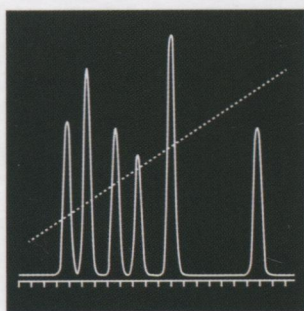


Х И М И И

Ллойд Р. Снайдер,
Джон У. Долан

Высокопроизводительная
градиентная элюция:
практическое применение
модели линейного
изменения элюирующей
силы растворителя



ТЕХНОСФЕРА



М И И Р И И

Ллойд Р. Снайдер
Джон У. Долан

**Высокопроизводительная
градиентная элюция:
практическое применение модели
линейного изменения элюирующей
силы растворителя**

Перевод с английского
к.б.н. С.Б. Гомбоевой и О.А. Петуховой
под общей редакцией
к.т.н. М.Б. Бару

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2015

УДК 543.544.5
ББК 24.46
С53

С53 Снайдер Ллойд Р., Долан Джон У.

Высокопроизводительная градиентная элюция: практическое применение модели линейного изменения элюирующей силы растворителя
Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015. – 584 с. + 2 с. цв. вкл., ISBN 978-5-94836-404-9

В книге детально рассмотрены проблемы разделения в жидкостной колоночной хроматографии высоких давлений и основы градиентной элюции: эффект градиентной элюции при разделении, оптимизация градиентного разделения, компьютерное моделирование градиентной элюции, сходимость результатов моделирования, оборудование для градиентной хроматографии, выбор хроматографической системы и ее тестирование, вопросы воспроизводимости полученных результатов, артефакты воспроизведения, неисправности и способы их устранения, разделение больших молекул, препаративные разделения, различные применения градиентной элюции в LC-MS, в ионообменной и нормально-фазной хроматографии, модель линейного изменения элюирующей силы растворителя.

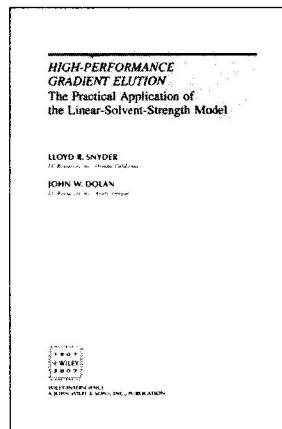
Книга будет интересна практикующим хроматографистам.

УДК 543.544.5
ББК 24.46

© 2007 by John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Все права защищены. Авторизованный перевод с английского издания «Джон Вайли энд Санс Лимитид». ЗАО РИЦ «ТЕХНОСФЕРА» несет полную ответственность за правильность перевода. «Джон Вайли энд Санс Лимитид» освобождается от этой ответственности. Ни одна часть книги не может быть воспроизведена в какой-либо форме без письменного разрешения правообладателя оригинала «Джон Вайли энд Санс Лимитид».

© 2015, ЗАО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление



ISBN 978-5-94836-404-9
ISBN 978-0-471-70646-5 (англ.)

Содержание

Предисловие редактора перевода	11
Предисловие	13
Литература	18
Словарь условных обозначений и принятых сокращений	19
Глава 1. Введение	26
1.1. «Основная проблема элюирования» и необходимость градиентного элюирования	26
1.2. Другие причины, побуждающие использовать градиентную элюцию	30
1.3. Профиль градиента	32
1.4. Общие черты градиентного и изократического процессов	35
1.4.1. Сравнение изократического и градиентного элюирования	36
1.4.2. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя (ЛИС)	39
1.5. Компьютерное моделирование	45
1.6. Классификация образцов	46
1.6.1. Образцы соединений с родственной структурой («правильные образцы»)	46
1.6.2. Образцы соединений с неродственной структурой («неправильные образцы»)	46
Литература	49
Глава 2. Принципы градиентной элюции	51
2.1. Изократическое разделение	51
2.1.1. Удерживание	51
2.1.2. Ширина пиков и число теоретических тарелок	52
2.1.3. Разрешение	53
2.1.4. Значение условий разделения	55
2.2. Градиентное разделение	61
2.2.1. Удерживание	62
2.2.2. Ширина пиков	68
2.2.3. Разрешение	69
2.2.4. Степень сложности образца и емкость по пикам	78
2.3. Влияние градиентных условий на разделение	81
2.3.1. Скорость нарастания градиента b : изменение времени градиента	82
2.3.2. Скорость нарастания градиента b : изменения длины или внутреннего диаметра колонки	84
2.3.3. Скорость нарастания градиента b : изменение скорости потока	88
2.3.4. Пределы градиента $\Delta\phi$: изменение начального значения процента $V(\phi)$	91
2.3.5. Область градиента $\Delta\phi$: изменение конечного значения процента $V(\phi)$	96
2.3.6. Влияние задержки градиента	97
2.3.7. Влияние профиля градиента (нелинейные градиенты)	101

2.3.8. Заключительный обзор влияния градиентных условий на хроматографическое разделение	106
2.4. Смежные вопросы	107
2.4.1. Неидеальное удерживание в градиентном элюировании	107
2.4.2. Заблуждения, связанные с градиентным элюированием	107
Литература	108
Глава 3. Разработка методики разделения	110
3.1. Последовательный подход к разработке методики разделения	110
3.1.1. Цели разделения (первый этап, рис. 3.1)	112
3.1.2. Природа образца (второй этап, рис. 3.1).	115
3.1.3. Начальные экспериментальные условия	116
3.1.4. Воспроизводимость результатов	116
3.1.5. Компьютерное моделирование: да или нет?	117
3.1.6. Предварительная обработка образца (пробоподготовка)	118
3.2. Предварительные эксперименты	119
3.2.1. Анализ первичной хроматограммы (третий этап, рис. 3.1).	122
3.3. Разработка градиентного метода: зависимость разрешения от условий эксперимента	128
3.3.1. Оптимизация градиентного коэффициента удерживания k^* (четвертый этап, рис. 3.1).	130
3.3.2. Оптимизация коэффициента селективности α^* в градиентном режиме (пятый этап, рис. 3.1)	131
3.3.3. Оптимизация градиента (шестой этап, рис. 3.1)	135
3.3.4. Кусочно-линейные градиенты (продолжение шестого этапа, рис. 3.1).	140
3.3.5. Оптимизация числа теоретических тарелок N^* (седьмой этап, рис. 3.1).	143
3.3.6. Уравновешивание колонки между последовательными разделениями.	147
3.3.7. Экспресс-разделения	148
3.4. Компьютерное моделирование	149
3.4.1. Количественные прогнозы и карты разрешения	151
3.4.2. Оптимизация градиента	154
3.4.3. Изменение параметров колонки.	156
3.4.4. Разделение «правильных» образцов	157
3.4.5. Другие возможности компьютерного моделирования	159
3.4.6. Точность компьютерного моделирования	162
3.4.7. Отслеживание пика	163
3.5. Воспроизводимость метода	163
3.5.1. Разработка метода	165
3.5.2. Рутинные анализы	166
3.5.3. Изменение объема колонки	168
3.6. Дополнительные способы повышения селективности	169
3.7. Ортогональные разделения	172
3.7.1. Двумерные разделения.	175
Литература	176

Глава 4. Оборудование для градиентной хроматографии	180
4.1. Конфигурации градиентных систем.	180
4.1.1. Смешивание на линии высокого давления в сравнении со смешиванием на линии низкого давления	181
4.1.2. Выбор оптимального варианта	182
4.2. Основные рекомендации по выбору хроматографических систем	193
4.2.1. Как выбрать поставщика?	194
4.2.2. Перемешивание на стороне высокого или низкого давления?	195
4.2.3. Кому осуществлять наладку?	195
4.2.4. Прикладные задачи	195
4.3. Определение эффективности градиентной системы.	196
4.3.1. Проверка формирования градиента	197
4.3.2. Дополнительное тестирование хроматографов.	201
4.4. Оценка объема задержки	204
Литература	205
Глава 5. Шумы при разделении и неисправности	206
5.1. Предотвращение проблем	207
5.1.1. Проверка оборудования	211
5.1.2. Объем задержки.	212
5.1.3. Холостой градиент	212
5.1.4. Практические рекомендации для выполнения повседневной работы.	213
5.1.5. Разработка метода	215
5.2. Перенос метода	219
5.2.1. Компенсация различия объемов задержки	219
5.2.2. Другие источники возникновения проблем при переносе метода	225
5.3. Уравновешивание колонки	228
5.3.1. Первичные эффекты	229
5.3.2. Медленное уравновешивание колонки и подвижная фаза	231
5.3.3. Практическая оценка и рекомендации	232
5.4. Артефакты разделения	234
5.4.1. Дрейф базовой линии	235
5.4.2. Шумы базовой линии	239
5.4.3. Пики холостого градиента	242
5.4.4. Дополнительные пики в анализируемых образцах.	245
5.4.5. Искажения профиля пика	248
5.5. Диагностика неисправностей	257
5.5.1. Выявление проблемы	258
5.5.2. Устранение неполадок и рекомендации по техническому обслуживанию	260
5.5.3. Тестирование работы градиентной системы	271
5.5.4. Примеры диагностики неполадок.	280
Литература	295
Глава 6. Разделение крупных молекул	297
6.1. Общие соображения.	297
6.1.1. Значения S крупных молекул	298

6.1.2. Величины N^* для макромолекул	304
6.1.3. Конформационное состояние	306
6.1.4. Гомо-олигомерные образцы	309
6.1.5. Предполагаемые модели процесса градиентного разделения крупных молекул	313
6.2. Биополимеры	321
6.2.1. Пептиды и белки	321
6.2.2. Другие виды разделений и образцов	335
6.2.3. Проблемы разделения	347
6.2.4. Экспресс-анализ пептидов и белков	350
6.2.5. Двумерные разделения пептидов и белков	351
6.3. Синтетические полимеры	351
6.3.1. Определение распределения молекулярной массы	353
6.3.2. Определение химического состава	355
Литература	356
Глава 7. Препаративные разделения	361
7.1. Введение	361
7.1.1. Оборудование, используемое в препаративной хроматографии	364
7.2. Изократическое разделение	364
7.2.1. Разделение соприкасающихся пиков	365
7.2.2. Разработка методики разделения методом соприкасающихся пиков для изократического режима	371
7.2.3. Способ разделения за пределами соприкасающихся пиков	381
7.3. Градиентные разделения	383
7.3.1. Разделение соприкасающихся пиков	387
7.3.2. Разработка методики градиентного разделения соприкасающихся пиков	387
7.3.3. Перегрузка по объему пробы	394
7.3.4. Возможные сложности в теории соприкасающихся пиков и их практическое решение	394
7.4. Сильно перегруженное разделение	398
7.4.1. Так ли уж необходим градиент?	398
7.4.2. Эффект смещения	400
7.4.3. Разработка методики	401
7.4.4. Разделения пептидов и небольших белков	402
7.4.5. Эффективность колонки	403
7.4.6. Разделение в промышленных масштабах	404
Литература	405
Глава 8. Применение градиентного элюирования в других областях хроматографии	406
8.1. Градиентное элюирование в ЖХ-МС	407
8.1.1. Области применения	408
8.1.2. Требования к ЖХ-МС	409
8.1.3. Основы ЖХ-МС	410
8.1.4. Сравнение условий градиентного элюирования для ЖХ-УФ и ЖХ-МС	415

6.1.2. Величины N^* для макромолекул	304
6.1.3. Конформационное состояние.	306
6.1.4. Гомо-олигомерные образцы.	309
6.1.5. Предполагаемые модели процесса градиентного разделения крупных молекул	313
6.2. Биополимеры.	321
6.2.1. Пептиды и белки.	321
6.2.2. Другие виды разделений и образцов.	335
6.2.3. Проблемы разделения	347
6.2.4. Экспресс-анализ пептидов и белков.	350
6.2.5. Двумерные разделения пептидов и белков	351
6.3. Синтетические полимеры	351
6.3.1. Определение распределения молекулярной массы	353
6.3.2. Определение химического состава	355
Литература	356
Глава 7. Препаративные разделения	361
7.1. Введение	361
7.1.1. Оборудование, используемое в препаративной хроматографии	364
7.2. Изократическое разделение	364
7.2.1. Разделение соприкасающихся пиков	365
7.2.2. Разработка методики разделения методом соприкасающихся пиков для изократического режима	371
7.2.3. Способ разделения за пределами соприкасающихся пиков	381
7.3. Градиентные разделения.	383
7.3.1. Разделение соприкасающихся пиков	387
7.3.2. Разработка методики градиентного разделения соприкасающихся пиков	387
7.3.3. Перегрузка по объему пробы	394
7.3.4. Возможные сложности в теории соприкасающихся пиков и их практическое решение	394
7.4. Сильно перегруженное разделение	398
7.4.1. Так ли уж необходим градиент?	398
7.4.2. Эффект смещения	400
7.4.3. Разработка методики	401
7.4.4. Разделения пептидов и небольших белков	402
7.4.5. Эффективность колонки	403
7.4.6. Разделение в промышленных масштабах	404
Литература	405
Глава 8. Применение градиентного элюирования в других областях хроматографии	406
8.1. Градиентное элюирование в ЖХ-МС	407
8.1.1. Области применения	408
8.1.2. Требования к ЖХ-МС	409
8.1.3. Основы ЖХ-МС	410
8.1.4. Сравнение условий градиентного элюирования для ЖХ-УФ и ЖХ-МС	415

8.1.5. Разработка методики для ЖХ-МС	417
8.1.6. Особенности ЖХ-МС	429
8.2. Ионнообменная хроматография (ИОХ)	438
8.2.1. Теория	439
8.2.2. Зависимость разделения от условий градиента	447
8.2.3. Разработка метода для градиентной ИОХ	447
8.3. Нормально-фазная хроматография (НФХ)	450
8.3.1. Теория	451
8.3.2. Разработка метода для градиентной НФХ	451
8.3.3. Хроматография гидрофильных взаимодействий (ГИХ)	453
8.4. Трехкомпонентные или четырехкомпонентные градиенты	457
Литература	461
Глава 9. Теория и формулы	463
9.1. Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя	463
9.1.1. Удерживание	465
9.1.2. Ширина пика	472
9.1.3. Селективность и разрешение	478
9.1.4. Преимущества применения ЛИС-модели	480
9.2. Эффекты второго порядка	481
9.2.1. Определение значений ϕ и k	482
9.2.2. Неидеальное оборудование	490
9.3. Точность прогнозирования градиентной элюции	494
9.3.1. Время удерживания в градиенте	495
9.3.2. Предварительный расчет ширины пиков	498
9.3.3. Измерения значений S и $\log k_0$	498
9.4. Значения S	499
9.4.1. Оценка значения S исходя из свойств растворителя и экспериментальных условий	501
9.5. Значения N в градиентной элюции	504
Литература	512
Приложение I. Приближение о постоянстве значения S в градиентном режиме	515
Приложение II. Определение условий изократического элюирования по результатам предварительного градиентного анализа	517
Приложение III. Оценка колонок с обращенно-фазным сорбентом в отношении селективности и размывания пиков	520
Литература	532
Приложение IV. Свойства растворителей, используемых в градиентной элюции	533
Литература	534
Приложение V. Теория препаративного разделения	535
V.1. Изократическое разделение	535
V.1.1. Влияние массы образца и условий разделения на ширину пика	536
V.1.2. Емкость колонки w_s	538

V.1.3. «Оптимальные» значения w_x/w_s и N_0 для разделения соприкасающихся пиков.	539
V.1.4. Влияние объема пробы.	540
V.2. Градиентный режим.	540
V.2.1. Зависимость ширины пика от массы образца и условий разделения.	541
V.2.2. Определение значения α	543
V.2.3. Определение массы образца для С-П-разделения.	543
Литература.	544
Приложение VI. Более подробно о хроматографии вирусов.	545
VI.1. Структура аденовирусов.	545
VI.2. Пробоподготовка.	548
VI.3. Дополнительные сведения о хроматографической очистке вирусов. . .	549
VI.4. Дополнительные сведения о хроматографическом анализе вирусов. . .	549
Литература.	550
Предметный указатель.	551
Компания «Шимадзу Европа ГмбХ»: Увеличение эффективности и производительности работы аналитических лабораторий с помощью оборудования для ВЭЖХ-производства Shimadzu Corporation.	568