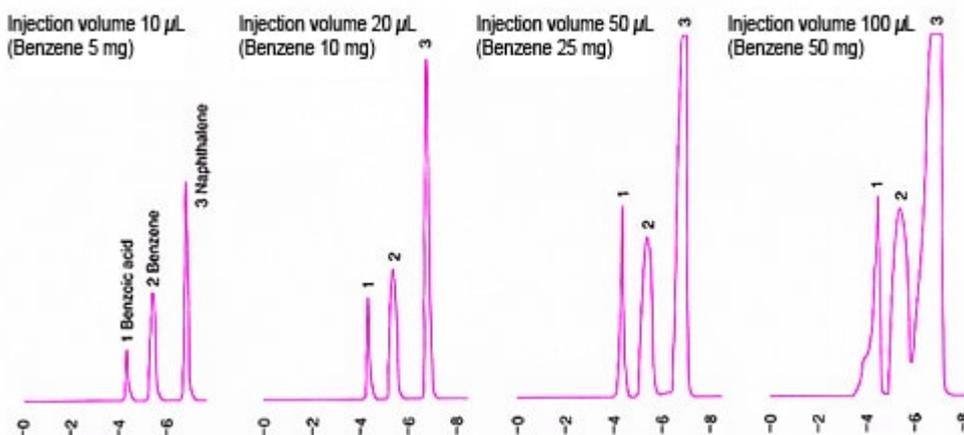
Во-первых, мы рассчитываем объем, который можно фракционировать в общепринятом масштабе (используя обычный прибор для ВЭЖХ и колонку). Понимание объема фракции в обычном масштабе позволяет выбрать подходящую препаративную ВЭЖХ для получения целевого объема фракции. (Это предположение основано на условиях анализа ВЭЖХ, которые были установлены для измерения концентрации целевых компонентов анализа в фактическом образце, и что используемый элюент не вызывает каких-либо проблем во время обработки после фракционирования.)

Расчет абсолютного объема впрыска

Если концентрация целевого компонента в растворе образца и объем, вводимый в ВЭЖХ, известны, их можно перемножить, чтобы определить абсолютный вводимый объем. (Например, если концентрация целевого компонента в растворе пробы составляет 1 мг / л, а вводимый объем составляет 10 мкл, абсолютный вводимый объем составляет 0,01 мкг.) Наиболее часто измеряемый диапазон концентраций с помощью ВЭЖХ с УФ-детектором расширяется от субмг / л до нескольких сотен мг / л. Легко видеть, что фракционные объемы всего в несколько микрограммов могут быть получены фракционированием с помощью такого прибора. Для получения фракции 1 мг (1000 мкг) требуется инъекция 100 мкл 1% (10 000 мг / л) раствора образца.

Определение предельной нагрузки

Затем рекомендуется определить, насколько может быть увеличена целевая концентрация анализа в растворе пробы и насколько можно увеличить объем впрыска с помощью обычного прибора. На диаграммах ниже показаны примеры результатов испытаний.



* Для предотвращения выхода пиков высококонцентрированного бензола за пределы шкалы детектирование проводили при 270 нм, чтобы избежать максимального поглощения.

В этом примере показаны хроматограммы смешанного раствора бензола 500 мг / мл со следовыми количествами бензойной кислоты и нафталина, проанализированных с использованием колонки ODS обычного размера (250 мм × 4,6 мм, 5 мкм).



Результаты этих испытаний показывают, что форма пика может сохраняться до объема впрыска 50 мкл, что соответствует 25 мг в пересчете на бензолную нагрузку.

Вышеуказанные испытания проводились при увеличении закачиваемого объема. Однако также можно постепенно увеличивать концентрацию пробы. Поскольку подробное исследование не требуется, объем впрыска или концентрацию образца можно увеличивать ступенчато в 5 или 10 раз, чтобы определить предел, до которого пик целевого компонента может быть отделен от соседних пиков примесей.

Важно только определить, может ли препаративная ЖХ отделить целевой пик от сосуществующих пиков. Не имеет значения, если форма пика несколько деформирована или детектор зашкаливает. Если предел нагрузки известен в общепринятом масштабе, можно рассчитать, насколько можно увеличить объем фракции, увеличив размер столбца.

(2) Прогнозирование увеличения

После того, как объем фракции установлен в общепринятом масштабе, его можно сравнить с заданным значением объема фракции.

1) Цель примерно равна объему фракции в общепринятом масштабе.

→ Специализированный коллектор фракций или колонка большего размера требуется. Если объем фракции немного ниже заданного значения, повторите фракционирование несколько раз.

2) Целевой показатель в 10–100 раз превышает объем фракции, который может быть получен в обычном масштабе.

→ Ввести лабораторную препаративную ВЭЖХ для достижения цели. Выберите подходящий прибор и колонку для проведения лабораторной препаративной ВЭЖХ.

3) Целевой объем более чем в несколько сотен раз превышает объем фракции, который может быть получен в обычном масштабе.

→ Целевые показатели могут быть трудными для достижения с помощью лабораторного прибора для ВЭЖХ. Рассмотрим промышленную препаративную ЖХ или используйте метод разделения, основанный на принципе, отличном от ВЭЖХ.

Увеличение масштаба

1) Проверка состава элюента

Когда масштаб анализа с установленными условиями, который предлагает беспроблемный анализ, увеличивается для фракционирования, могут возникнуть проблемы. Поэтому необходимо пере проверить элюент.

В зависимости от объема целевой фракции в некоторых случаях может потребоваться ввести большие количества пробы с высокой концентрацией для достижения эффективного фракционирования. Некоторые соединения могут адекватно растворяться в элюенте в масштабе анализа, но не в масштабе препарата. В таких случаях важно пересмотреть состав элюента и режим разделения.

Кроме того, поскольку фракции получают растворенными в элюенте, необходимо заранее подтвердить, что при последующей обработке (концентрировании, очистке, анализе с помощью других инструментов и т. д.) не возникнет никаких проблем.

Поскольку фракционированные растворы можно получать с помощью испарительной сушки, важно, чтобы композиция элюента содержала как можно меньше нелетучих солей.

Фосфорная кислота часто используется для аналитической ВЭЖХ. Однако его часто заменяют муравьиной кислотой, уксусной кислотой или трифторацетатом для препаративной ВЭЖХ. Кроме того, важно избегать использования ионно-парных реагентов в режиме с обращенной фазой и использовать композиции, богатые органическими растворителями, а не водой. Если после фракционирования необходимо провести биологический анализ,

(2) Основные принципы увеличения масштаба

В основном фракционирование выполняется путем простого увеличения размера в условиях анализа, как описано ниже. Однако это может привести к проблемам с

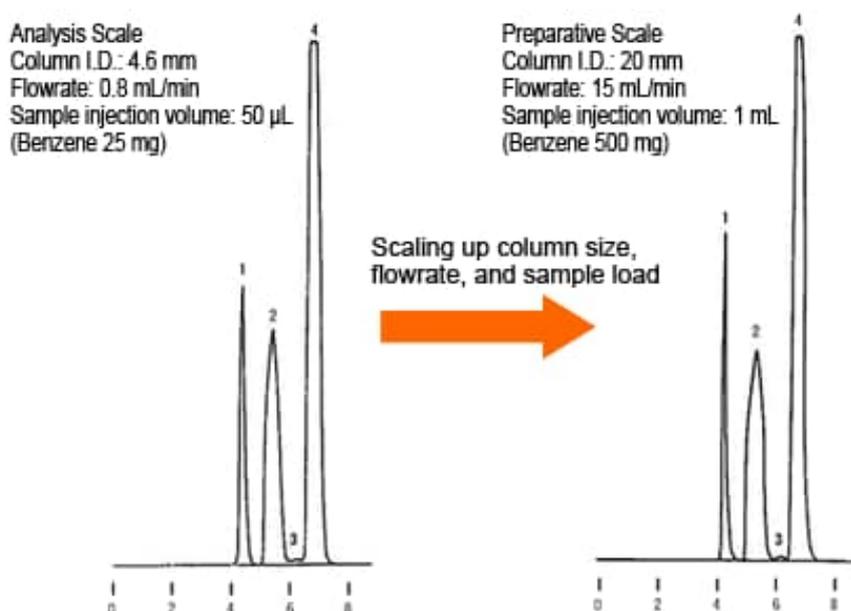


недостаточной растворимостью в элюенте некоторых образцов. Как описано в разделе «Определение предела нагрузки», подтвердите, что инъекции от 10 до 100 мг / см² возможны, увеличив нагрузку образца перед масштабированием.

Когда обычный масштаб ВЭЖХ увеличивается до полупрепаративного или препаративного масштаба, если упаковка остается прежней, считается, что скорость потока элюента и загрузка образца могут быть увеличены пропорционально площади поперечного сечения колонки для получения примерно такой же разделение.

На диаграммах ниже показан пример масштабирования с использованием столбцов с одинаковой упаковкой. Колонку с внутренним диаметром 4,6 мм использовали в масштабе анализа, а колонку диаметром 20 мм использовали в препаративном масштабе. Поскольку площадь поперечного сечения колонки с внутренним диаметром 20 мм примерно в 19 раз больше площади поперечного сечения колонки с внутренним диаметром 4,6 мм, скорость потока была увеличена с 0,8 мл / мин до 15 мл / мин, а объем вводимого образца был увеличен с 50 мкл до 1 мкл. мл. Это привело к примерно идентичным картинам хроматограмм.

Таким образом, масштабирование выполняется легко, если доступен набор столбцов с разным внутренним диаметром, но схожими характеристиками упаковки.



Пример перехода от аналитической шкалы к препаративной шкале

1. Бензойная кислота
2. Бензол
4. Нафталин

Из вышеприведенных хроматограмм становится ясно, что несмотря на то, что объем ввода был увеличен в 20 раз по сравнению со масштабом аналитической хроматографии, примерно равные значения чувствительности и площади получены как для аналитической установки, так и для препаративной системы (исключая нафталин).

Считается, что это происходит из-за того, что установка скорости потока элюента увеличивается почти на такое же соотношение, так что разбавление в элюенте приводит к примерно одинаковой концентрации полосы компонентов, сохраняемой в ячейке обнаружения в течение того же времени.

(3) Выбор инструмента и колонки

Расход колонки и элюента.

Выберите колонку с подходящим внутренним диаметром, сравнив предел нагрузки для обычного размера с объемом целевой фракции. Определите расход элюента в соответствии с площадью поперечного сечения колонки, следуя основным принципам



увеличения масштаба, описанным выше. В таблице ниже приведены примеры соотношения площадей поперечного сечения и заданных скоростей потока, увеличенных для различных колонок, исходя из внутреннего диаметра 4,6 мм и скорости потока элюента 1,0 мл / мин.

Column I.D. (mm)	Column Cross-Sectional Area Ratio	Flowrate Setting (mL/min)
4.6	1	0.8
20	18.9	15
50	115	90

Взаимосвязь между площадью поперечного сечения колонны и расходом

На практике может оказаться невозможным использовать некоторые скорости потока, показанные выше, с препаративными колонками из-за проблем с вязкостью раствора и сопротивлением давлению колонки. В этом случае сначала определите расход для препаративной колонки, а затем преобразуйте его обратно в расход для обычной колонки.

Установки для подачи растворителя

В таблице ниже показаны стандартные скорости потока в аналитических и препаративных масштабах, а также соответствующие устройства подачи растворителя для их работы. Выберите насос подачи растворителя в соответствии с определенным расходом элюента. Для каждой единицы подачи растворителя для ВЭЖХ предписывается установка максимального расхода. Рекомендуется использовать от 1/2 до 2/3 максимального значения расхода в качестве верхнего предела для практических применений. (Продолжительная работа при высоком расходе приводит к быстрому износу уплотнения плунжера.)

Size	Column I.D.	Flowrate	Applicable Solvent Delivery Pump	Max. Load Guide
Conventional	3 to 8 mm	0.5 to 3 mL/min	LC-20AT/20AD	20 mg
Semi-Preparative	10 to 20 mm	3 to 10 mL/min	LC-6AD	300 mg
Preparative	30 to 50 mm	10 to 100mL/min	LC-8A	2 g

Скорость потока и соответствующие единицы подачи растворителя

Инжекторы

Объем впрыска пробы можно увеличить в соответствии с соотношением площадей поперечного сечения, чтобы выбрать подходящий инжектор для данного объема впрыска.

Если используется ручной инжектор, Rheodyne 7725i или 7725 с диапазоном петель для проб различной емкости до 5 мл, то ручной инжектор может поддерживать как аналитическую ВЭЖХ систему, так и препаративную ВЭЖХ. (Если объем инъекции превышает 5 мл, рекомендуется использовать препаративный инжектор Rheodyne 3725.)

Если используется автосамплер, максимальный объем инъекции зависит от модели. Диапазон настроек объема инъекции также различается в зависимости от опций.

Возможно, удастся увеличить объем ввода вашего существующего автосэмплера, добавив дополнительный контур для отбора проб.

Ассортимент автосэмплеров для препаративных систем

Наименование модели	Особенности / приложения	Объем впрыска (мкл) (максимум, используя опции)	Основные материалы смачиваемой поверхности
SIL-10AF	Позволяет производить инъекцию методом петлевого дозирования (или методом дозирования шприцом). Рекомендуемый объем впрыска до 2000 мкл.	От 1 до 50 (макс. 5000)	SS
SIL-10AP	Объем инъекции до 5 мл входит в стандартную	От 1 до 5000	SS



Крупномасштабная препаративная система



Крупномасштабная препаративная система (тип 20AP)

В крупномасштабной препаративной системе используется устройство подачи растворителя **LC-20AP**. Это мощное устройство с максимальной скоростью потока 150 мл / мин, подходящее для автоматического непрерывного фракционирования с колонкой с внутренним диаметром от 20 до 50 мм. Его также можно использовать для исследования условий разделения и условий загрузки, а также для проверки чистоты жидких фракций с использованием аналитической колонки (1 мл / мин).

Система может быть сконфигурирована с использованием различных опций, включая пять инжекторов проб, три клапана рециркуляции и два коллектора фракций.

Полупрепаративная система общего назначения



Полупрепаративная система (тип 20AR)

Система с LC-20AR поддерживает колонки от аналитических до полупрепаративных с внутренним диаметром 20 мм, а система с LC-20AT поддерживает колонки от полумикроаналитических колонок до полупрепаративных колонок с внутренним диаметром 10 мм. Системы могут быть настроены в соответствии с их назначением: от простых систем с ручным вводом и изократическим разделением до автоматизированных систем с вводом автосэмплера и градиентным элюированием.

Препаративная система LCMS / ELSD

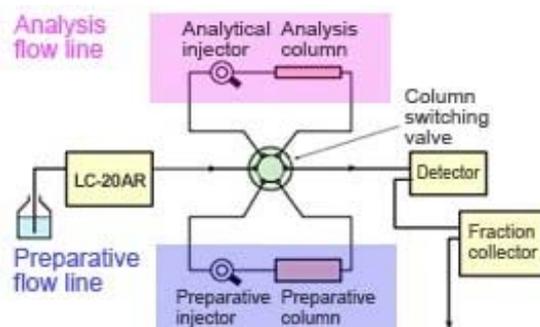


Если целевое соединение не поглощает свет или если примеси в растворе образца не поглощают свет, эффективность препаративной очистки можно повысить, также используя детектор, не основанный на принципе поглощения света, такой как ELSD (испарительное рассеяние света). Детектор) или МС (масс-спектрометр). В частности, фракционирование с использованием триггера МС может использовать высокую



селективность ЖХМС для достижения высокой чистоты целевого компонента из образцов, содержащих много примесных компонентов.

Аналитическая / препаративная автоматическая система переключения



Блок-схема аналитической / препаративной системы автоматического переключения

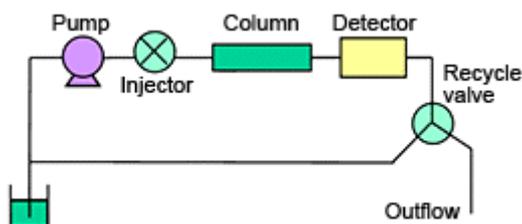
Аналитическая / препаративная автоматическая система переключения позволяет беспрепятственно исследовать условия фракционирования как в аналитическом, так и в препаративном масштабе. Простое управление переключающим клапаном на проточной линии позволяет легко переключаться между аналитическими и препаративными весами. Использование единой системы для управления всеми процессами, от исследования условий разделения и загрузки проб с помощью обычной колонки до масштабирования, снижает расход растворителя подвижной фазы.

После фракционирования эта система позволяет плавно и эффективно переключаться в аналитический режим.

Высокоэффективная препаративная система рециркуляции



Высокоэффективная полупрепаративная система рециркуляции (тип 20AR)



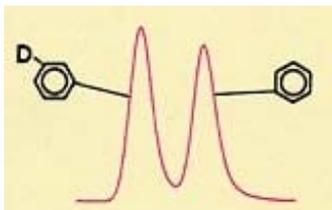
Блок-схема замкнутого цикла рециркуляции

Метод рециклового разделения обеспечивает эффект, эквивалентный увеличению длины колонки, путем многократного введения в ту же колонку полосы элюата, содержащей целевой компонент, который элюируется из разделительной колонки.



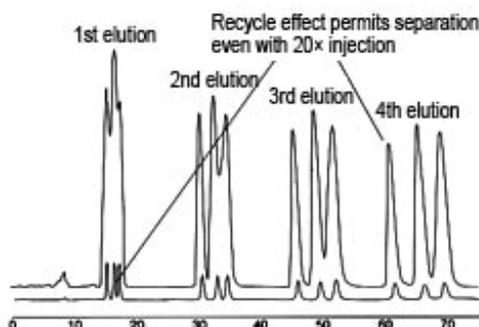
Эта препаративная система рециркуляции с использованием устройства подачи растворителя 20AR или 8A (макс. скорость потока: 20 мл / мин с 20AR, 150 мл / мин с 8A) включает набор для минимизации внутреннего объема и обеспечения высокоэффективного разделения рециркуляции (рециркуляция с замкнутым контуром разделение).

Комбинируя эту систему с соответствующей колонкой, можно достичь теоретического числа тарелок более 1 миллиона. Это позволяет разделить бензол и монодейтерированный заменитель бензола, которые имеют лишь очень небольшие различия в свойствах (см. Диаграмму ниже).



Разделение бензола и монодейтерированного заменителя бензола
Колонка: STR ODS-II (250 x 20 мм ID) x 2

Кроме того, если объем элюирования до появления пика составляет 35 мл или более, рециркуляционное разделение может быть выполнено с помощью колонки аналитического размера (см. Диаграмму ниже).



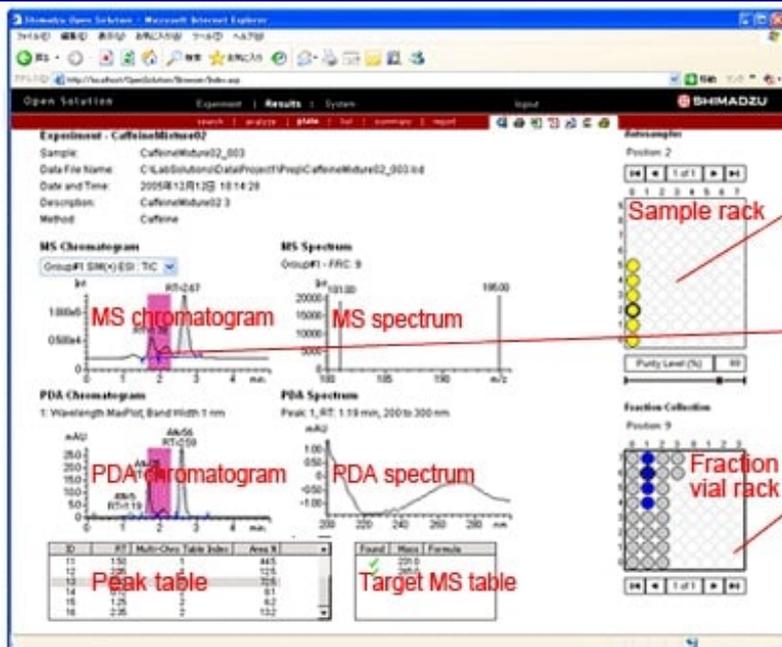
Повышенная скорость фракционирования с использованием рециркуляционного разделения с аналитическими ODS
Колонка: STR ODS-II (150 x 6 мм ID)
Скорость потока: 2 мл / мин, сек / изо- / н-бутилбензол

Сепарация рециркуляции воспринимается как метод, требующий много времени. Однако при разделении ближайших компонентов скорость фракционирования в единицу времени в некоторых случаях может быть увеличена за счет использования рециркуляционного разделения с введением большого количества пробы (см. Диаграмму ниже).

Open Solution- поддержка проверки и очистки соединений

Препаративные системы часто используются для проверки синтеза и очистки соединений. Однако большое количество обработанных образцов приводит к фракционированию на огромное количество флаконов, что затрудняет определение того, какой пик был фракционирован на какой флакон. Следовательно, безошибочное отслеживание образцов чрезвычайно важно для образцов, поставляемых для фракционирования, их соответствующих хроматограмм и пиков, а также связанных флаконов (фракции целевых компонентов).

Open Solution отображает взаимосвязь между диаграммой подставки для флаконов, результатами фракционирования и флаконами для фракций. Достаточно щелкнуть указателем мыши по изображению флакона, чтобы сразу проверить взаимосвязь между хроматограммой, флаконом с фракциями и спектрами.



- Click a peak on the chromatogram to display the corresponding spectrum.
- Click on a target vial to display the corresponding chromatogram and spectrum.
- Click on a fraction vial to highlight the corresponding peak.
- Displays the fraction vials associated with the currently displayed analysis data.
- Zoom in or out to magnify or reduce the chromatogram or spectrum.

Окно проверки результатов фракционирования открытого решения