



М И Р Х И М И И

Препаративная хроматография

Редакторы оригинального издания
Хеннер Шмидт–Трауб
Михаэль Шульте
Андреас Зайдель–Моргенштерн

Перевод с английского
И.В. Важениной
д.ф.–м.н. Е.А Козловского
к.х.н. Р.А. Федорова
Р.И. Загитовой
к.т.н. М.Б. Бару

Под общей редакцией
к.т.н. М.Б. Бару
И.В. Важениной
д.х.н. С.М. Староверова

ТЕХНОСФЕРА
Москва
2022

УДК 543.544.5

ББК 24.58

П68

П68 Препаративная хроматография

Под ред. Х. Шмидта-Трауба, М. Шульте, А. Зайделя-Моргенштерна

М.: ТЕХНОСФЕРА, 2022. – 664 с., ISBN 978-5-94836-642-5

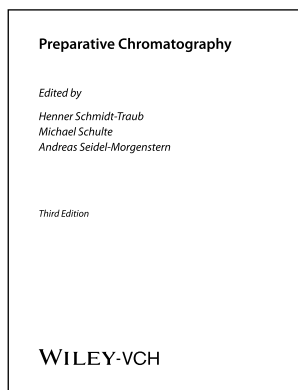
За 7 лет, которые прошли со времени второго издания книги, практика и теория препаративной хроматографии ушли далеко вперед, что побудило авторов подготовить третье издание.

Появились новые материалы, послужившие основой для создания неподвижных фаз, в особенности для разделения больших биомолекул, и расширившие возможности разработки методов. Проведены более подробные исследования для улучшения количественной оценки многокомпонентных равновесий. В книге обобщены недавние достижения в части оптимизации правил и методов проектирования и эксплуатации хроматографического оборудования. Кроме того, благодаря сотрудничеству инженеров-технологов и математиков были разработаны и могут быть применены к широкому кругу задач более быстрые и более эффективные алгоритмы моделирования и особенно оптимизации хроматографических процессов.

Авторы рассматривают препаративную хроматографию и решаемые ею задачи с точки зрения как химиков, так и инженеров-технологов, чтобы улучшить взаимопонимание и передачу знаний между обеими дисциплинами.

УДК 543.544.5

ББК 24.58



© 2020 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany
Все права защищены. Данный перевод опубликован по лицензии оригинального издателя «Wiley-VCH GmbH».

© АО «РИЦ «ТЕХНОСФЕРА», перевод на русский язык, оригинал-макет, оформление, 2022

ISBN 978-5-94836-642-5

ISBN 978-3-527-34486-4 (англ.)

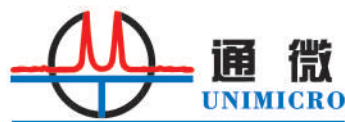
Содержание

Предисловие авторов	20
Предисловие к русскому переводу третьего издания «Препаративной хроматографии»	22
Предисловие редакторов русского перевода	23
Об авторах	25
Перечень принятых сокращений	26
 Глава 1. Введение	38
<i>Хеннер Шмидт-Трауб и Рейнхард Дитц</i>	
1.1. Хроматография и тенденции ее развития	38
1.2. Цель книги	41
1.3. Как читать эту книгу	42
Литература	44
 Глава 2. Основные понятия и общая терминология	46
<i>Андреас Зайдель-Моргенштерн</i>	
2.1. Принципы и особенности хроматографии	46
2.2. Анализ и описание хроматограмм	50
2.2.1. Понятие пористости	50
2.2.2. Времена удерживания и коэффициенты емкости	53
2.2.3. Эффективность хроматографического разделения	55
2.2.4. Разрешение	58
2.2.5. Падение давления	61
2.3. Массоперенос и гидродинамика	62
2.3.1. Принципы массопереноса	63
2.3.2. Распределение жидкости в колонке	65
2.3.3. Дефекты упаковки	66
2.3.4. Внеколоночные эффекты	67
2.4. Термодинамика состояния равновесия	67
2.4.1. Определение изотерм	67
2.4.2. Модели адсорбции	68
2.4.2.1. Изотермы однокомпонентной адсорбции	69
2.4.2.2. Многокомпонентные изотермы на основе модели Ленгмюра	71
2.4.2.3. Конкурентные изотермы, основанные на теории идеального адсорбционного раствора	72
2.4.2.4. Изотермы с учетом стерических факторов	75
2.4.3. Связь между изотермой и формой пика	76
2.5. Перегрузка колонки и режимы работы	80
2.5.1. Стратегии перегрузки	80
2.5.2. За пределами изократического элюирования периодического действия	81
Литература	83



Препаративная ВЭЖХ

Полный процесс очистки образцов!



- 270+ видов колонок для препаративной ВЭЖХ
- Доступны системы производительностью 50 мл/мин (серия EasySep®-3050) и 100 мл/мин (серия EasySep®-3100)
- Большой диапазон потока: вы можете выделять от нанограмма до грамма образца
- Двухволновой детектор УФ/видимой области с длиной волны от 190 до 800 нм
- Широкая область применения благодаря множеству детекторов (UV/Vis, DAD, FLD, ELSD, MSD)
- Возможность выполнять очистку в отсутствие пользователя благодаря автоматическому пробоотборнику и коллектору фракций

Лучшие решения для лаборатории

Почему вам стоит выбрать продукцию Unimicro?

- Компания основана в 1996 году и уже более 20 лет успешно разрабатывает и производит ВЭЖХ-системы и колонки.
- Более 3000 учёных по всему миру с удовольствием пользуются продукцией Unimicro.
- Компания имеет 87 патентов в Китае, Японии и США, а также международный сертификат соответствия СМК – ISO 9001:2015.



Единый телефон

8 800 770 71 21

бесплатный звонок по России



121374, г. Москва
Кутузовский проспект, д. 88

helicon.ru

ФИЛИАЛЫ:

В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ:

630090 г. Новосибирск,
ул. Николаева, д. 9/1,
2 подъезд, 2 этаж.
Тел.: +7 (383) 207-84-85
novosibirsk@helicon.ru

В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ:

194356 г. Санкт-Петербург,
ул. Асафьева, д. 3, корп. 1, литер А, пом.15-Н
Тел.: +7 (812) 244-85-52
spb@helicon.ru

В ПРИВОЛЖСКОМ РЕГИОНЕ:

420021 г. Казань,
ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел.: +7 (843) 202-33-37
volga@helicon.ru

В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ:

344116 г. Ростов-на-Дону,
2-я улица Володарского, д. 76/23а
Тел.: +7 (863) 209-88-89
rostov@helicon.ru

НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ:

690021, г. Владивосток,
ул. Запорожская, д. 77, 3 этаж, офис 341
Тел.: +7 (914) 720-55-63
vladivostok@helicon.ru

Глава 3. Неподвижные фазы 85*Михаэль Шульте*

3.1.	Обзор неподвижных фаз и методов их упаковки	85
3.2.	Неорганические сорбенты	87
3.2.1.	Активированный уголь	89
3.2.2.	Синтетические цеолиты	90
3.2.3.	Пористые оксиды: двуокись кремния, активированная окись алюминия, двуокись титана, двуокись циркония и окись магния	91
3.2.4.	Двуокись кремния	92
3.2.4.1.	Химические свойства поверхности	93
3.2.4.2.	Нагрузочные характеристики сорбента	95
3.2.5.	Диатомовая земля	96
3.2.6.	Силикагель для обращенно-фазовой хроматографии	96
3.2.6.1.	Силанизация поверхности силикагел	96
3.2.6.2.	Силанизация	97
3.2.6.3.	Исходные силаны	97
3.2.6.4.	Исходные пористые силикагели	98
3.2.6.5.	Реакции и условия их проведения	98
3.2.6.6.	Эндкепирование	98
3.2.6.7.	Хроматографические характеристики обращенно-фазовых силикагелей	100
3.2.6.8.	Хроматографическая эффективность	100
3.2.6.9.	Гидрофобные свойства, фактор удерживания (количество органического растворителя для элюирования), селективность	102
3.2.6.10.	Селективность по форме молекулы	103
3.2.6.11.	Силанольная активность	104
3.2.6.12.	Чистота	104
3.2.6.13.	Силикагель с улучшенной рН-стабильностью	105
3.2.7.	Оксид алюминия	106
3.2.8.	Диоксид титана	107
3.2.9.	Другие оксиды	108
3.2.9.1.	Оксид магния	108
3.2.9.2.	Диоксид циркония	108
3.2.10.	Пористое стекло	109
3.3.	Поперечно-сшитые органические полимеры	110
3.3.1.	Общие аспекты	111
3.3.2.	Неподвижные фазы на основе гидрофобных полимеров	114
3.3.3.	Неподвижные фазы на основе гидрофильных полимеров	116
3.3.4.	Ионообменная хроматография (ИОХ)	116
3.3.4.1.	Оптимизация ионообменных смол	122
3.3.5.	Смешанный режим	124
3.3.6.	Гидроксиапатит	126
3.3.7.	Адсорбенты специального назначения	126
3.3.7.1.	Аффинные сорбенты с белком А	129
3.3.7.2.	Другие белки-рецепторы IgG: белок G и белок L	131



Компания ФИЗЛАБПРИБОР – официальный дистрибьютор ведущих мировых производителей хроматографического оборудования и сорбентов.



Осуществляются регулярные поставки материалов как для аналитической хроматографии, так и для процессов промышленной хроматографической очистки.



В штате нашей компании группа опытных научных консультантов, которые оказывают помощь в подборе оборудования и сорбентов под Вашу задачу.



Наличие собственной сервисной службы позволяет оказывать техническую поддержку заказчиков и осуществлять постгарантийное обслуживание поставленного оборудования.



Широкий выбор оборудования: для аналитической, полупрепаративной и промышленной хроматографии высокого, среднего и низкого давлений. Возможность изменения конфигураций хроматографических систем позволяет значительно снизить расходы на закупку и максимально эффективно использовать бюджет. Вместе с хроматографическими системами поставляются стеклянные, стальные или акриловые пилотные колонны диаметром до 2000 мм, а также колонны с динамической аксиальной компрессией (DAC) и вспомогательное оборудование для упаковки колонн.



Написать
нам на почту

Будем рады обращению в нашу компанию!

fizlabpribor.ru +7(495)740-54-06, +7(495)740-54-30 info@fizlabpribor.ru

3.3.7.3. Сорбенты для производных/меченых соединений: аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлами (АХИМ)	131
3.3.7.4. Другие аффинные сорбенты для меченых соединений	136
3.3.8. Специализированные адсорбенты	138
3.3.8.1. Низкомолекулярные лиганды	140
3.3.8.2. Природные полимеры (белки, полинуклеотиды)	142
3.3.8.3. Синтетические полимеры	145
3.4. Адвективные хроматографические адсорбенты	147
3.4.1. Адсорбционные мембраны и мембраны из привитых полимеров	148
3.4.2. Адсорбционные нетканые материалы	149
3.4.3. Композиты из волокон и частиц	152
3.4.4. Волокна с увеличенной площадью	152
3.4.5. Монолитные сорбенты	153
3.4.6. Хроматографические адсорбенты для более крупных молекул	156
3.5. Хиральные неподвижные фазы	157
3.5.1. Целлюлозные и амилозные ХНФ	158
3.5.2. ХНФ на основе антибиотиков	162
3.5.3. ХНФ на основе циклофруктанов	162
3.5.4. Синтетические полимеры	163
3.5.5. Направленная разработка селектора	164
3.5.6. Дальнейшее развитие	166
3.6. Свойства адсорбентов и их влияние на хроматографические характеристики	168
3.6.1. Химические и физические свойства адсорбентов	168
3.6.2. Морфология	168
3.6.3. Адсорбенты на основе твердых частиц: размер частиц и гранулометрический состав	169
3.6.4. Структура пор	171
3.6.5. Параметры структуры пор	172
3.6.6. Сравнительный рейтинг колонок	173
3.7. Обслуживание и регенерация сорбента	173
3.7.1. Удаление адсорбированных остаточных примесей без выгрузки сорбента из колонны	174
3.7.2. Промывка ионообменников	176
3.7.3. Промывка сорбентов с белком А	177
3.7.4. Кондиционирование поверхности силикагеля	179
3.7.5. Стерилизация адсорбентов без выгрузки из колонны	180
3.7.6. Консервация адсорбентов и колонн для хранения	181
Литература	181
Глава 4. Выбор условий разделения	192
<i>Михаэль Шульте</i>	
4.1. Постановка задачи	197
4.2. Подвижные фазы для жидкостной хроматографии	200
4.2.1. Стабильность	201



Компания ФИЗЛАБПРИБОР – официальный дистрибьютор ведущих мировых производителей хроматографического оборудования и сорбентов.



Жидкий сорбент Аммофлок-25 собственного производства для предварительной очистки в биотехнологических процессах позволяет удалять значительное количество отрицательно заряженных примесей, таких как липополисахариды (бактериальные эндотоксины), ДНК, белки клетки-хозяина, вирусные частицы и т.д., а также другие различные компоненты, препятствующие фильтрации растворов после процесса культивирования.



Большой ассортимент сорбентов с различными характеристиками позволяет выбрать оптимальное решение для Вашей научной или производственной задачи.



Сорбенты для промышленной хроматографии:

- аффинная хроматография для моноклональных антител: Protein A, L, G на сефарозной и полимерной матрицах
- ионная хроматография: S/Q/DEAE/CM, солеустойчивые сорбенты с уникальными характеристиками
Размер частиц сорбента – от 10 до 100 мкм для всех стадий очистки (high resolution, intermediate purification, capture)
- HIC – широкий выбор сорбентов с различной гидрофобностью: Ether, PPG, Phenyl, Butyl, Hexyl
- гель-проникающая хроматография на сорбентах высокого разрешения, позволяющая работать на скоростях потока до 300 см/ч
- аффинная хроматография: металл-хелатная, активированные смолы, реактивированные, групп-специфичные сорбенты
- Mixed Mode – удобное решение для многих задач
- гидроксипатит
- обращенно-фазовые сорбенты на силикагельной и гибридной матрице с лигандами C18, C8, C4, Phenyl, C1
- нормально-фазовые сорбенты серии HG (High Grade)
- хиральные сорбенты для разделения энантиомеров



Написать
нам на почту

Будем рады обращению в нашу компанию!

fizlabpribor.ru +7(495)740-54-06, +7(495)740-54-30 info@fizlabpribor.ru

4.2.2.	Проблемы безопасности	203
4.2.3.	Условия эксплуатации.....	204
4.2.4.	Водные буферы.....	209
4.3.	Адсорбент и сочетание неподвижной и подвижной фаз	210
4.3.1.	Выбор подвижной и неподвижной фаз в зависимости от растворимости разделяемой смеси	211
4.3.2.	Повышение величины нагрузки на колонну при низкой растворимости разделяемой смеси.....	213
4.3.3.	Зависимость растворимости образца от его чистоты.....	215
4.3.4.	Градиенты общего вида для быстрого разделения	216
4.4.	Критерии выбора нормально-фазового режима	217
4.4.1.	Удерживание в НФХ.....	219
4.4.2.	Сила растворителя в жидкостной хроматографии на твердых сорбентах.....	221
4.4.3.	Контрольная методика тонкослойной хроматографии с использованием модели «ПРИЗМА»	224
4.4.3.1.	Этап (1): подгонка силы растворителя.....	230
4.4.3.2.	Этап (2): оптимизация селективности	231
4.4.3.3.	Этап (3): окончательная оптимизация силы элюента.....	232
4.4.3.4.	Этап (4): определение оптимального состава подвижной фазы.....	232
4.4.4.	Стратегия лаборатории промышленной препаративной хроматографии.....	233
4.4.4.1.	Стандартный метод градиентного элюирования на силикагеле	235
4.4.4.2.	Упрощенная методика	236
4.5.	Критерии выбора условий разделения в ОФ-режиме.....	238
4.5.1.	Удерживание и селективность в ОФХ.....	240
4.5.2.	Градиентное элюирование малых количеств продуктов в ОФХ.....	243
4.5.3.	Оптимизация изократических разделений.....	245
4.5.4.	Оптимизация градиентных разделений.....	248
4.5.5.	Практические рекомендации	252
4.6.	Критерии выбора условий для хиральных разделений	254
4.6.1.	Поиск ХНФ, пригодной для препаративного разделения	254
4.6.2.	Достижение необходимой энантиоселективности	255
4.6.3.	Оптимизация условий разделения	256
4.6.3.1.	Определение растворимости рацемата	256
4.6.3.2.	Выбор порядка элюирования	257
4.6.3.3.	Оптимизация состава подвижной фазы, в том числе с использованием изменения температуры.....	257
4.6.3.4.	Определение оптимального этапа для проведения разделения.....	257
4.6.4.	Практические рекомендации	258
4.7.	Последовательная обработка mAb с использованием сорбента с белком А и ИОХ.....	261
4.8.	Эксклюзионная хроматография (ЭХ)	267



Препаративная градиентная система JETchrom
со спектрофотометрическим детектором и коллектором фракций

ЖИДКОСТНЫЙ ПРЕПАРАТИВНЫЙ ХРОМАТОГРАФ JETCHROM

Жидкостные хроматографы **JETchrom** применяются как для качественного и количественного анализа сложных органических смесей (в аналитическом исполнении), так и для их препаративного разделения на компоненты и очистки (в препаративном исполнении).

- Масштабируемость (от аналитической до препаративной ВЭЖХ)
- Разнообразие детекторов
- Автоматизация
- Многовариантность комплектации
- Производство на территории России



4.9.	Общая оптимизация хроматографической системы	269
4.9.1.	Противоречия при оптимизации хроматографических систем	269
4.9.2.	Градиенты неподвижной фазы	272
	Литература	276

Глава 5. Методы разделения.....281

Мальте Касперайт и Хеннер Шмидт-Трауб

5.1.	Традиционные периодические разделения	281
5.1.1.	Изократический режим	281
5.1.2.	Градиентная хроматография	283
5.1.3.	Циркуляционная хроматография с замкнутым контуром.....	286
5.1.4.	Стационарная циркуляционная хроматография (СЦХ)	288
5.1.5.	Флип-флоп-хроматография	290
5.1.6.	Хроматографические реакторы периодического действия	291
5.2.	Непрерывные процессы.....	292
5.2.1.	Переключение колонн	293
5.2.2.	Радиальная хроматография.....	293
5.2.3.	Непрерывная противоточная хроматография с многоходовым краном для переключения колонн.....	294
5.2.4.	Изократическая хроматография с псевдодвижущимся слоем сорбента (SMB-хроматография).....	295
5.2.5.	SMB-хроматография с различными условиями разделения.....	300
5.2.5.1.	Система Varicol	300
5.2.5.2.	Система PowerFeed	301
5.2.5.3.	Схемы частичной подачи образца, частичной отбраковки целевой очищенной фракции и фракционирования с повторным вводом	302
5.2.5.4.	Усовершенствованный/с прерываниями SMB-процесс (ISMB).....	303
5.2.5.5.	Схема Modicon.....	305
5.2.5.6.	Фракционирование с повторным вводом.....	305
5.2.6.	Градиентная SMB-хроматография	305
5.2.7.	Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ)	307
5.2.7.1.	Сверхкритическая хроматография периодического действия	308
5.2.7.2.	Сверхкритическая хроматография в SMB-режиме.....	308
5.2.8.	Многокомпонентные разделения	309
5.2.9.	Многоколоночные системы для биоразделений.....	310
5.2.9.1.	Многоколоночная система хроматографического связывания, МСХС.....	311
5.2.9.2.	Многоколоночная противоточная очистка в градиенте растворителя (МПОГР)	318
5.2.10.	Противоточные хроматографические реакторы	321
5.2.10.1.	SMB-реактор.....	321
5.2.10.2.	SMB-реакторы с разнесением операций	322



ИЗДАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ТЕХНОСФЕРА»

КАК ЗАКАЗАТЬ НАШИ КНИГИ?

по почте: 125319, Москва, а/я 91

по факсу: (495) 956-3346

по e-mail: knigi@technosphere.ru

КАК ИЗДАТЬ СВОЮ КНИГУ

Издать книгу – это просто!

Если Вы хотите издать свою книгу или же только задумываетесь над тем, чтобы стать автором, мы поможем воплотить в реальность Ваши идеи.

Издание собственной книги позволит Вам:

- Защитить авторские права на рукопись.
- Отправить ее в Книжную палату Российской Федерации и основные государственные библиотеки.
- Подарить свою книгу друзьям и знакомым, использовать в качестве презентационных материалов.
- Реализовать Вашу книгу в книжных магазинах.

Издательство «ТЕХНОСФЕРА» – это простой и эффективный ответ на вопрос «Где издать книгу»

- «ТЕХНОСФЕРА» более 20 лет занимается издательской деятельностью. На нашем счету сотни успешно реализованных проектов по изданию книг различной тематики.
- Издательство «ТЕХНОСФЕРА» – это профессионалы, превращающие авторский текст в книгу. Мы знаем, как издать книгу, и поможем Вам в этом.
- Мы имеем многолетний опыт сотрудничества с крупнейшими книготорговыми компаниями. Это упрощает реализацию тиража.
- Мы предлагаем нашим авторам гибкие условия сотрудничества.

Издание книги – достаточно сложный процесс, но Вам нужно лишь сделать первый шаг – принести к нам Вашу рукопись. Все остальное сделают специалисты издательства «ТЕХНОСФЕРА».

Мы предоставим Вам полный пакет библиографических индексов (ББК, УДК, ISBN), который позволит распространить книгу на официальных условиях, попасть в библиотечные каталоги. Также книга будет проиндексирована в РИНЦ.

5.3.	Выбор методов разделения	324
5.3.1.	Масштаб.....	325
5.3.2.	Интервал значений k'	326
5.3.3.	Количество фракций.....	326
5.3.4.	Пример 1: лабораторный масштаб; две фракции.....	327
5.3.5.	Пример 2: лабораторный масштаб; три или более фракции	327
5.3.6.	Пример 3: промышленный масштаб; продукты с существенно различающимися значениями k'	329
5.3.7.	Пример 4: промышленный масштаб, две основные фракции	330
5.3.8.	Пример 5: промышленный масштаб, три фракции	331
5.3.9.	Пример 6: промышленный масштаб, многостадийный процесс.....	332
	Литература	334

Глава 6. Моделирование процессов хроматографического разделения.....342

Андреас Зайдель-Моргенштерн

6.1.	Введение.....	342
6.2.	Модели для одиночных хроматографических колонн.....	342
6.2.1.	Модели равновесных стадий	343
6.2.1.1.	Дискретная модель Крейга	344
6.2.1.2.	Непрерывная модель Мартина и Синга	348
6.2.2.	Вывод уравнений материального баланса для непрерывных моделей	349
6.2.2.1.	Уравнения материального баланса.....	351
6.2.2.2.	Массоперенос за счет конвекции.....	354
6.2.2.3.	Аксиальная дисперсия	354
6.2.2.4.	Диффузия внутрь частиц	354
6.2.2.5.	Массообмен между фазами	355
6.2.2.6.	Адсорбция и десорбция с конечными скоростями	356
6.2.2.7.	Адсорбционные равновесия	357
6.2.3.	Равновесная модель хроматографии.....	357
6.2.4.	Модели с одним параметром, описывающим уширение зоны	363
6.2.4.1.	Равновесная дисперсионная модель	364
6.2.4.2.	Модель конечной скорости адсорбции	365
6.2.5.	Непрерывные модели эффективных скоростей.....	366
6.2.5.1.	Транспортные дисперсионные модели.....	367
6.2.5.2.	Модель эффективной конечной скорости адсорбции.....	368
6.2.6.	Модели обобщенных скоростей.....	368
6.2.7.	Начальные и граничные условия для колонны	370
6.2.8.	Безразмерные уравнения, используемые при математическом моделировании.....	372
6.2.9.	Сравнение различных модельных подходов.....	373
6.3.	Включение в модели внеколоночных эффектов.....	379
6.3.1.	Принципиальная схема экспериментальной установки и ее моделирование	379
6.3.2.	Моделирование размывания во внеколоночных объемах хроматографического оборудования	381

6.3.2.1. Система инъекции/ввода	381
6.3.2.2. Трубопроводы	381
6.3.2.3. Детектор	381
6.4. Численные методы и программное обеспечение (ПО)	382
6.4.1. Аналитические решения	382
6.4.2. Численные методы решения	383
6.4.2.1. Дискретизация	383
6.4.2.2. Общий алгоритм решения и программное обеспечение	387
Литература	389
Глава 7. Определение параметров моделей	393
<i>Андреас Зайдель-Моргенштерн, Андреас Юнке и Хеннер Шмидт-Трауб</i>	
7.1. Классы параметров хроматографических разделений	393
7.1.1. Расчетные проектировочные параметры	393
7.1.2. Рабочие параметры	394
7.1.3. Параметры моделей	394
7.2. Метод определения параметров моделей	395
7.3. Детекторы и оценка параметров	398
7.3.1. Калибровка детекторов	399
7.3.2. Оценка параметров	400
7.3.3. Расчеты по хроматограммам	401
7.4. Определение параметров упакованного слоя	401
7.4.1. Мертвый объем колонны и пористость упакованного слоя	401
7.4.2. Аксиальная дисперсия	402
7.4.3. Падение давления	403
7.5. Изотермы адсорбции	403
7.5.1. Построение изотерм адсорбции	403
7.5.2. Расчет коэффициентов Генри	405
7.5.3. Статические методы построения изотерм	407
7.5.3.1. Метод адсорбции в объеме	408
7.5.3.2. Метод адсорбции-десорбции	408
7.5.3.3. Метод циркуляции	408
7.5.4. Динамические методы	409
7.5.5. Фронтальный анализ	409
7.5.6. Анализ размытых фронтов	415
7.5.7. Метод максимума пика	417
7.5.8. Метод отклонений/ малых возмущений	417
7.5.9. Аппроксимация хроматограмм кривыми	421
7.5.10. Анализ данных и точность	422
7.6. Кинетика массопереноса	423
7.6.1. Корреляции	424
7.6.2. Применение метода моментов	426
7.7. Параметры хроматографической установки	427
7.8. Экспериментальная валидация моделей упакованного слоя колонны и параметров моделей	429
7.8.1. Традиционная периодическая хроматография на одной колонне	429

7.8.2.	Хроматография с псевдодвижущимся слоем сорбента	432
7.8.2.1.	Построение моделей и параметры	432
7.8.2.2.	Экспериментальная валидация	438
	Литература	442

Глава 8. Разработка и оптимизация процесса разделения.....445

*Андреас Юнке, Андреас Бизелли, Мальте Касперайт, Мартин Лейпниц и
Хеннер Шмидт-Трауб*

8.1.	Основные принципы и определения	445
8.1.1.	Характеристики, затраты и целевые функции	445
8.1.1.1.	Технологические критерии	446
8.1.1.2.	Экономические критерии	448
8.1.1.3.	Целевые функции	449
8.1.2.	Степени свободы	450
8.1.2.1.	Категории параметров	450
8.1.2.2.	Безразмерные рабочие и проектные параметры	451
8.1.3.	Масштабирование с безразмерными параметрами	455
8.1.3.1.	Влияние различных значений НЕТР для каждого компонента	456
8.1.3.2.	Влияние концентрации сырья	457
8.1.3.3.	Примеры периодических разделений на одной колонне	458
8.1.3.4.	Примеры SMB-процессов	461
8.2.	Традиционные периодические разделения на одной колонне	462
8.2.1.	Режим фракционирования (стратегия ограничений)	462
8.2.2.	Проектирование и оптимизация колонн для периодических разделений	463
8.2.2.1.	Характеристики процесса, зависящие от числа стадий и фактора загрузки	463
8.2.2.2.	Стратегия проектирования и оптимизации	469
8.2.2.3.	Другие стратегии	472
8.3.	Циркуляционная хроматография	474
8.3.1.	Разработка метода разделения в стационарной циркуляционной хроматографии	474
8.3.2.	Масштабирование в циркуляционной хроматографии с замкнутым контуром (ЦХЗК)	477
8.4.	Обычная изократическая SMB-хроматография	482
8.4.1.	Соображения относительно оптимального профиля концентрации SMB-процесса	483
8.4.2.	Методы проектирования, основанные на TMB-моделях (упрощенные методы)	484
8.4.2.1.	Теория треугольника для идеальной модели с линейными изотермами	485
8.4.2.2.	Теория треугольника для идеальной модели и нелинейных изотерм адсорбции	487

8.4.2.3. Краткое руководство по применению теории треугольника для систем с неизвестными изотермами, предположительно принадлежащими к изотермам Ленгмюровского типа.....	489
8.4.3. Проектирование и оптимизация процессов, основанные на строгом моделировании	492
8.4.3.1. Оценка рабочих параметров	493
8.4.3.2. Оптимизация рабочих параметров для линейных изотерм, основанная на анализе процесса	494
8.4.3.3. Оптимизация рабочих параметров для нелинейных изотерм, основанная на понимании процесса	495
8.4.3.4. Оптимизация проектных параметров	498
8.5. Изократическая SMB-хроматография при изменяемых рабочих условиях	503
8.5.1. Сравнение характеристик системы Varicol и обычного SMB-разделения	504
8.5.2. Сравнение характеристик систем Varicol, PowerFeed и Modicon с обычным SMB-разделением	508
8.5.3. Тенденции изменения эффективности разделений в случае применения SMB-концепций с изменяемыми рабочими условиями	513
8.6. Градиентная SMB-хроматография	514
8.6.1. Ступенчатый градиент	514
8.6.2. Многоколоночная очистка в градиенте растворителя	520
8.7. Многоколоночные системы для биоразделений	525
8.7.1. Схема двухколоночного SMB-процесса селективного связывания	526
8.7.2. Моделирование многоколоночных систем хроматографического связывания (МСХС)	528
Литература	532
Глава 9. Управление процессом	539
<i>Себастьян Энгелл и Ахим Кинле</i>	
9.1. Стандартное управление процессом	540
9.2. Усовершенствованное управление процессом	540
9.2.1. Онлайн-оптимизация традиционной периодической хроматографии	541
9.2.2. Усовершенствованное управление в SMB-хроматографии	544
9.2.2.1. Контроль чистоты продуктов в SMB-процессах	545
9.2.2.2. Непосредственная оптимизация контроля чистоты продуктов в SMB-процессах	547
9.2.3. Усовершенствованный расчет параметров и оценка состояния SMB-процессов	552
9.2.4. Адаптивное регулирование от цикла к циклу	553
9.2.5. Управление сопряженными с SMB-процессами для получения очищенных энантиомеров	556
Литература	558

Глава 10. Хроматографическое оборудование: проектирование и эксплуатация ...562*Хеннер Шмидт-Грауб и Артур Сусанто*

10.1. Проблемы концептуального проектирования хроматографических процессов	563
10.1.1. Основные факторы, определяющие стоимость хроматографической системы	564
10.1.2. Разработка схемы разделения	566
10.1.2.1. Практический пример: крупномасштабный биотехнологический проект	567
10.2. Инженерные задачи	570
10.2.1. Задачи, связанные с выполнением санитарных норм	573
10.2.2. Вопросы, связанные с приемочными испытаниями и квалификацией оборудования	577
10.3. Коммерчески доступные хроматографические колонны	578
10.3.1. Общие параметры конструкции	580
10.3.1.1. Адаптер, перемещаемый вручную	580
10.3.1.2. Адаптер с электрическим или гидравлическим приводом	580
10.3.2. Колонны высокого и низкого давлений	581
10.3.2.1. Химическая совместимость	583
10.3.2.2. Устройство фильтра	583
10.3.2.3. Особые аспекты биоразделений	588
10.4. Коммерчески доступные хроматографические системы	590
10.4.1. Общие аспекты конструкции систем высокого и низкого давлений	590
10.4.2. Материалы	591
10.4.3. ЖХНД-системы для традиционных периодических разделений	592
10.4.3.1. Точки входа	592
10.4.3.2. Краны/клапаны для управления направлением потока	594
10.4.3.3. Насосы	595
10.4.3.4. Формирование градиента с помощью насосов и дозирующих клапанов	596
10.4.4. Традиционная ВЭЖХ периодического действия	597
10.4.4.1. Общие положения	597
10.4.4.2. Точки входа и выхода	599
10.4.4.3. Насосы	600
10.4.4.4. Насосы и трубопроводы	601
10.4.5. Системы непрерывного действия: SMB	604
10.4.5.1. Общие положения	604
10.4.5.2. Ключевой выбор: стратегия переработки	605
10.4.5.3. Насосы, входы и выходы из системы	605
10.4.5.4. Краны и трубопроводы	605
10.4.6. Вспомогательные системы	606
10.4.6.1. Резервуар для приготовления суспензии сорбента	606
10.4.6.2. Насосы для перекачивания суспензии и упаковочные станции	607
10.4.6.3. Подъемные и перемещающие механизмы	607

10.4.6.4. Проверка целостности фильтра.....	608
10.4.7. Детекторы	608
10.5. Методы упаковки	611
10.5.1. Выбор колонны и методологии упаковки	611
10.5.2. Приготовление суспензии	611
10.5.3. Подготовка колонны.....	614
10.5.4. Упаковка потоком	614
10.5.5. Упаковка с помощью динамической аксиальной компрессии (ДАК)	617
10.5.6. Упаковка в заранее фиксированном объеме	618
10.5.7. Комбинированный метод: (упаковка в заранее фиксированном объеме + ДАК).....	618
10.5.8. Упаковка с помощью вакуума	620
10.5.9. Упаковка с помощью вибрации.....	621
10.5.10. Уравновешивание колонны	622
10.5.11. Тестирование и хранение колонны	623
10.5.11.1. Тестовые системы.....	623
10.5.11.2. Гидродинамические свойства и эффективность колонны	624
10.5.11.3. Хранение колонны и адсорбента	625
10.6. Устранение неисправностей	625
10.6.1. Технические сбои	626
10.6.2. Потеря производительности.....	626
10.6.2.1. Повышение давления	626
10.6.2.2. Падение эффективности хроматографической колонны.....	630
10.6.2.3. Изменение профиля элюирования	631
10.6.2.4. Потеря чистоты/ выхода целевого продукта	632
10.6.3. Стабильность колонны	633
10.7. Одноразовая технология для биоразделений	634
10.7.1. Предупакованные колонки	636
10.7.2. Мембранная хроматография	638
Литература	640
Приложение. Данные, характеризующие разделения тестовых образцов.....	642
А.1. EMD53986	642
А.2. Основание Трегера	644
А.3. Глюкоза и фруктоза	645
А.4. β-фенетилацетат	647
Литература	648
Предметный указатель	655

Предисловие авторов

За семь лет, которые прошли со времени второго издания этой книги, и практика, и теория препаративной хроматографии ушли далеко вперед. Это побудило нас подготовить третье издание.

Появились новые материалы, послужившие основой для создания неподвижных фаз, в особенности для разделения больших биомолекул, и расширившие возможности разработки методов. Хотя основы хроматографии со времени второго издания не изменились, в последнее время проведены более подробные исследования для того, чтобы улучшить количественную оценку многокомпонентных равновесий. Например, с помощью применения теории идеального адсорбционного раствора (ИАР)* была расширена вдохновляющая концепция псевдодвижущегося слоя сорбента (ПСС)**. В настоящее время доступны многоколоночные процессы, соединяющие определенное количество отдельных колонок почти произвольным образом. Основной движущей силой этих разработок была биотехнология. В этой области необходимость повышения выхода продукта, замены разделений с периодическим вводом образца, являвшихся узким местом в ходе выделения, и снижения высоких затрат, связанных с использованием некоторых специальных неподвижных фаз, способствовала разработке новых и более эффективных хроматографических процессов с непрерывным вводом образца. В книге обобщены недавние достижения в части оптимизации правил и методов проектирования и эксплуатации хроматографического оборудования. Кроме того, благодаря сотрудничеству инженеров-технологов и математиков были разработаны и могут быть применены к широкому кругу задач более быстрые и более эффективные алгоритмы моделирования и особенно оптимизации хроматографических процессов. Для проведения хроматографических процессов в оптимальном режиме доступны современные системы управления процессом. Однако, если судить по открытой литературе, создается впечатление, что на практике все эти достижения не находят достаточно широкого применения. Поэтому мы надеемся, что глава, посвященная этим вопросам, будет мотивировать хроматографистов-практиков повнимательнее взглянуть на эти многообещающие методы.

В этой книге мы рассматриваем препаративную хроматографию и решаемые ей задачи с точки зрения как химиков, так и инженеров-технологов, чтобы улучшить взаимопонимание и передачу знаний между обеими дисциплинами. Кроме того, мы хотим достучаться до коллег, работающих в промышленности, а также ученых, заинтересованных в препаративных хроматографических разделениях. Мы надеемся, что студенты и другие читатели, начинающие заниматься препаративной хроматографией, найдут в этой книге подробную информацию о процессе препаративной хроматографии, о том, как он устроен и как им управлять. Всем тем, кто собирается иметь дело с хроматографией, мы хотим сказать, что она в настоящее время достаточно хорошо изучена и не так дорогостояща и сложна, как это часто утверждается и представляется. С другой стороны, освоение хроматографии требует определенных усилий, а сам метод не может, конечно, решить всех проблем, связанных с разделением.

* Англ. Ideal Adsorption Solution (IAS). (Прим. перев.)

** Англ. SMB – simulated moving bed. (Прим. перев.)

Рейнхард Дитц, Себастиан Энгель, Андреас Юпке, Мальте Касперайт и Артур Сусанто — авторы, которые принимали участие в прошлых изданиях этой книги и вновь присоединились к нашей команде. Новые авторы — Андреас Бизелли, Ахим Кинле и Мартин Лейпниц. Мы благодарны им за их вклад. Нам известно, что делали они эту работу в дополнение к своей повседневной, и мы просим у них прощения за то, что иногда заставляли их нервничать, требуя уложиться в срок. Кроме того, мы хотим сказать спасибо Матиасу Этмански за то, что он сделал новые рисунки, устранил опечатки, проявил терпение и справился с работой по всем изменениям в настоящем издании. Поддержка сотрудников издательства была очень существенной. Они устранили (мы надеемся, что все) опечатки и создали превосходный макет книги. И последнее, но немаловажное: мы благодарим наши семьи и друзей за их терпение и поддержку, которые были необходимы для того, чтобы эта книга вышла из печати.

Ноябрь 2019

Хеннер Шмидт-Трауб

Михаэль Шульте

Андреас Зайдель-Моргенштерн

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ПЕРЕВОДУ ТРЕТЬЕГО ИЗДАНИЯ «ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ»

Первое издание этой книги под редакцией проф. Хеннера Шмидта-Трауба было опубликовано в 2005 г. В него вошли многие результаты, полученные в группе исследователей под руководством проф. Шмидта-Трауба в Техническом университете Дортмунда, Германия. Книга имела большой успех, и в 2012 г. под редакцией доктора Михаэля Шульте и профессора Андреаса Зайделя-Моргенштерна было подготовлено второе переработанное и расширенное издание этой книги. Последнее существенно расширенное третье издание было завершено в 2020 г. за несколько месяцев до кончины профессора Шмидта-Трауба, ушедшего от нас в возрасте 80 лет.

Книга рассчитана на коллег-хроматографистов, занятых в промышленности и в академических исследованиях, интересующихся препаративными separations как с точки зрения химии процесса, так и с точки зрения его инженерного оформления. Расширение возможностей препаративных хроматографических разделений невозможно без объединения знаний, накопленных в этих двух областях. Надеемся, что книга пригодится также студентам, изучающим проектирование и эксплуатацию установок препаративной хроматографии. Мы убеждены, что в настоящее время препаративная хроматография достаточно хорошо изучена и не осложнена столь существенными трудностями и расходами, как это часто предполагается и утверждается. Тем не менее ее применение по-прежнему ограничено целым рядом условий и этот метод не позволяет решить все проблемы разделения компонентов смесей.

Все авторы, участвовавшие в написании глав этой книги, гордятся тем, что она переведена на русский язык. Профессору Шмидту-Траубу было бы приятно убедиться в том, что наша книга имеет международное признание.

22 декабря 2021 г.

Доктор Михаэль Шульте (Дармштадт)

Профессор Андреас Зайдель-Моргенштерн (Магдебург)

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТРОВ РУССКОГО ПЕРЕВОДА

К сожалению, когда речь заходит о книгах по препаративной хроматографии, нам похвастаться нечем. Таких книг, которые можно было бы дать в руки и студенту, и начинающему специалисту, и тому, кто уже работает в этой области, у нас, увы, не написано. Правду говоря, и область эта у нас по размерам не очень велика — больше на район похожа. Тридцать два года назад, еще в Советском Союзе, был издан перевод профессора О. Г. Ларионова книги «Препаративная жидкостная хроматография» Б. Бидлингеймера, Б. Фрайда, Г. Хегнауера и др. под редакцией Б. Бидлингеймера. Перевод этой книги не столько дополнил имеющуюся у нас к тому моменту литературу по препаративной хроматографии, сколько закрыл огромную брешь, которая в ней существовала.

Перед вами перевод третьего издания книги «Препаративная хроматография», вышедшей в 2020 г. под редакцией других авторов — Хеннера Шмидта-Трауба, Михаэля Шульте и Андреаса Зайделя-Моргенштерна. Две этих книги довольно сильно отличаются, как отличается сегодняшний день препаративной хроматографии от того, что был тридцать с лишним лет назад. Если в первой книге много места уделено применению препаративной хроматографии в различных областях химии, препаративной ситовой и тонкослойной хроматографиям, то в современной книге внимание сосредоточено на препаративной жидкостной колоночной хроматографии в ее промышленном варианте, на выборе хроматографических систем, современных методов и условий разделения, на моделях и моделировании процессов хроматографического разделения, определении параметров этих моделей. Отдельные главы посвящены разработке и оптимизации процесса разделения, а также управлению процессом разделения. Что касается хроматографических систем, то самым подробным образом рассмотрены не только традиционные системы периодического действия, но и широко используемые на современных фармацевтических предприятиях промышленные хроматографические SMB- и MCSGP-системы. Непрерывные процессы хроматографического разделения уже с успехом применяются в промышленности и являются доминантой развития препаративной хроматографии не только в крупномасштабных разделениях, но и для эффективного выделения примесей.

Сделан большой обзор неподвижных фаз, используемых в препаративной хроматографии, и описаны различные методы их упаковки. В последней главе книги рассматривается хроматографическое оборудование — его проектирование и эксплуатация. Речь идет о промышленных установках, используемых, как правило, для производства активных фармацевтических субстанций. Приведены примеры крупномасштабных биотехнологических проектов, описаны конструкции и компоненты препаративных и промышленных хроматографических колонн, насосов, детекторов, трубопроводов, даны рекомендации по проектированию систем высокого и низкого давлений как периодического, так и непрерывного действий. Эта глава будет полезна всем тем, кто так или иначе связан с проектированием промышленных хроматографических установок. Завершая обзор содержания «Препаративной хроматографии», редакторы хотели бы выразить благодарность всем, кто помог им в этом процессе.

ративной хроматографии», можно, наверное, сказать, что эта книга ориентирована на завтрашний день российской хроматографии, к которому мы должны готовиться уже сегодня.

Переводчики благодарят за плодотворное сотрудничество и помощь во время работы над переводом книги профессора Зайделя-Моргенштерна и к.х.н. Л. Д. Аснина.

к.т.н. М.Б. Бару
И.В. Важенина
д.х.н. С.М. Староверов

Об авторах

Хеннер Шмидт-Трауб был профессором по специальности «Проектирование процессов и установок» в отделе биохимического и химического машиностроения Технического университета Дортмунда в Германии до выхода в отставку в 2005 году. Область его интересов — препаративная хроматография, последовательная обработка исходного сырья, проектирование хроматографических установок. До начала академической карьеры профессор Шмидт-Трауб имел 15-летний опыт конструирования промышленных установок.

Михаэль Шульте возглавляет отдел исследований и разработки процессов очистки фирмы «Мерк» (Merck KGaA Life Sciences) в Дармштадте (Германия). В своей диссертационной работе в университете г. Мюнстер (Германия) он разработал новые хиральные неподвижные фазы для разделений энантиомеров. С 1995 г. он работает в компании «Мерк» и с тех пор руководит исследованиями и проектно-конструкторскими работами в области препаративной хроматографии, включающими разработку новых неподвижных фаз, новых процессов разделения и внедрение SMB-технологий.

Андреас Зайдель-Моргенштерн является директором Института динамики сложных технических систем имени Макса Планка в Магдебурге (Германия) и руководит отделом химико-технологического машиностроения Магдебургского университета имени Отто фон Герике (Германия). Он получил степень доктора наук в Институте физической химии Академии наук в Берлине в 1987 г. В 1991 и 1992 годах занимался исследованиями в статусе постдока в университете Теннесси. В 1994 г. закончил подготовку к научной деятельности в Техническом университете Берлина. В настоящее время его деятельность сосредоточена на разработке методов разделения, основанных на хроматографии и кристаллизации, и новых типов реакторов.

Перечень принятых сокращений

СОКРАЩЕНИЕ	РАСШИФРОВКА
АФИ	активный фармацевтический ингредиент (фармацевтическая субстанция, ФС)
АХИМ	аффинная хроматография на сорбентах с иммобилизованными металлами (immobilized-metal affinity chromatography, IMAC) или металл-аффинная хроматография
АФХ	аффинная хроматография
БЭТ метод	метод Брунауэра – Эмметта – Теллера для определения удельной площади поверхности адсорбента, среднего диаметра пор и распределения пор по размеру
ВОВ	высокоочищенная вода (highly purified water, HPW)
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография (high performance liquid chromatography, HPLC)
ГПХ	гель-проникающая хроматография
ГИХ	хроматография гидрофильных взаимодействий
ГХ	газовая хроматография
ДАК	динамическая аксиальная компрессия
ДВБ	дивинилбензол
ДМД	диодно-матричный УФ-детектор (или детектор с фотодиодной матрицей; diode-array detector, DAD)
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФА	диметилформамид
ДУЧП	дифференциальные уравнения в частных производных
ЖХ	жидкостная хроматография
ЖХ-МС	жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
ЖХНД	жидкостная хроматография низких давлений (low-pressure liquid chromatography, LPLC)
ИК	инфракрасный (область спектра)
ИКФП	инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR)
ИОХ	ионообменная хроматография (ion-exchange chromatography, IEC)
КД	спектроскопия кругового дихроизма
КК	контроль качества (quality control, QC)
КЛСМ	конфокальная лазерная сканирующая спектроскопия (confocal laser scanning microscopy, CLSM)

СОКРАЩЕНИЕ	РАСШИФРОВКА
КЭФ	капиллярный электрофорез (capillary electrophoresis, CE)
КЭХ	капиллярная электрохроматография (capillary electrochromatography, CEC)
МД	молекулярная динамика (molecular dynamics, MD)
МКР	метод конечных разностей (finite difference methods, FDM)
МНОГР	многоколоночный непрерывный процесс очистки в градиенте растворителя (multicolumn continuous solvent gradient purification, MCSGP)
МОС	модель обобщенных скоростей (general rate model, GRM)
МПОГР	многоколоночная противоточная очистка в градиенте растворителя (multicolumn countercurrent solvent gradient purification, MCSGP)
МРК	метод разбавления на колонне
МС	масс-спектропия
МСХС	многоколоночная система хроматографического связывания (multicolumn capture chromatography, MCC)
НПД	нижний предел детектирования
НПКО	нижний предел количественного определения
НФХ	нормально-фазовая хроматография (normal-phase chromatography, NPC)
ОДУ	обыкновенные дифференциальные уравнения
ОККЭ	ортогональная коллокация на конечных элементах (orthogonal collocations on finite elements, OCFE)
ОФХ	обращенно-фазовая хроматография (reversed-phase chromatography, RPC)
ПМХ	последовательная многоколоночная хроматография (sequential multicolumn chromatography, SMCC)
ПП	показатель преломления
ПС-ДВБ	полистирол-дивинилбензол
ПХПД	противоточная хроматография периодического действия (periodic countercurrent chromatography, PCC)
ПЭМ	просвечивающая электронная спектроскопия (transmission electron microscopy, TEM)
ПЭЭК	полиэфирэфиркетон (PEEK)
рафинат	менее удерживаемый компонент разделяемой смеси (raffinate)
РНС	резервуар с непрерывным смешением
РСА	рентгеноструктурный анализ
СОП	стандартная операционная процедура

СОКРАЩЕНИЕ	РАСШИФРОВКА
СФХ	сверхкритическая флюидная хроматография (supercritical fluid chromatography, SFC)
СЦХ	стационарная циркуляционная хроматография (steady-state recycling chromatography, SSRC)
СЭМ	сканирующий электронный микроскоп
ТАП	технология анализа процессов (process analytical technology, PAT)
ТГФ	тетрагидрофуран
ТДМ	транспортная дисперсионная модель (transport dispersive model, TDM)
ТИАР	теория идеального адсорбционного раствора (ideal adsorption solution (IAS) theory)
ТСХ	тонкослойная хроматография
ТФУК	трифторуксусная кислота
УВЭЖХ	ультравысокоэффективная жидкостная хроматография (ultrahigh-performance liquid chromatography, UPLC)
УФ	ультрафиолетовый (область спектра или детектор, регистрирующий поглощение в этой области)
ФАХТ	фронтальный анализ в характеристических точках (frontal analysis by characteristic points, FACP)
ХГВ	хроматография гидрофобных взаимодействий (hydrophobic interaction chromatography, HIC)
ХНФ	хиральные неподвижные фазы (chiral stationary phases, CSP)
ЦХЗК	циркуляционная хроматография с замкнутым контуром (closed-loop recycling chromatography, CLRC)
экстракт	более удерживаемый компонент разделяемой смеси (extract)
ЭХ	эксклюзионная хроматография (size-exclusion chromatography, SEC) или гель-фильтрационная хроматография ГФХ
ЭХТ	элюирование в характеристических точках (elution by characteristic points, ECP)
ЯМР	ядерный магнитный резонанс (nuclear magnetic resonance, NMR)

AAV	аденоассоциированный вирус (adeno-associated virus)
АЕХ	анионообменный
cGMP	современная надлежащая производственная практика (current good manufacturing practice, cGMP)
CIP	очистка адсорбента без выгрузки из колонны для удаления адсорбированных примесей (cleaning in place)

СОКРАЩЕНИЕ	РАСШИФРОВКА
CPG	стекло с контролируемым размером пор (controlled pore glass)
CSEP	хроматографическое сепарирование (chromatographic separation)
СТА	триацетат целлюлозы
СТВ	трибензоат целлюлозы
CV	объем, равный объему упакованной колонны (column volume)
EC	потребление элюента (eluent consumption)
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США (US Food and Drug Administration)
FF-SMB	SMB-фракционирование с повторным вводом (fractionation and feedback SMB)
FFSQP algorithm	алгоритм последовательного квадратичного программирования на Фортране (Fortran Feasible Sequential Quadratic Programming)
FFT	тест прямого потока (forward flow test)
GMP	надлежащая производственная практика (good manufacturing practice)
НЕТР	высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ (height of an equivalent theoretical plate)
ICH	Международный совет по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком, США (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals in Human Use)
ISEC	хроматографическая порометрия (inverse size-exclusion chromatography)
ISEP	ионное сепарирование (ion-exchange separation)
iSMB	усовершенствованный / с прерываниями SMB-процесс (improved SMB)
LGE	линейное градиентное элюирование (linear gradient elution)
mAbs	моноклональные антитела (monoclonal antibodies)
MPC	структура управления, базирующаяся на сравнении с данными прогнозирующей модели (model predictive control)
NMPC	управление в соответствии с нелинейной прогнозирующей моделью (nonlinear model predictive control)
NSGA	многокритериальный генетический алгоритм (nondominated sorting genetic algorithm)
PDT	тест на падение давления (pressure decay test)
PES	полиэфирсульфон

СОКРАЩЕНИЕ	РАСШИФРОВКА
RAM	адсорбенты с ограниченно доступной поверхностью (restricted access materials)
RMPC	периодическая проверка прогнозирующей моделью (repetitive model predictive control)
S/N	отношение сигнал/шум (signal-to-noise ratio)
SIP	стерилизация адсорбента без выгрузки из колонны (sanitization in place); также очистка резервуаров и транспортных линий установки паром (steam cleaning in place)
SMB	псевдодвижущийся слой сорбента, ПСС (simulated moving bed)
TMB	истиннодвижущийся слой сорбента (true moving bed)
TPX TM	прозрачный полиметилпентен
USP	Фармакопея США (United States Pharmacopoeia)
VSP	удельная производительность, отнесенная к полному объему твердого адсорбента (volume-specific productivity)
WIT	тест на водопроницаемость (water intrusion test)

Латинские условные обозначения

Обозначение	Описание	Единицы измерения
a	коэффициент уравнения изотермы Ленгмюра	$\text{см}^3\text{г}^{-1}$
a_s	удельная площадь поверхности	$\text{см}^2\text{г}^{-1}$
A	площадь	см^2
A_c	площадь поперечного сечения колонны	см^2
A	коэффициент уравнения ван Деемтера	см
A_s	площадь поверхности адсорбента	см^2
ASP	удельная производительность, отнесенная к поперечному сечению	$\text{г см}^{-2}\text{с}^{-2}$
b	коэффициент уравнения изотермы Ленгмюра	$\text{см}^3\text{г}^{-1}$
B	проницаемость колонки	м^2
B	коэффициент уравнения ван Деемтера	$\text{см}^2\text{с}^{-1}$
c	концентрация разделяемого вещества в подвижной фазе	г см^{-3}
c_p	концентрация разделяемого вещества в подвижной фазе внутри пор адсорбента	г см^{-3}
C	годовые расходы	евро
C	коэффициент уравнения ван Деемтера	с

Обозначение	Описание	Единицы измерения
C_{DL}	безразмерная концентрация в подвижной фазе	—
$C_{p,DL}$	безразмерная концентрация разделяемого вещества в подвижной фазе внутри пор	—
C_{spec}	отношение стоимости разделения к количеству полученного продукта	евро г ⁻¹
D_c	диаметр колонны	см
d_p	средний диаметр частиц адсорбента	мкм
d_{pore}	средний диаметр пор адсорбента	нм
D_{an}	коэффициент угловой дисперсии	см ² с ⁻¹
D_{app}	кажущийся коэффициент диффузии	см ² с ⁻¹
$D_{app,pore}$	кажущийся коэффициент диффузии, описывающий и поверхностную диффузию, и диффузию в порах	см ² с ⁻¹
D_{ax}	коэффициент аксиальной дисперсии	см ² с ⁻¹
D_m	коэффициент молекулярной диффузии	см ² с ⁻¹
D_{pore}	коэффициент диффузии в порах	см ² с ⁻¹
D_{solid}	коэффициент поверхностной диффузии	см ² с ⁻¹
EC	потребление элюента	см ³ с ⁻¹
f_i	цена (элюента, адсорбента или сырья)	евро л ⁻¹ , евро г ⁻¹
f	летучесть	—
h	приведенная высота теоретической тарелки	—
Δh_{vap}	теплота испарения	КДж моль ⁻¹
H	коэффициент (константа) Генри	—
H_p	горизонт прогнозирования	—
H_r	граничное условие для чистоты продукта в прогнозируемых условиях	—
$HETP$	высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)	см
k_{ads}	константа скорости адсорбции	см ³ г ⁻¹ с ⁻¹
k_{des}	константа скорости десорбции	см ³ г ⁻¹ с ⁻¹
k_{eff}	обобщенный коэффициент массопереноса	см ² с ⁻¹
K_{eq}	константа равновесия	различные
k_{film}	коэффициент массопереноса в пленочном слое на границе частиц адсорбента и подвижной фазы	см с ⁻¹
k'_i	коэффициент емкости, в настоящее время называемый в российской литературе по хроматографии фактором удерживания k	—

Обозначение	Описание	Единицы измерения
k_0	коэффициент перепада давления	—
$k_{\text{реac}}$	константа скорости реакции	различные
LF	фактор загрузки	—
L_c	длина колонны	см
	поток массы очищенного продукта (или производительность)	г с ⁻¹
m	масса	г
m_j	безразмерная объемная скорость массы продукта в секции j	—
m_s	суммарная масса	г
n_T	связность пор	—
N	число теоретических тарелок (ЧТТ), характеризующее эффективность колонны	—
N_{col}	число колонн	—
N_{comp}	число компонентов	—
N_p	число частиц адсорбента в элементе объема	—
Δp	перепад давления	Па
Pe	число Пекле	—
Pr	производительность	г см ⁻³ час ⁻¹
P_s	точка селективности	—
Pu	чистота	%
q	нагрузка адсорбента (неподвижной фазы)	г см ⁻³
q^*	полная нагрузка	г см ⁻³
$\bar{q}_i^*$	усредненная нагрузка на частицы адсорбента	г см ⁻³
q_{sat}	нагрузочная (предельная) емкость адсорбента	г см ⁻³
Q_{DL}	безразмерная концентрация в неподвижной фазе	—
r	радиальная координата	см
r	скорость реакции	различные
r_p	радиус (размер) частиц адсорбента	мкм
R_f	коэффициент задержки в ТСХ (в российской научной литературе: подвижность)	—
R_s	разрешение	—
Re	число Рейнольдса	—
S_{BET}	удельная площадь поверхности	м ² г ⁻¹
Sc	число Шмидта	—

Обозначение	Описание	Единицы измерения
Sh	число Шервуда	—
St	число Стентона	—
t	время	с
t_0	мертвое время колонны	с
$t_{0,e}$	время удерживания неудерживаемого компонента (определяемое внешней пористостью)	с
$t_{0,t}$	время удерживания неудерживаемого компонента (определяемое общей пористостью)	с
t_{cycle}	время цикла (в SMB-разделении)	с
t_g	время градиента	с
t_{inj}	время инъекции	с
t_{life}	срок службы адсорбента	час
t_{plant}	приборное время задержки (внеколоночное)	с
t_R	время удерживания	с
$t_{R,net}$	суммарное время удерживания	с
t_{shift}	время между переключениями колонн в SMB-установке	с
t_{tank}	мертвое время резервуара с перемешиванием	с
t_{pipe}	мертвое время трубопровода	с
t_{Rmax}	максимальное время удерживания	с
t_{Rmean}	усредненное время удерживания, соответствующее первому статистическому моменту	с
t_{Rshock}	время удерживания ударного фронта	с
T	температура	К
T	степень асимметрии пика	—
u_0	линейная скорость потока в колонне, не заполненной адсорбентом	см с ⁻¹
$u_{int,e}$	интерстициальная линейная скорость потока между частицами упакованного адсорбента	см с ⁻¹
$u_{int,t}^{hypo}$	гипотетическая эффективная линейная скорость подвижной фазы	см с ⁻¹
u_m	эффективная линейная скорость (общая линейная скорость подвижной фазы)	см с ⁻¹
v_{sp}	удельный объем пор	см ³ г ⁻¹
V	объем	см ³
$\dot{V}$	объемная скорость потока (подвижной фазы)	см ³ с ⁻¹
V_{ads}	объем неподвижной фазы в колонне	см ³

Обозначение	Описание	Единицы измерения
V_c	общий объем упакованного слоя колонны	см ³
V_i	молярный объем	см ³ моль ⁻¹
V_{int}	интерстициальный объем подвижной фазы между частицами адсорбента или доля колонны, заполненная подвижной фазой	см ³
V_m	общий объем подвижной фазы	см ³
V_{pore}	объем пор адсорбента	см ³
V_{solid}	объем твердого адсорбента	см ³
VSP	удельная производительность, отнесенная к полному объему твердого адсорбента	г см ⁻³ с ⁻¹
w_i	скорость распространения	см с ⁻¹
x	координата	см
x	фракция	—
X	степень превращения	%
X_{cat}	доля катализатора в адсорбенте	—
Y	выход продукта	%
Z	безразмерное расстояние	—

Греческие условные обозначения

Обозначение	Описание	Единицы измерения
α	селективность	—
α_{exp}	плотность прививки лигандов	мкмоль м ²
β	модифицированная безразмерная скорость потока массы	—
γ	коэффициент, учитывающий нерегулярность упакованного слоя, препятствующую диффузии и сокращающую внешнюю пористость	—
Γ	целевая функция	—
ε	доля упакованного слоя колонны, заполненная подвижной фазой	—
ε^0	параметр силы растворителя	—
ε_e	внешняя (интерстициальная) пористость	—
ε_p	пористость твердой фазы (адсорбента)	—
ε_t	общая пористость упакованного слоя	—

Обозначение	Описание	Единицы измерения
η	динамическая вязкость	мПа с
Θ	угол вращения	°
Λ	общая ионообменная емкость	мМ
λ	характеристический фактор упакованного слоя колонны: поправка на дефекты упаковки	—
μ	химический потенциал	Дж моль ⁻¹
μ_k	момент распределения k-го порядка	—
ν	кинематическая вязкость	см ² с ⁻¹
ν_i	стехиометрический коэффициент	—
π	поверхностное давление	Па
ρ	плотность	г см ⁻³
σ	параметр стерического экранирования	—
σ_t	стандартное (среднеквадратическое) отклонение	—
τ	безразмерное время	—
ϕ	изменяемая переменная	—
ϕ	доля упакованного слоя, заполненная подвижной фазой	—
ψ	коэффициент трения	—
$\Psi_{ads/des}$	скорость стадий адсорбции и десорбции	г см ⁻³ с ⁻¹
ω_j	характеристический коэффициент в равновесной теории	—
ω	скорость вращения	° с ⁻¹
$\Theta_{\chi\psi\chi}$	время цикла	с

Индексы буквенных обозначений

Индекс	Описание
1, 2	компонент 1 / компонент 2
I, II, III, IV	секции в SMB- и TMB-процессах
acc	накопление (accumulation)
ads	адсорбент (adsorbent)
c	колонна (column)
cat	катализатор (catalyst)
conv	конвекция (convection)
crude	потери сырья (crude loss)
des	элюент для десорбции (desorbent)

Индекс	Описание
diff	диффузия (diffusion)
disp	дисперсия (dispersion)
DL	безразмерный (dimensionless)
eff	эффективный (effective)
el	элюент (eluent)
exp	экспериментальный (experimental)
ext	экстракт (extract)
feed	сырье (feed)
het	гетерогенный (heterogeneous)
hom	гомогенный (homogeneous)
i	компонент i
in	входящий (inlet)
inj	инжекция, ввод; инжектированный, введенный (injection)
j	секция j в SMB- или TMB-процессе
l	жидкий (liquid)
lin	линейный (linear)
max	максимальный (maximum)
min	минимальный (minimum)
mob	подвижная фаза (mobile phase)
mt	массоперенос (mass transfer)
opt	оптимальный (optimal)
out	выходящий (outlet)
p	частица адсорбента (particle)
pore	пора (pore)
pipe	трубопровод в ВЭЖХ-установке (pipe)
plant	хроматографическая установка без колонны (plant)
prod	продукт (product)
raf	рафинат (raffinate)
reac	реакция (reaction)
rec	рециклы (recycles)
s	твердый (solid)
sat	насыщение (saturation)
sec	секция (section)
shock	ударный фронт (shock front)

Индекс	Описание
SMB	относящийся к процессу с псевдодвижущимся слоем сорбента
solid	твердый (solid)
spec	удельный (specific)
stat	неподвижная фаза (stationary phase)
tank	резервуар, емкость (tank)
theo	теоретический (theoretical)
TMB	относящийся к процессу с истиннодвижущимся слоем сорбента

Определения безразмерных параметров

Число Пекле	$Pe = \frac{u_{int} L_c}{D_{ax}}$	Соотношение между переносом за счет конвекции и за счет дисперсии (в упакованном слое адсорбента)
Число Пекле для частиц	$Pe = \frac{u_{int} d_p}{D_{ax}}$	Соотношение между переносом за счет конвекции и за счет дисперсии (в частицах адсорбента)
Число Пекле для установки	$Pe = \frac{u_{int} L_{plant}}{D_{ax, plant}}$	Соотношение между переносом за счет конвекции и за счет дисперсии (в хроматографической установке без колонны)
Число Рейнольдса	$Re = \frac{u_{int} d_p \rho_l}{\eta_l}$	Отношение инерционных сил к силам вязкого трения
Число Шмидта	$Sc = \frac{\eta_l}{\rho_l D_m}$	Отношение коэффициента кинематической вязкости к коэффициенту диффузии вещества
Число Шервуда	$Sh = \frac{k_{film} d_p}{D_m}$	Соотношение массообмена за счет конвекции и за счет молекулярной диффузии
Число Стентона (модифицированное)	$St_{eff,i} = k_{eff,i} \cdot \frac{6}{d_p} \cdot \frac{L_c}{u_{int}}$	Соотношение массопереноса и конвекции

Глава I

Введение

Хеннер Шмидт-Трауб¹ и Рейнхард Дитц²

¹ TU Dortmund Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen, Lehrstuhl für Anlagen- und Prozesstechnik, Emil-Figge-Str. 70, 44227 Dortmund, Germany

² Bristenstrasse 16, CH 8048 Zürich, Switzerland

I.1. Хроматография и тенденции ее развития

Дети любят капать чернилами на промокашки, чтобы с интересом наблюдать за тем, как расцветает радуга. Это и есть хроматография, впервые описанная М.С. Цветом в 1906 году, которую он тремя годами ранее* применил для разделения пигментов хлорофилла [4]. Прошло более ста лет, но детям все так же интересно капать чернила на промокашки и наблюдать то, что в результате получается.**

Хроматография превратилась в важный метод анализа и производства продуктов высокой чистоты в микро- и макромасштабах. Сегодня производство фармацевтических препаратов немыслимо без хроматографии.

Впервые жидкостная хроматография (ЖХ) была использована в качестве инструмента для очистки, а значит, и как препаративный метод. Это единственный метод, позволяющий разделить и идентифицировать фемтомоли вещества из сложных биологических матриц, а также выделить тонны очищенных синтетических продуктов в промышленности. На рис. 1.1 показано, как развивалась хроматография, и обозначены тенденции ее развития.

В 1960-х годах, когда стали доступны неподвижные фазы с высокой селективностью, появилась аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В то же время благодаря инженерным разработкам, направленным на поиск более эффективных технологий очистки, были созданы условия для развития препаративной хроматографии. Принцип увеличения скорости массопереноса противотоком в сочетании с высокой селективностью ВЭЖХ повысил эффективность препаративной хроматографии с точки зрения производительности, экономии элюентов, выхода и концентрации раствора очищенного целевого вещества. Первым процессом такого рода была хроматография с псевдодвижущимся слоем сорбента

* На самом деле хроматографический метод был впервые применен М.С. Цветом еще раньше — в 1900 г., а в 1903 г. была опубликована первая печатная работа по хроматографии. Сам же термин «хроматография» появился в двух работах Цвета уже в 1906 г. Простим немецким авторам книги то, что они не читали первой печатной работы Цвета в журнале «Труды Варшавского общества естествоиспытателей». Для них хроматография началась с немецкого журнала *Berichteder Deutschen Botanischen Gesellschaft*, в котором в 1906 году Цвет опубликовал две статьи с описанием открытого им метода. (Прим. перев.)

** При условии, что нынешние дети знают, где найти чернила и промокашки. (Прим. перев.)

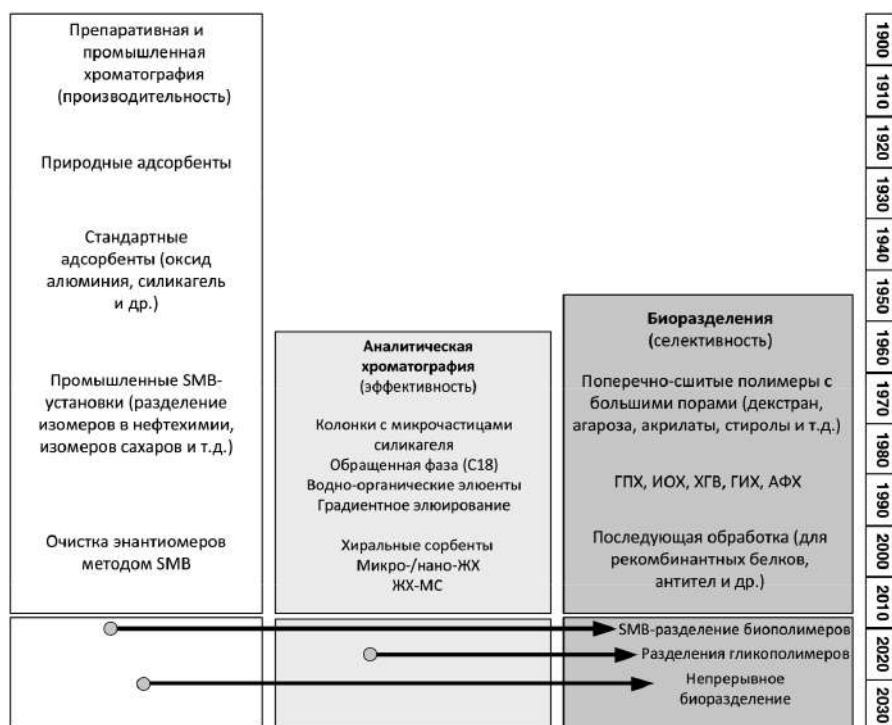


Рис 1.1. Развитие хроматографии. Источник: [5]. Воспроизведено и изменено с разрешения издательства John Wiley and Sons

(SMB)* для промышленного разделения в нефтехимической и пищевой промышленности [1].

Этот прогресс был тесно связан с появлением сорбентов с высокой селективностью. В 1980-х годах были разработаны высокоселективные сорбенты для разделения рацематов на энантиомеры**.

Доступность энантиоселективных сорбентов в промышленных количествах позволила организовать крупнотоннажное производство чистых энантиомеров с помощью SMB-технологии. В последующие годы была достигнута производительность, превышающая 10 кг целевого продукта на килограмм сорбента за один день.

В 1990-х годах методология SMB-процесса была адаптирована для производства фармацевтических препаратов, масштаб при этом, конечно, был снижен. Разработка новых процессов обязательно сопровождалась их теоретическим моделированием. Такое моделирование создает предпосылки для лучшего понимания явлений массопереноса и того, каким образом нужно оптимизировать процесс.

В то время как развитие препаративной ЖХ, равно как и аналитической, в значительной степени основывалось на возможностях существующего оборудования,

* Англ. Simulated Moving Bed. (Прим. перев.)

** Первое разделение энантиомеров в жидкостной хроматографии на хиральных сорбентах было осуществлено В.А. Даванковым и С.В. Рогожиным в 1968 году. См. Даванков В.А., Рогожин С.В. Хроматографический метод расщепления рацематов оптически активных соединений. Авт. свид. СССР № 308635, 1968. (Прим. перев.)

на инженерных решениях и на аппаратных возможностях этого оборудования, область биоразделений строилась вокруг другого ключевого аспекта — селективности. Селективные сорбенты позволяли разделять биополимеры, например рекомбинантные белки, в мягких условиях, тем самым сохраняя их биологическую активность. Гораздо меньше внимания в этой области уделялось технической стороне процесса, что привело к интересному явлению: крупномасштабное разделение белков разрабатывалось на основе механически непрочных мягких гелей [3].

Разделение белков и других биополимеров имеет некоторые существенные отличия от разделения низкомолекулярных веществ, полученных в результате синтеза или выделенных из природных источников. Биополимеры имеют молекулярный вес в диапазоне от нескольких тысяч до миллионов дальтон. Они заряжены и характеризуются каждой своей изоэлектрической точкой. Что еще более важно, они имеют динамическую третичную структуру, которая может конформационно изменяться. Эти изменения могут влиять на биологическую активность и даже совсем свести ее к нулю в случае денатурации белка. Разделение биополимеров происходит в водных буферных элюентах, не влияющих на их биологическую активность. Кроме того, коэффициенты диффузии макромолекул примерно в сто раз меньше, чем у низкомолекулярных соединений, и, как следствие, массоперенос биополимеров более медленный [5]. Из-за этих особенностей процессы разделения в биохроматографии существенно отличаются от таковых в случае низкомолекулярных соединений. Например, давление в ходе разделения биополимеров во многих случаях ниже, чем для ВЭЖХ, и потому для биохроматографии обычно конструируют специальные установки. Селективность вносит свои коррективы: из-за очень разных времен удерживания растворенных биомолекул разделение возможно лишь в градиентах растворителя.

Начиная с 1990-х годов способы моделирования хроматографического разделения низкомолекулярных продуктов тонкого органического синтеза были значительно усовершенствованы и до сих пор с успехом используются, что стимулировало развитие практической хроматографии. В то же время разделения биологических объектов в основном были основаны на эмпирических знаниях вследствие сложной природы соединений природного происхождения. В прошлом регуляторная политика FDA* и других органов власти была сосредоточена на сертифицированных схемах и условиях процесса, а также на контроле качества, для чего проверялся состав промежуточных соединений и конечных продуктов. Все это делалось с целью гарантировать безопасность лекарственных средств, но привело к чрезмерному регулированию и угрозе завести производство лекарств в тупик. Поэтому FDA в 2000-х годах дала старт технологии анализа процессов (ТАП)** и заявила: «Цель ТАП — улучшить понимание производственного процесса и контроль над ним, что согласуется с нашей нынешней системой качества лекарственных средств. Качество не должно проверяться в конечном товаре — оно должно быть заложено заранее в самом процессе производства» [2]. ТАП подразумевает смену парадигмы в фармацевтической промышленности и выводит на новый уровень понимание проходящих в ней процес-

* Здесь и в дальнейшем в этой главе эти и другие регуляторные органы США и других стран обозначаются латинскими сокращениями, приведенными при первом упоминании в примечаниях, а также включенными в словарь условных терминов и принятых сокращений. FDA — Food and Drug Administration, USA. (Прим. перев.)

** Англ. PAT — process analysis technology. (Прим. перев.)

сов. Между тем этот уровень понимания углубляется благодаря введению понятия «планируемое качество» (ПК),* которое по сути своей есть «систематический подход к разработке, начинающийся с заранее определяемых целей и делающий упор на понимание процессов получения продукта и контроль над ними на научной основе и с помощью управления рисками качества» [6].

В недавнем прошлом противоточные SMB-процессы были основными достижениями в области хроматографических разделений. Технология SMB, ориентированная на повышение производительности хроматографического разделения и его экономичности (особенно для объектов биологического происхождения), становится теперь источником разработок новых и более гибких процессов, в которых используется меньшее число колонок. Предельный случай – это попытка провести процесс, подобный SMB, с использованием всего одной колонки [7]. Управление процессом разделения – еще один путь, по которому идет модернизация. Для получения продукции высокого качества процесс должен быть надежным и устойчивым. Предпосылками для совершенствования управления процессом, с одной стороны, являются высокоселективные неподвижные фазы и надежное оборудование, а с другой – точно построенные модели разделения и повышенная мощность компьютера, позволяющая быстро и достоверно моделировать процесс.

Вглядываясь в будущее, можно увидеть тенденцию к использованию непрерывных технологических процессов и к последовательной обработке продуктов тонкого органического синтеза, и особенно биофармацевтических препаратов. Чтобы достичь более комплексных и эффективных подходов, необходимо будет соотносить затраты и производственные возможности. В течение нескольких последующих лет адаптация концепции обратного градиента, используемого для выделения антигенов из многокомпонентной культуральной жидкости, обеспечит более рентабельную переработку биофармацевтических препаратов.

Препаративная и крупномасштабная хроматографии в основных областях применения достигли уровня зрелости, что превращает их из революционных технологий в товар широкого потребления. В будущем возможности главным образом сосредоточатся в области непрерывной работы в рамках новых SMB-вариантов, особенно в сочетании с другими методами, такими как экстракция, кристаллизация, осаждение и т.д. Подобные комбинации обеспечат новые и конкурентоспособные возможности в таких областях, как производство субстанций на основе природного и культивируемого растительного сырья, например, в здравоохранении и в других регулируемых/регламентированных отраслях. Работа в различных прикладных областях ведется с упором на поднадзорные продукты,** однако описание этих областей выходит за рамки этой книги.

1.2. Цель книги

Общая цель препаративной хроматографии – выделять и очищать продукты с высоким качеством. В ходе процесса хроматографии целевые вещества должны быть выделены в том же состоянии, в котором они находились до разделения. Посколь-

* Англ. QbD – quality by design. (Прим. перев.)

** Продукты, производство которых регулируется государственными органами и требует отчетности и аудита. (Прим. перев.)

ку препаративные хроматографические процессы должны давать целевое вещество нужной чистоты, а кроме того, быть настолько экономичными, насколько это возможно, они обычно работают в нелинейных условиях (перегрузки).

В отличие от препаративной, аналитическая хроматография, не являющаяся предметом обсуждения в данной книге, имеет своей целью качественный и количественный анализ соединения. Таким образом, образец может быть обработан и модифицирован любым способом, подходящим для получения необходимой информации, включая разложение, включение метки или изменение природы исследуемых соединений. Такие процессы обычно протекают в линейных условиях (в условиях разбавления).

Эта книга позволяет взглянуть на концепции хроматографической очистки глазами как инженеров, так и химиков. С одной стороны, такой взгляд включает в себя основы естествознания, разработку материалов и функциональных возможностей. С другой — в качестве примеров можно привести математическое/компьютерное моделирование процессов разделения, моделирование и проектирование установок, их эксплуатацию, а также совместные усилия по определению характеристик материалов и проектированию процессов. Такой совмещенный подход понадобится в ближайшее время, поскольку важно организовать взаимодействие между инженерами и химиками для достижения своевременных и экономически эффективных решений, а также для разработки надежных методов, которые можно масштабировать и внедрять в технологическую среду процесса.

По сравнению со вторым изданием, вышедшим в 2012 году, эта книга полностью реструктурирована, переработана и обновлена.

1.3. Как читать эту книгу

Большинству читателей, вероятно, нет нужды читать последовательно все главы. Для одних книга может служить справочником, в котором можно найти ответы на конкретные вопросы, связанные с реальными задачами. Для других она может быть руководством для освоения новых областей в исследованиях или в промышленности. Эта книга не может дать ответы на все вопросы. В тех случаях, когда ответа на вопрос в ней нет, читатель может получить информацию из цитируемой литературы.

Различные главы дополняют друг друга. Рекомендуем сначала ознакомиться с основными определениями, описанными в главе 2. В этой главе даны основные принципы хроматографии и определения основных параметров, таких как фактор удерживания, селективность и разрешение. Кроме того, в этой главе объясняются основные параметры моделей, а также различные уравнения изотерм, в частности в рамках теории идеального адсорбционного раствора, определение перепада давления и влияние массопереноса. Другие разделы посвящены значениям числа теоретических тарелок и высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), а также их определению на основе метода первого и второго моментов и при перегрузке колонок. Опытный читатель может быстро просмотреть эту главу, чтобы вспомнить используемые в книге определения. Начинаящим же эта глава рекомендуется для изучения общей терминологии и получения базовых знаний. Еще одна цель, которую преследует эта глава, согласование общих хроматографических терминов между инженерами и химиками.

В главе 3 дается обзор неподвижных фаз и методов их упаковки. В ней описывается структура и свойства неподвижных фаз — стандартных и специально разработанных, обращенно-фазовых силикагелей, сшитых органических полимеров, хиральных фаз, и даны инструкции по работе с ними и их регенерации. Эта глава может использоваться в качестве справочного материала для выяснения специальных вопросов и поможет тем, кто ищет обзор свойств различных неподвижных фаз.

Глава 4 посвящена выбору условий разделения, то есть оптимальной для данного разделения комбинации неподвижных и подвижных фаз. Объясняются и дополняются практическими рекомендациями критерии выбора нормальных фаз (НФ), обращенных фаз (ОФ) и хиральных неподвижных фаз (ХНФ). Другие темы этой главы — выделение моноклональных антител и эксклюзионная хроматография (ЭХ). Наконец, обсуждаются практические аспекты общей оптимизации условий хроматографического разделения.

Выбор условий разделения наиболее важен для расчета производительности процесса и, следовательно, его (процесса) экономичности. Этот выбор может дать максимально возможную выгоду, но, с другой стороны, может быть потенциальным источником серьезных ошибок при разработке процессов разделения.

В главе 5 дан обзор имеющихся в препаративной хроматографии методов разделения. В зависимости от режима работы хроматографические методы отличаются некоторые особенности: периодическое или непрерывное введение образца, работа на одной или нескольких колонках, элюирование в изократических или градиентных условиях, рециркуляция технологических потоков, отбор двух или множества фракций, объединение реакции и разделения в рамках одной технологической стадии. В конце главы даются рекомендации по выбору метода/концепции процесса.

В главе 6 основное внимание уделено моделированию и определению параметров модели. «Виртуальные эксперименты» с помощью математического моделирования могут значительно сократить время и объем образца, необходимые для анализа и оптимизации процесса. Для того чтобы этой цели достичь, необходимы надежные модели и точные параметры моделей хроматографических колонок. Для оптимального проектирования производства могут использоваться в качестве предварительных валидированные модели. Другие возможные области применения моделирования включают исследование процессов разделения, а также обучение персонала. Такие исследования включают обсуждение различных моделей колонок и подключаемого оборудования.

Глава 7 посвящена последовательному определению параметров моделей, особенно изотерм, отвечающих равновесным состояниям. Представлены методы различной сложности и экспериментальной трудности, позволяющие изменять, с одной стороны, желаемую погрешность метода, а с другой — необходимое для разделения время. Глава заканчивается подборкой различных примеров, в которых продемонстрировано, что подходящая модель в сочетании с согласованными параметрами может обеспечить соответствие экспериментальным данным с высокой точностью.

В главе 8 рассмотрены проектирование и оптимизация процесса разделения. Начинается рассмотрение с базовых принципов и продолжается анализом процессов, проводимых на одной колонке. Описаны методики разработки и масштабирования периодических и циркуляционных процессов, а также процедура пошаговой оптимизации. В случае изократических и градиентных SMB-процессов строгое моде-

лирование в сочетании с приближенными вычислениями, основанными на модели так называемого истиннодвижущегося слоя сорбента*, является полезным инструментом для оптимизации процессов, что иллюстрируется различными примерами. В следующих разделах обсуждается усовершенствование SMB-хроматографии с помощью изменения условий разделения на установках Varicol, PowerFeed или Modicon и при градиентном элюировании. Завершают главу комментарии к мультиколоночным системам для биоразделений.

Глава 9 начинается с введения в стандартное управление процессом. В ней представлены научные результаты теоретической онлайн-оптимизации традиционного периодического процесса хроматографического разделения и основанное на результатах моделирования усовершенствованное управление SMB-процессами. Проводится сравнение результатов такого усовершенствованного управления с экспериментальными данными. Другими обсуждаемыми аспектами являются адаптивная оценка параметров и контроль цикла разделения, а также контроль сопряженных SMB-процессов.**

Глава 10 посвящена практическим аспектам, касающимся оборудования и эксплуатации промышленных хроматографических систем, предназначенных для производства и очистки продуктов тонкого органического синтеза и низкомолекулярных фармацевтических субстанций, а также белков и других биополимеров. Она начинается с описания хроматографических колонок, далее описаны хроматографические установки, то есть все оборудование, которое необходимо для производства. Сюда включено рассмотрение как высокопроизводительных систем, так и систем низкого давления, а также систем непрерывного SMB-разделения, дополненное примечаниями, относящимися к вспомогательному оборудованию. Далее в этой главе подробно описываются различные методы упаковки колонн. Раздел о неисправностях и способах их устранения будет интересен практикующим хроматографистам. Технологии производства отдельных биотерапевтических препаратов иллюстрируются примерами использования одноразовых упакованных хроматографических колонок и мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Broughton, D.B. and Gerhold, C.G. (1961) Continous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets, US Patent No. 2.985.589.
2. FDA (2004). Guidance for industry PAT-A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assessment, <http://www.fda.gov> (accessed 03 October 2019).
3. Janson, J.C. and Jönsson, J.-A. (2010). Protein Purification (ed. J.C. Janson). Weinheim: VCH.
4. Tswett, M.S. (1906). Physical chemical studies on chlorophyll adsorption. *Berichteder Deutschen botanischen Gesellschaft*, 24, 316–323 (as translated and excerpted in H.M. Leicester, *Source Book in Chemistry 1900–1950*). Cambridge, MA:Harvard, 1968.

* Англ. True Moving Bed process (ТМВ). (Прим. перев.)

** Это может быть, например, рацемизация одного из энантиомеров с последующим разделением и выделением целевого энантиомера или просто два последовательных SMB-процесса. (Прим. перев.)

5. Unger, K., Ditz, R., Machtejevas, E., and Skudas, R. (2010). Liquid chromatography – its development and key role in life sciences applications. *Angew. Chem.* 49: 2300–2312.
6. Yu, L.X., Amidon, G., Khan, M.A. et al. (2014). Understanding pharmaceutical quality by design. *AAPS J.* 16 (4): 771–778.
7. Zobel, S., Helling, C., Ditz, R., and Strube, J. (2014). Design and operation of continuous countercurrent chromatography in biotechnological production. *Ind.Eng. Chem. Res.* 53: 9169–9185.

Глава 2.

Основные понятия и общая терминология*

Андреас Зайдель-Моргенштерн

Otto-von-Guericke-Universität, Lehrstuhl für Chemische Verfahrenstechnik, Universitätsplatz 2, 39106 Magdeburg, Germany

Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Sandtorstraße 1, 39106 Magdeburg, Germany

* В написании этой главы в первом и/или втором издании книги принимали участие *Михаэль Шульте* и *Ахим Эппинг*.

В этой главе представлены основные понятия и уравнения для характеристики и количественного описания хроматографического разделения. На примере обычных аналитических разделений различных соединений в хроматографической колонке объясняется влияние мертвых объемов, гидродинамики, сопротивления массопереносу, и в особенности равновесного распределения разделяемых веществ между фазами. Сделан акцент на важных характеристиках препаративной хроматографии (работа в режиме перегрузки), в особенности на зависимости характера миграции веществ от их концентрации в нелинейном диапазоне изотерм адсорбции. Разъясняются существенные отличия от аналитической хроматографии [12].

Целью этой главы также является содействие разработке единой терминологии в области хроматографии, используемой по-разному инженерами и химиками.

2.1. Принципы и особенности хроматографии

Хроматография относится к термическим* процессам разделения, используемым для разделения гомогенных молекулярных смесей. Обычно для такого разделения требуется три стадии [34].

(1). В дополнение к первоначально гомогенной фазе исходной смеси вторая фаза генерируется путем введения энергии (например, во время дистилляции) или добавочного компонента (например, во время экстракции или адсорбции).

* Поскольку определение хроматографии как термического процесса разделения переводчикам показалось слишком обширным обобщением, мы обратились к проф. Зайделю-Моргенштерну за разъяснением. Он сообщил нам, что по традиции в немецкой научной литературе перегонка, абсорбция, экстракция и адсорбция/хроматография называются термическими процессами разделения. В основном они обусловлены отклонениями от равновесного термодинамического состояния. Кроме того, на эти процессы оказывает влияние кинетика разделения. (*Прим. перев.*)

(2). Между отдельными фазами происходит массо-обмен и обмен энергией. Движущей силой этих процессов переноса является отклонение от термодинамического равновесия.

(3). После завершения обменных процессов две фазы имеют различный состав и могут быть разделены. Результатом такого разделения фаз является частичное разделение изначально гомогенной смеси.

При хроматографическом разделении фаза

гомогенной исходной смеси представляет собой жидкость. Дополнительная вторая фаза представляет собой твердое тело или вторую жидкость, не смешивающуюся с первой. Движущей силой переноса между фазами является отклонение конкретных смесей от состояния равновесия.

Вводимая исходная смесь разделяется путем избирательных относительных перемещений компонентов между двумя фазами. Обычно твердая фаза является фиксированной и обозначается, соответственно, как неподвижная или стационарная фаза. Жидкая фаза движется и поэтому называется подвижной фазой. Поведение при хроматографическом разделении определяется специфическими взаимодействиями всех отдельных компонентов, присутствующих в системе, с подвижной и неподвижной фазами. Совокупность смеси веществ, которые должны быть разделены, носителя (растворителя, используемого для растворения и транспорта) и адсорбента (неподвижной фазы) определяется как условия разделения (используется также термин «хроматографическая система», как на рис. 2.1). В лабораторной практике условия, подходящие для осуществления данного разделения, выбираются с помощью процесса, обычно называемого «разработка метода».

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы хроматографические процессы можно разделить на несколько категорий. Если подвижная фаза является газообразной, процесс называется газовой хроматографией (ГХ). Если подвижная фаза представляет собой жидкость, процесс называется жидкостной хроматографией (ЖХ). Для жидкости при температуре и давлении выше критической точки этот процесс называется сверхкритической флюидной хроматографией (СФХ). Таким образом, в зависимости от типа границы раздела между подвижной и неподвижной фазами можно выделить следующие сочетания фаз при хроматографии:

- газообразные подвижные фазы / твердые неподвижные фазы;
- жидкие подвижные фазы / твердые неподвижные фазы;
- газообразные подвижные фазы / жидкие неподвижные фазы;
- жидкие подвижные фазы / жидкие неподвижные фазы;
- сверхкритические подвижные фазы / твердые неподвижные фазы.

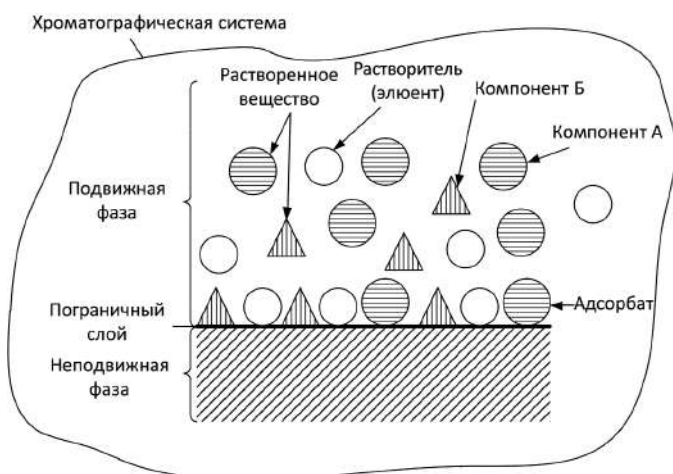


Рис. 2.1. Термины, используемые для описания условий разделения

Примером промышленного применения первых двух комбинаций фаз является адсорбция загрязняющих веществ из отработанного воздуха или загрязненной воды на активированном угле. Третья и четвертая комбинации имеют отношение, например, к образованию и стабилизации пены в присутствии поверхностно-активных веществ на границах раздела вода/воздух или на границе раздела двух несмешивающихся жидкостей (например масла и воды). В настоящее время происходит возрождение сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) в различных областях с использованием сверхкритического CO_2 в качестве подвижной фазы [31].

ЖХ может быть дополнительно подразделена на несколько видов в соответствии с геометрической ориентацией фаз. Процессом, широко используемым для аналитических целей, для быстрой разработки методов, а в некоторых случаях даже для препаративного разделения, является тонкослойная хроматография (ТСХ). Адсорбент наносится на подложку (стекло, пластик или алюминиевую фольгу) тонким слоем. Разделяемую смесь помещают на адсорбент в виде маленьких кружков или линий. В закрытой камере один конец тонкослойной пластины погружается в подвижную фазу, которая затем поднимается по пластине благодаря капиллярному эффекту. Отдельные вещества можно обнаружить либо благодаря тушению флуоресценции, либо после химической реакции с реагентами для обнаружения. Преимуществами ТСХ являются обнаружение всех веществ, даже тех, которые сильно адсорбируются*, а также легкость параллельного проявления всех компонентов.

В ГХ и ЖХ частицы неподвижной фазы фиксируются в колонне (колоночная хроматография), которая обычно изготавливается из стекла, полимера или нержавеющей стали. Неподвижная фаза (адсорбент) в колонне представляет собой упакованный случайным образом слой пористых или непористых частиц или монолитный блок. Если колонна хорошо упакована мелкими частицами и используются жидкие подвижные фазы, часто применяется очень эффективный и широко распространенный метод, называемый высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Эта книга в основном посвящена наиболее типичному для препаративного разделения процессу, в котором используются твердые неподвижные фазы, жидкие подвижные фазы и растворы исходных смесей разделяемых веществ. Ключевой информацией, необходимой для количественного определения хроматографического процесса, являются знания о равновесных распределениях анализируемых веществ между двумя дополнительными фазами, введенными для разделения. Хотя эти фазовые равновесия являются специфическими для каждого механизма разделения, существует возможность описать их математически аналогичным образом. Поскольку в большинстве хроматографических процессов используется принцип адсорбции, то есть специфического осаждения и накопления молекул на поверхностях твердых стационарных фаз, и поскольку существует хорошо разработанная теория термодинамики однокомпонентной и многокомпонентной адсорбции, терминология и обозначения, используемые для адсорбции, подходят как для характеристики препаративной хроматографии, так и для количественного определения разделяемых веществ.

Представляется целесообразным использовать следующие определения. Твердое вещество, на котором происходит адсорбция, называется адсорбентом. Молекула

* Сильно адсорбируемые вещества не смещаются фронтом подвижной фазы, оставаясь на старте. Если проводить аналогию с колоночной жидкостной хроматографией, то такие вещества не вымываются из колонки и обнаружить их практически невозможно. (Прим. перев.)

разделяемой смеси в свободном состоянии (в растворе) называется адсорбтивом, а в адсорбированном состоянии — адсорбатом. Обычно в разделяемой смеси присутствуют различные растворенные вещества, которые часто называют компонентами (например А и В; рис. 2.1).

На молекулярном уровне процесс адсорбции представляет собой образование связи между поверхностью адсорбента и молекулами, находящимися в жидкой фазе. Силы связывания могут быть разными по природе и силе. Можно выделить два основных типа связывания [1, 20].

(1). Физическая сорбция (или физическая адсорбция) представляет собой слабое связывание, основанное на силах Ван-дер-Ваальса, например дипольных, дисперсионных или индуцированных взаимодействиях. Эти взаимодействия слабее, чем силы внутримолекулярного связывания в молекулах. Следовательно, физически сорбированные молекулы сохраняют свои химические свойства.

(2). Более сильное связывание обеспечивается при хемосорбции или химической адсорбции. Оно обусловлено валентными силами, эквивалентными химическим, главным образом ковалентным, связям.

В таблице 2.1 приведены оценочные значения энтальпии адсорбции. В газообразном состоянии эти значения энтальпии пропорциональны известным значениям теплоты испарения h_{vap} .

Поскольку периодические хроматографические процессы требуют полной обратимости стадии адсорбции, то могут быть использованы только процессы, основанные на физической адсорбции. Энергии связывания достаточны для повышения температуры газов из-за их низкой объемной теплоемкости [33]. Жидкости, однако, характеризуются объемной теплоемкостью в 10^2 – 10^3 раз выше. Таким образом, энергии, связанные с адсорбционными процессами, незначительно влияют на локальную температуру. Поэтому все рассматриваемые процессы можно считать приблизительно изотермическими.

В процессе ЖХ подвижная фаза прокачивается через колонну, заполненную множеством зафиксированных частиц неподвижной фазы. На рис. 2.2 проиллюстрировано введение на вход колонны однородной двухкомпонентной смеси (компоненты А и В, представленные треугольниками и кружками). При этом показанный треугольниками компонент В имеет более высокое сродство к стационарной фазе. Следовательно, среднее время адсорбции этого компонента на поверхности неподвижной фазы продолжительнее, чем у компонента А (показанного кружками) с более низким сродством.

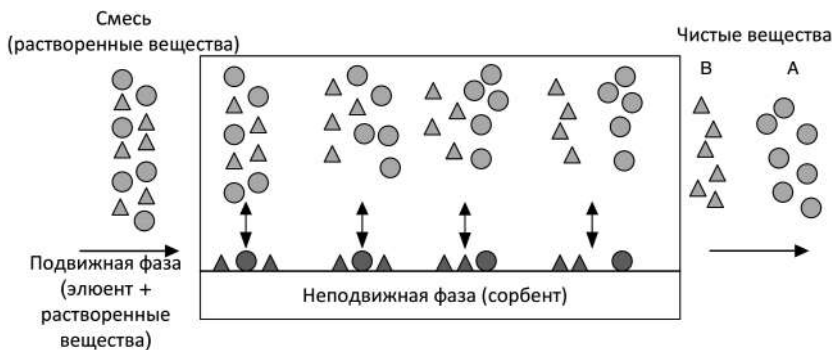


Рис. 2.2. Принцип адсорбционной хроматографии

Таблица 2.1.

Интервалы значений энтальпии адсорбции

Подвижная фаза	Физическая сорбция	Химическая сорбция	Литература
Жидкая фаза	< 50 кДж/моль	≥ 60 –450 кДж/моль	[25]
Газовая фаза	$1,5 \Delta h_{\text{vap}}$	2 – $3 \Delta h_{\text{vap}}$	[33]

Разница в родстве и, следовательно, во времени адсорбции приводит к снижению скорости миграции в колонке компонента В с более высоким родством к адсорбенту. Это задерживает его поступление на выход колонки по сравнению со слабее адсорбируемым компонентом А. Если условия процесса выбраны правильно, два вещества могут быть полностью разделены и собраны как чистые компоненты на выходе из колонки.

2.2. Анализ и описание хроматограмм

2.2.1. Понятие пористости

Важная информация, необходимая для описания и моделирования хроматограмм, касается пористости слоя сорбента. Пористость слоя сорбента складывается из объема между частицами адсорбента и собственно пористости гранул адсорбента [17, 29]. Как показано на рис. 2.3, общий объем упакованной колонки (V_c) можно разделить на две основных составляющих: объем подвижной фазы между частицами адсорбента (V_{int}) и собственно объем упакованного слоя адсорбента (V_{ads}) (уравнение (2.1)):

$$V_c = \pi \frac{d_c^2}{4} L_c = V_{\text{ads}} + V_{\text{int}}. \quad (2.1)$$

Объем V_{ads} состоит из объема твердого адсорбента (V_{solid}) и объема системы пор V_{pore} (уравнение (2.2)).

$$V_{\text{ads}} = V_{\text{solid}} + V_{\text{pore}}. \quad (2.2)$$

Исходя из указанных объемов, можно рассчитать три различных значения пористости (уравнения (2.3)–(2.5)).

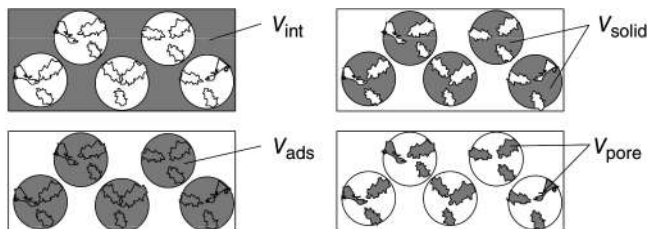


Рис. 2.3. Различные составляющие объема колонки, упакованной пористыми частицами (V_{int} – объем подвижной фазы между частицами адсорбента; V_{ads} – объем упакованного слоя адсорбента; V_{solid} – объем твердого адсорбента; V_{pore} – объем пор адсорбента)

Внешняя пористость (объем между частицами или доля колонки, заполненная подвижной фазой):

$$\varepsilon_e = \frac{V_{int}}{V_c}. \quad (2.3)$$

Пористость твердой фазы (внутренняя пористость):

$$\varepsilon_p = \frac{V_{pore}}{V_{ads}}. \quad (2.4)$$

Общая пористость:

$$\varepsilon_t = \frac{V_{int} + V_{pore}}{V_c} = \varepsilon_e + (1 - \varepsilon_e) \varepsilon_p. \quad (2.5)$$

Экспериментальное определение этих значений пористости достаточно сложное. Наиболее распространенный метод определения общей пористости ε_t — это введение неудерживаемых, проникающих в поры индикаторных веществ (серые и мелкие черные кружки на рис. 2.4).

В нормально-фазовой хроматографии в качестве индикатора часто используется толуол или 1,3,5-три-трет-бутилбензол, в то время как в обращенно-фазовой хроматографии обычно используется урацил.

Общее время удерживания неудерживаемого вещества зависит от времени удерживания в самой колонке, t_0 , а также от дополнительного времени удерживания в системе или установке, t_{plant} , которое зависит от длины и диаметра капилляров, а также от объема головы насоса (если проба вводится насосом). Мертвое время системы следует определять без колонки, чтобы получить правильное мертвое время колонки. Исходя из мертвого времени колонки $t_{0,cl}$ и значения объемной скорости потока подаваемого насосом элюента, общая пористость может быть рассчитана в соответствии с уравнением (2.6):

$$\varepsilon_t = \frac{t_{0,cl} \cdot \dot{V}}{V_c}. \quad (2.6)$$

Зная ε_p , можно рассчитать соответствующую гипотетическую скорость подвижной фазы между частицами адсорбента с помощью объемной скорости потока и гипотетического поперечного сечения колонны (уравнение (2.7)):

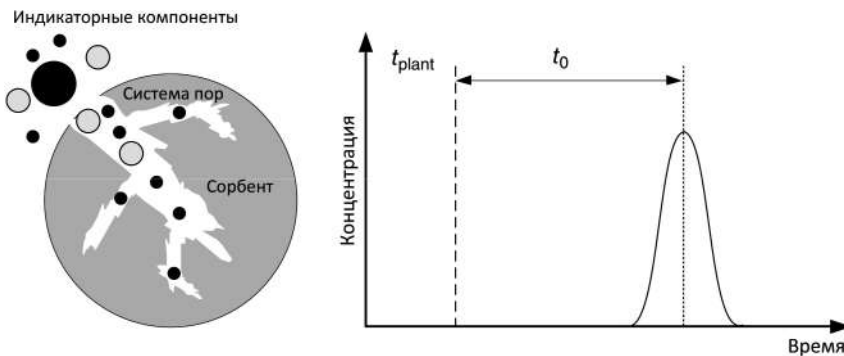


Рис. 2.4. Иллюстрация хроматографического разделения с индикаторными компонентами и соответствующими временами удерживания

$$u_{int,hypo} = \frac{\dot{V}}{\varepsilon_t \cdot \pi \cdot \left(\frac{d_c^2}{4}\right)}. \quad (2.7)$$

Комбинируя уравнения (2.1) и (2.6), получаем

$$u_{int,hypo} = \frac{L_c}{t_{0,t}}. \quad (2.8)$$

Чтобы подтвердить тот факт, что связывания индикатора не происходит, проведенные при разной температуре эксперименты должны дать в результате одинаковое время удерживания $t_{0,t}$.

Для получения значения внешней пористости колонки, ε_e , можно использовать ту же методологию, основанную на введении высокомолекулярного вещества, которое не может проникнуть в поры (большие черные кружки на рис. 2.4). Измерив мертвое время $t_{0,e}$ для неудерживаемой и не проникающей в поры адсорбента молекулы, можно рассчитать внешнюю пористость и (реальную) линейную скорость потока между частицами сорбента u_{int} в соответствии с уравнением (2.9):

$$\varepsilon_e = \frac{t_{0,e} \dot{V}}{V_c} \text{ и } u_{int,e} = \frac{L_c}{t_{0,e}}. \quad (2.9)$$

При введении высокомолекулярных веществ часто возникают сложности с осуществлением эксперимента. Идеальные индикаторы должны иметь молекулы сферической формы, не адсорбироваться и не проникать ни в какие поры, но при этом должны обладать большой подвижностью. К сожалению, идеального высокомолекулярного индикатора для определения внешней пористости не существует. Поэтому представляют интерес альтернативные методы определения доли объема между частицами сорбента.

Определенные параметры адсорбента могут быть определены с высокой точностью из физических измерений. Пористость также может быть рассчитана на основе массы адсорбента m_{solid} , его плотности ρ_{solid} и удельного объема пор v_{sp} (определенного, например, с помощью адсорбции азота или ртутной порометрии). Объем адсорбента рассчитывается по уравнению (2.10):

$$V_{solid} = \frac{m_{solid}}{\rho_{solid}}. \quad (2.10)$$

Абсолютный объем пор может быть получен из уравнения (2.11):

$$V_{pore} = v_{sp} \cdot m_{solid}. \quad (2.11)$$

Сумма объема сорбента и объема пор равна объему неподвижной фазы. Разность объема колонки и суммарного объема неподвижной фазы соответствует объему между частицами адсорбента (уравнение (2.12)).

$$V_{int} = V_c - (V_{solid} + V_{pore}). \quad (2.12)$$

Затем можно определить внешнюю пористость с помощью уравнения (2.3), а также другие значения пористости, используя уравнения (2.4) и (2.5).

Для надежного определения общей пористости небольших колонок может быть использован альтернативный метод. Если колонку можно точно взвесить, разность

масс одной и той же колонки, заполненной двумя растворителями разной плотности, может использоваться для определения пористости. Сначала колонку полностью промывают одним растворителем, а затем взвешивают. После этого первый растворитель полностью замещается вторым растворителем другой плотности. Для нормально-фазовых систем можно использовать метанол и дихлорметан; для систем с обращенной фазой довольно часто используются вода и метанол. Объем растворителя, представляющий собой сумму объема между частицами адсорбента и объема пор, определяется по уравнению (2.13):

$$V_{int} + V_{pore} = \frac{m_{s,1} - m_{s,2}}{\rho_{s,1} - \rho_{s,2}}. \quad (2.13)$$

Общая пористость может быть вычислена с помощью уравнения (2.5).

Частицы высокоэффективного адсорбента чаще всего делают сферическими и моносферическими, для того чтобы перепады давления были меньше. В этом случае внешняя пористость для сферических частиц теоретически лежит в диапазоне $0,26 < \epsilon_e < 0,48$ и можно использовать приблизительное среднее значение ϵ_e , равное 0,37 [5]. Пористость частиц лежит в диапазоне $0,50 < \epsilon_p < 0,90$; это означает, что 50–10% адсорбента представляет собой непроницаемый каркас. Общая пористость часто находится в диапазоне $0,65 < \epsilon_t < 0,80$. Для моносферических колонок эта пористость может находиться в диапазоне $0,80 < \epsilon_t < 0,90$. В случае большой пористости необходимо обеспечить достаточную устойчивость упаковки.

2.2.2. Времена удерживания и коэффициенты емкости

На рис. 2.5 показана хроматограмма, полученная при введении небольших (аналитических) количеств трех различных компонентов в колонку. Сила взаимодействия каждого компонента i с неподвижной фазой пропорциональна его времени удерживания $t_{R,i}$. Помимо оценки времени удерживания также полезно учитывать объем удерживания, который получается при умножении $t_{R,i}$ на соответствующую объемную скорость потока. Первый пик, который элюируется при $t_{\text{plant}} + t_0$, соответствует неудар-

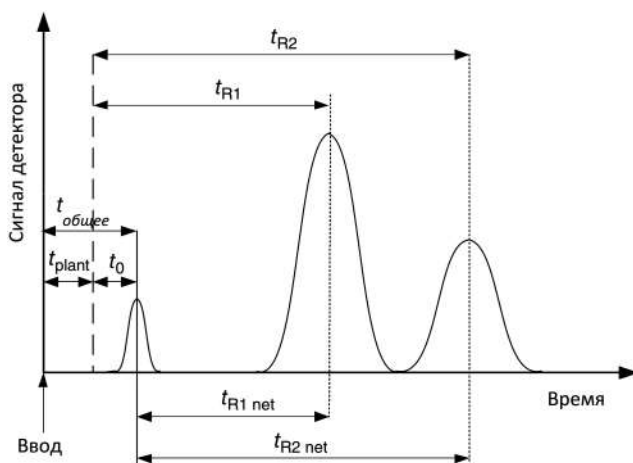


Рис. 2.5. Хроматограмма разделения одного неудерживаемого и двух удерживаемых компонентов

На качественно упакованных колонках должны получаться симметричные пики, если количества вводимого в колонку образца малы, т.е. его концентрации ограничены линейным диапазоном изотермы адсорбции. Если пики симметричны, времена

удерживания можно легко определить по положению максимума пика. Если вводится большее количество вещества, соответствующее нелинейному диапазону изотермы адсорбции, форма пиков искажается и они становятся асимметричными. В этом случае среднее время удерживания можно рассчитать по центру масс, используя метод моментов (см. раздел 2.2.3).

Общее время удерживания $t_{R,i}$ компонента i равно сумме мертвого времени t_0 и чистого времени удерживания $t_{R,i,net}$. Чистое время удерживания соответствует времени, в течение которого молекулы вещества адсорбированы на поверхности адсорбента*.

Поскольку время удерживания вещества зависит от геометрии колонки, пористости слоя сорбента и скорости потока подвижной фазы, целесообразна стандартизация. Для этого применяется коэффициент емкости k'_i , который также называют фактором удерживания k^{**} . Этот коэффициент определяется согласно уравнению (2.14):

$$k'_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0}. \quad (2.14)$$

И коэффициент емкости (фактор удерживания), и время удерживания зависят от природы индикаторного вещества, используемого для определения t_0 . Следовательно, подлежат сравнению только те значения k'_i различных веществ, которые определены в экспериментах с одним и тем же индикатором.

Хроматографические процессы направлены на разделение растворенных веществ, поэтому большое значение имеет расстояние между максимумами двух соседних пиков. Для количественной оценки может использоваться селективность α разделения двух компонентов i и j , равная отношению их коэффициентов емкости (факторов удерживания):

$$\alpha = \frac{k'_j}{k'_i} = \frac{t_{R,j} - t_0}{t_{R,i} - t_0}. \quad (2.15)$$

Принято в числитель подставлять коэффициент емкости более удерживаемого компонента. Таким образом, селективность двух разделенных веществ всегда > 1 . Селективность также называют фактором разделения.

Времена удерживания и коэффициенты емкости содержат термодинамическую информацию, касающуюся состояний равновесия, устанавливающихся при распределении растворенных веществ между подвижной и неподвижной фазами. Эти равновесия обычно описываются изотермами адсорбции, которые количественно определяют корреляции между нагрузками растворенного вещества на адсорбент q_i и соответствующими его концентрациями в жидкой фазе c_i при заданной постоянной температуре. Изотермы однокомпонентной и конкурентной адсорбции более подробно обсуждаются в разделе 2.4.

* Некорректное определение. Чистое время удерживания складывается из времени нахождения молекулы в адсорбированном состоянии и времени нахождения в элюенте. Для сильноудерживаемого компонента время нахождения в адсорбированном состоянии больше, для слабоудерживаемого – меньше. (Прим. перев.)

** В настоящее время в России используется термин «фактор удерживания», обозначаемый k , в соответствии с принятыми указаниями «Хроматография. Основные понятия. Терминология. Термодинамические характеристики сорбционного процесса» (Самара, 2012 г.). (Прим. перев.)

2.2.3. Эффективность хроматографического разделения

Помимо термодинамики распределения компонентов между двумя фазами на форму и расположение пиков на хроматограммах влияют несколько других факторов, в частности гидродинамика внутри упакованного слоя и скорость массопереноса внутри частиц и вокруг них. Для включения в рассмотрение этих явлений можно использовать дискретные модели состояния равновесия или непрерывные модели, как описано в главе 6.

Ключевой параметр, указывающий на эффективность хроматографического разделения, широко использующийся в аналитической хроматографии, — это количество стадий с установившимся равновесием (или число теоретических тарелок) N , которое является показателем эффективности колонки. В связи с тем что знание конкретного числа тарелок колонки фиксирует отклонения от идеального разделения и позволяет получить несколько важных параметров математических моделей, эта величина важна также и в препаративной хроматографии. Число теоретических тарелок N непосредственно связано с соответствующей высотой, эквивалентной теоретической тарелке (*НЕТР*) для колонны определенной длины (уравнение (2.16)):

$$НЕТР = \frac{L_c}{N}. \quad (2.16)$$

В значения числа тарелок N и *НЕТР* вносят свой вклад гидродинамика, сопротивление массопереносу и скорости стадий адсорбции и десорбции, которые, в свою очередь, вызывают нежелательное размывание пика. Чем больше число тарелок или меньше высота, эквивалентная теоретической тарелке, тем выше эффективность и более узки пики. Узкие пики лучше разрешаются, элюируются в малых объемах, следовательно, концентрация очищенного продукта на выходе выше — все эти условия благоприятны для препаративной хроматографии. Однако из-за ограниченной скорости массопереноса и неидеальности гидродинамических процессов реальные колонны характеризуются ограниченной эффективностью.

Оценка эффективности колонки может быть легко выполнена путем определения соответствующего первого нормированного начального момента μ_1' пика, зарегистрированного на выходе из колонки, и его второго нормированного центрального момента μ_2 . Для этого вводятся небольшие количества тестовых веществ. Два момента, которые указывают среднее время удерживания $t_{R,mean}$ и дисперсию пика σ^2 , можно рассчитать по формулам (2.17) и (2.18):

$$\mu_1' = \frac{\int_0^\infty t^1 \cdot c(t) \cdot dt}{\int_0^\infty c(t) \cdot dt} = t_{R,mean}, \quad (2.17)$$

$$\mu_2 = \frac{\int_0^\infty (t - \mu_1')^2 \cdot c(t) \cdot dt}{\int_0^\infty c(t) \cdot dt} = \sigma^2. \quad (2.18)$$

Согласно уравнению (2.19) число теоретических тарелок можно выразить через значения двух моментов следующим образом:

* Аббревиатура НЕТР от англ. Height Equivalent to a Theoretical Plate эквивалентна сокращению ВЭТТ. (Прим. перев.)

$$N = \frac{(\mu_1')^2}{\mu_2} = \frac{t_{R, \text{mean}}^2}{\sigma^2}. \quad (2.19)$$

Высокоэффективные колонки позволяют получить достаточно симметричные пики. Тогда среднее время удерживания легко оценить по времени выхода максимума пика $t_{R, \text{max}}$ на хроматограмме. Кроме того, если предположить, что пик можно описать распределением Гаусса, то для простой оценки дисперсии существует несколько вариантов. На рис. 2.6а показаны возможные оценки ширины пика на разной его высоте. Наиболее распространенный и простой вариант — определение ширины на половине высоты измеренного пика $w_{1/2}$, что соответствует $2,354\sigma$. Это приводит к широко используемому приближению (уравнение (2.20)):

$$N \approx 5,54 \left(\frac{t_{R, \text{max}}}{w_{1/2}} \right)^2. \quad (2.20)$$

Аналогичным образом решается уравнение (2.19), если дисперсия измеряется между двумя точками перегиба (ip_1 и ip_2 на рис. 2.6а) или уравнение (2.21), если измеряется ширина пика у основания w :

$$N \approx 16 \left(\frac{t_{R, \text{max}}}{w} \right)^2. \quad (2.21)$$

Применение расчетного значения числа теоретических тарелок для прогнозирования* хроматограмм ограничено тем, что результаты обычно различны для разных веществ. Для характеристики асимметричных пиков требуется больше параметров, связанных с моментами третьего и более высоких порядков [3]. Для вычисления степени асимметрии пика T путем оценки разницы между двумя половинами пика на 1/10 его высоты было предложено простое эмпирическое уравнение (рис. 2.6б, уравнение (2.22)):

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}. \quad (2.22)$$

Другой метод расчета асимметрии пиков можно найти в различных фармакопеях, например в Фармакопее США** или Европейской фармакопее***. В фармакопеях размывание заднего фронта пика рассчитывается на уровне 5% высоты пика (уравнение (2.23)):

$$T_{USP} = \frac{a_{0,05} + b_{0,05}}{2 \cdot a_{0,05}}. \quad (2.23)$$

* Спорное утверждение. Число теоретических тарелок (ЧТТ) — это характеристика качества упаковки колонки, и на ее основании трудно построить хроматограмму. По-видимому, авторы имели в виду следующее: даже зная времена выхода пиков и их концентрацию, нельзя правильно изобразить на хроматограмме пик каждого вещества, так как ЧТТ для разных пиков могут отличаться, особенно в случае асимметричных пиков.

** Англ. United States Pharmacopeia (USP).

*** Pharmacopoeia Europaea (PhEUR).

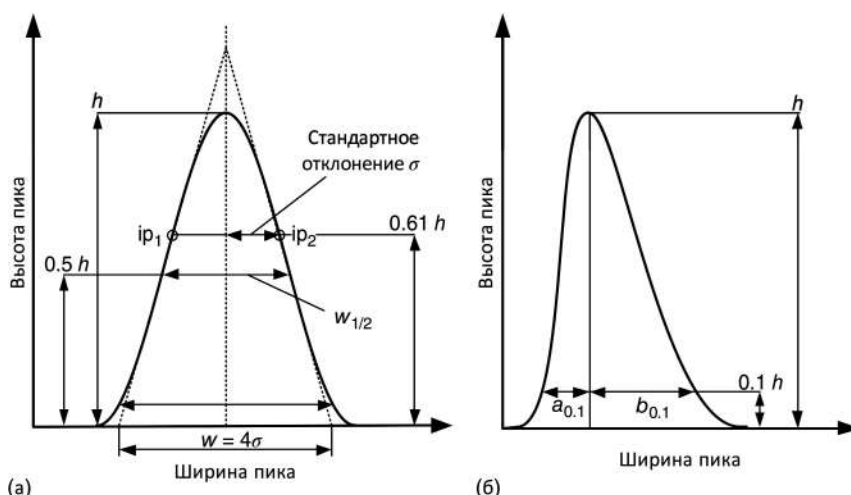


Рис. 2.6. Определение дисперсии гауссовых пиков (а) и оценка асимметрии пиков (б)

Поскольку эффективность является основной характеристикой хроматографического разделения, предпринимались многочисленные попытки описать ее более подробно для того, чтобы найти подходы для ее увеличения. Особый интерес представляет количественная оценка влияния скорости подвижной фазы, которая определяет необходимое для разделения время, на различные параметры размывания пика и, таким образом, на общую эффективность. Важным вкладом в этой области является вывод уравнения ван Деемтера [39] (уравнение (2.24))

$$HETP = A + \frac{B}{u_{int}} + C u_{int}. \quad (2.24)$$

Три члена уравнения (2.24) описывают различные эффекты, которые необходимо учитывать при выборе комбинации неподвижной и подвижной фаз в препаративной хроматографии, а также условий разделения (рис. 2.7).

Член A , который почти постоянен во всем диапазоне скоростей, в основном определяется вихревой диффузией. Она является следствием несовершенства упаковки колонн, а также сильно различающегося гранулометрического состава адсорбентов. Абсолютное значение члена A пропорционально среднему диаметру частиц. Поэтому высоту тарелки можно уменьшить, используя более мелкие частицы.

Гиперболический член B отражает влияние обратного перемешивания вследствие продольной диффузии молекул растворенного вещества в подвижной фазе. В препаративной хроматографии это акту-

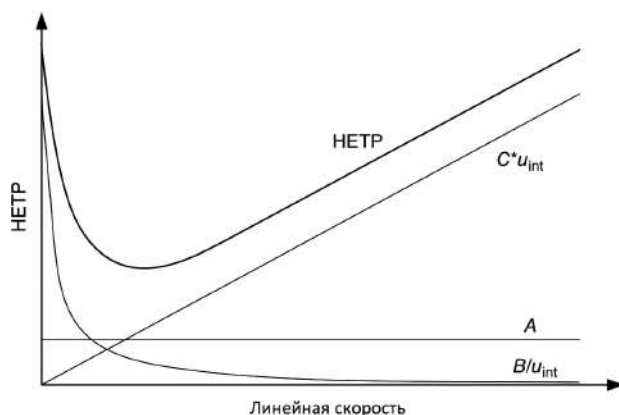


Рис. 2.7. Зависимость НЕТР от линейной скорости потока

ально только для адсорбентов с частицами больших размеров при низких скоростях потока. В большинстве случаев в препаративной хроматографии членом B можно пренебречь, так как скорости подвижной фазы достаточно велики. Поскольку продольная диффузия зависит от коэффициента диффузии растворенного вещества, на нее можно влиять, изменяя состав подвижной фазы. Для достижения более высоких коэффициентов диффузии следует отдавать предпочтение растворителям с низкой вязкостью. Последняя способствует и снижению давления в колонне.

Линейное увеличение высоты, эквивалентной теоретической тарелке, при более высоких скоростях потока описывается членом C . Это вызвано возрастающим влиянием все более значительного сопротивления массопереносу. Сопротивление массопереносу внутри пор нельзя уменьшить при увеличении скорости потока. Относительный вклад пор в общее размывание пика линейно увеличивается с ростом скорости потока. Угол наклона графика C зависит от природы упакованного сорбента. Чем лучше сорбент оптимизирован с точки зрения доступности пор и минимальной длины диффузионного пути, тем меньше вклад C и более высока эффективность колонны при высоких скоростях подвижной фазы.

Следует отметить, что помимо формулы (2.24) были предложены несколько более сложных уравнений для определения высоты, эквивалентной теоретической тарелке [22].

2.2.4. Разрешение

В аналитической хроматографии возможны деконволюция* перекрывающихся пиков и получение для них количественной информации. В препаративной хроматографии часто требуется полное разрешение пиков, если целевые компоненты должны быть выделены со 100%-ными чистотой и выходом.

Хроматографическое разрешение R_s — это мера того, насколько хорошо разделены два соседних пика одинаковой/сопоставимой** площади. Обычно разрешение рассчитывается по уравнению (2.25):

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R,j} + t_{R,i})}{w_i + w_j}, \quad (2.25)$$

где $t_{R,j}$ и $t_{R,i}$ — времена удерживания двух соседних пиков компонентов j и i , из которых компонент i элюируется первым ($t_{R,j} > t_{R,i}$), а w_j и w_i — ширина пиков этих компонентов ($w = 4\sigma$; см. рис. 2.6a). Разрешение 1,5 соответствует разделению до базовой линии в случае соприкасающихся пиков. При разрешении 1,0 еще наблюдается 3%-е перекрывание пиков.

Предположение об эквивалентности пиков, когда их ширина одинакова для обоих веществ, приводит к следующему соотношению между коэффициентами емкости k' (факторами удерживания), фактором разделения α и числом тарелок N :

$$R_s = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_j}{k'_j + 1} \right) \frac{\sqrt{N_j}}{4}. \quad (2.26)$$

* Опция программного обеспечения, позволяющая выделить на хроматограмме неполностью разрешенные пики и рассчитать их площадь, высоту и другие параметры. (Прим. перев.)

** Часто бывает, что у соседних пиков не очень сопоставимые площади, но это не мешает говорить о разрешении между ними. (Прим. перев.)

Обратите внимание, что индекс j принадлежит веществу с большим временем удерживания. Эквивалентное выражение для разрешения на основе менее удерживаемого компонента i :

$$R_s = \alpha - 1 \left(\frac{k'_i}{k'_i + 1} \right) \frac{\sqrt{N_i}}{4}. \quad (2.27)$$

Теоретически приведенные выше уравнения предполагают три возможности для увеличения разрешения. Увеличение коэффициента емкости k' имеет ограниченное применение, поскольку связано с более высоким временем удерживания и, таким образом, с возрастанием времени рабочего цикла, что снижает производительность. Это приводит не только к снижению пропускной способности, но и к большему размыванию пика и снижению эффективности колонны.

Два более привлекательных варианта оптимизации разрешения показаны на рис. 2.8. На рис. 2.8а показано разделение двух пиков, соответствующее коэффициенту разрешения $R_s = 0,9$. Эффективность колонны определяется «числом теоретических тарелок на единицу длины колонны», $N_L = N/L_c$, и составляет в данном случае $1000 \text{ } N_m^{-1}$, а селективность α равна 1,5. Первый подход оптимизирует гидродинамику колонны путем улучшения качества ее упаковки, уменьшения диаметра частиц сорбента или оптимизации скорости потока подвижной фазы. Полученная в результате хроматограмма показана на рис. 2.8б. Разрешение было увеличено до $R_s = 1,5$ в основном из-за более высокого числа тарелок $2000 \text{ } N_m^{-1}$. При использовании того же сорбента и подвижной фазы селективность остается равной 1,5. И наоборот, термодинамика системы может быть изменена путем оптимизации температурного режима или при изменении подвижной

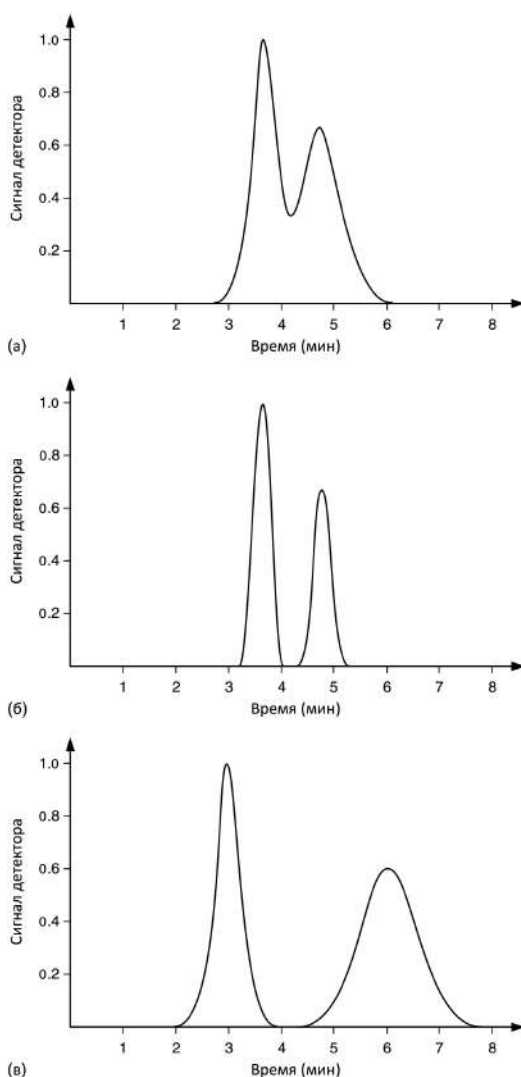


Рис. 2.8. Оптимизация разрешения пиков: исходное разделение (а); повышение эффективности за счет более мелких частиц адсорбента (б); повышение селективности разделения (в)

фазы и/или сорбента. На рис. 2.8в показан результат этого «термодинамического» подхода. Число тарелок на единицу длины колонны по-прежнему равно $1000 \text{ } N_M^{-1}$, но селективность увеличилась до 2,0, что привело к увеличению разрешения также до 1,5.

Два указанных выше подхода к оптимизации по-разному влияют на стоимость препаративного процесса разделения. Эффективность увеличивается за счет уменьшения диаметра частиц неподвижной фазы. Однако стоят такие сорбенты гораздо дороже; возрастают и расходы на оборудование, которое должно обеспечивать более высокое давление для работы с частицами меньшего диаметра. Следовательно, выгодно оптимизировать селективность (глава 4).

Используя формулы (2.26) и (2.27), также можно вычислить число теоретических тарелок, необходимое для данного разрешения (уравнение (2.28)):

$$N = 16 \cdot R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_j}{k'_j} \right)^2. \quad (2.28)$$

На рис. 2.9 показана зависимость необходимого числа теоретических тарелок для двух значений разрешения (1,5 и 1,0) от селективности. Для систем с селективностью $< 1,2$ необходимое количество тарелок очень велико. Поскольку более высокое число тарелок связано с системами высокого давления и с мелкими частицами сорбента, такое разделение, очевидно, приводит к более высоким затратам по сравнению с разделением, в котором селективность выше. Это подчеркивает необходимость тщательного подбора условий для достижения высокой селективности.

Другим важным параметром в препаративной хроматографии является величина давления, которое следует минимизировать для того, чтобы можно было использовать как можно большие скорости потока.

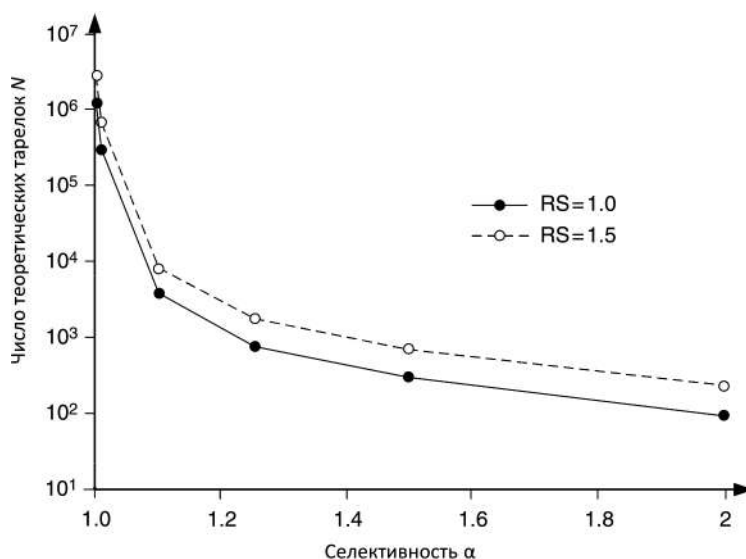


Рис. 2.9. Влияние селективности на эффективность для двух различных значений разрешения R_s (уравнение (2.28))

2.2.5. Падение давления

В химической технологии хорошо известно уравнение Эргуна (уравнение (2.29*)) для расчета коэффициента трения и соответствующего падения давления в неподвижных слоях гранулированных частиц. Оно применимо для широкого диапазона размеров частиц от мелких до крупных [5]:

$$\psi = \frac{150}{R_e} + 1,75. \quad (2.29)$$

Для хроматографических колонок используются мелкие частицы, их форма близка к сферической. Следовательно, числа Рейнольдса очень малы и инерционными силами можно пренебречь. Тогда правая часть уравнения (2.29) сводится к своему первому члену, определяющему перепад давления, обусловленный только силами вязкости (внутреннего трения). Уравнение (2.30) связывает коэффициент трения с падением давления:

$$\psi = \frac{\varepsilon_e^3}{(1-\varepsilon_e)^2} \frac{\Delta p}{\rho u_0^2} \frac{d_p}{L_c}, \quad (2.30)$$

где u_0 — скорость в пустой колонке (приведенная скорость), определяемая уравнением (2.31):

$$u_0 = \frac{\dot{V}}{A_c} = \frac{\dot{V}}{\pi d_c^2 / 4} = \varepsilon_e \cdot u_{int}. \quad (2.31)$$

Подставляя уравнение (2.30) в уравнение (2.29), получаем следующее выражение**:

$$\Delta p = 150 \frac{(1-\varepsilon_e)^2}{\varepsilon_e^3} \cdot \frac{u_0 L_c}{d_p^2}. \quad (2.32)$$

* Уравнение (2.29) определяет зависимость коэффициента трения (в данном случае коэффициента гидравлического сопротивления при движении потока в слое зернистого материала) от числа Рейнольдса. Приведенное уравнение (2.29) является одной из форм записи уравнения Эргуна, общий вид которого

$$\frac{\Delta P}{L_c} = 150 \frac{(1-\varepsilon_e)^2}{\varepsilon_e^3} \frac{\eta u_0}{d_p^2} + 1,75 \frac{(1-\varepsilon_e)}{\varepsilon_e^3} \frac{\rho u_0^2}{d_p}.$$

Согласно этому уравнению перепад давления представляет собой сумму двух составляющих — потеря напора за счет сил вязкости и потери напора, обусловленной потерей кинетической энергии потока при его движении между частицами упакованного слоя. При малых значениях числа Рейнольдса потеря напора, обусловленная потерей кинетической энергии потока, относительно мала и ею можно пренебречь. В этом случае уравнение Эргуна принимает вид

$$\frac{\Delta P}{L_c} = 150 \frac{(1-\varepsilon_e)^2}{\varepsilon_e^3} \frac{\eta u_0}{d_p^2}$$

и из него легко получить уравнение (2.32), определяющее падение давления. (Прим. перев.)

** Если выразить число Рейнольдса Re через соответствующие параметры, указанные в таблице «Определение безразмерных параметров» в конце раздела «Обозначения» (Прим. перев.)

Это уравнение соответствует хорошо известному закону Дарси (уравнение (2.33)) [16]:

$$\Delta p = \frac{1}{k_0} \frac{\eta u_0 L_c}{d_p^2}. \quad (2.33)$$

Ключевой коэффициент k_0 отражает конкретную ситуацию в колонке:

$$k_0 = \frac{\varepsilon_e^3}{150 \cdot (1 - \varepsilon_e)^2}. \quad (2.34)$$

Этот коэффициент обычно составляет от $0,5 \cdot 10^{-3}$ до $2 \cdot 10^{-3}$. Например, когда доля колонки, заполненная подвижной фазой, составляет 0,4, это приводит к соответствующему значению коэффициента $1,2 \cdot 10^{-3}$. Если требуются более точные значения, необходимо измерить k_0 для данной упаковки.

Еще один параметр из уравнения Дарси, который часто используется для характеристики колонки, — проницаемость колонки B (формула (2.35)):

$$B = \frac{\eta u_0 L_c}{\Delta p}. \quad (2.35)$$

Если сравнить формулы (2.33) и (2.35), видно, что проницаемость связана с k_0 соотношением

$$B = k_0 \cdot d_p^2. \quad (2.36)$$

Измерения падения давления используются для проверки стабильности слоя сорбента в колонке в зависимости от скорости потока элюента. Отклонения от линейности при увеличении и уменьшении скорости потока служат признаком необратимых изменений в слое сорбента. Также важно отметить линейную зависимость между падением давления и вязкостью. Перепад давления в высокоэффективных колонках может превышать 100 бар. Следовательно, вязкость также является важным критерием при выборе элюента. Для качественной упаковки колонны сорбентом необходимо выбирать жидкость с низкой вязкостью. Если в качестве элюента используется этанол, то для упаковки можно использовать метанол, поскольку его вязкость в 1,9 раза ниже. Следует учитывать, что для смесей спирт/вода зависимость вязкости от состава нелинейна. Соответствующие данные для метанола, этанола, н-пропанола и ацетонитрила приведены на рис. 4.7. Уравнение (2.32) указывает на влияние доли колонки, занятой подвижной фазой, на перепад давления. Эта доля может значительно различаться при упаковке колонны частицами различного диаметра. Поэтому для аналитических колонок диапазон гранулометрического состава хроматографических сорбентов следует выбирать в узком диапазоне от 1,7 до 2,5 мкм (раздел 3.6.3). Для препаративных колонок, часто упакованных частицами диаметром 10–20 мкм, размер частиц может колебаться в гораздо более широких пределах.

2.3. Массоперенос и гидродинамика

Как правило, в результате препаративного и промышленного хроматографического разделения целевые компоненты должны быть максимально концентрированными. Гипотетическая идеальная ситуация — это прямоугольный профиль зоны продукта

на выходе из колонны такой же ширины, что и профиль исходной смеси, вводимой в колонну. В реальности такого поведения добиться невозможно. При любых условиях разделения нарушается равномерность распределения жидкости, что приводит к увеличению времен удерживания растворенных веществ (возрастает дисперсия σ^2). Гидродинамические эффекты, которые вносят вклад в общее размывание зоны вещества, часто определяют термином «аксиальная дисперсия». На рис. 2.10 показано влияние аксиальной дисперсии. Дополнительное размывание пика может быть обусловлено конечными скоростями адсорбции и десорбции и сопротивлением массопереносу.

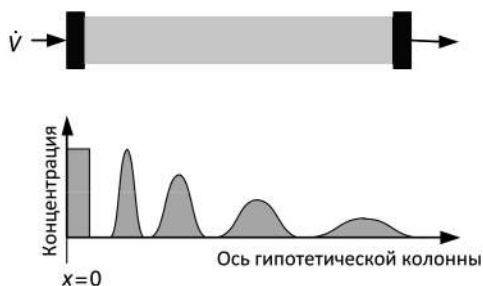


Рис. 2.10. Размывание зоны вещества в колонне вследствие аксиальной дисперсии

На рис. 2.10 показано, как прямоугольная зона вещества, наносимого на колонну ($x = 0$), симметрично уширяется по мере продвижения по колонке. В результате этого уширения уменьшается максимальная концентрация растворенного вещества, что вызывает неблагоприятное разбавление фракции целевого продукта.

Ниже рассматриваются основные факторы, влияющие на аксиальную дисперсию.

2.3.1. Принципы массопереноса

В большинстве хроматографических промышленных систем используются сорбенты, состоящие из частиц со специфической структурой пор, которые обеспечивают возможность более высокой нагрузки по сравнению с непористыми адсорбентами. Адсорбция молекул целевых продуктов на внутренней поверхности частицы адсорбента оказывает существенное влияние на эффективность препаративного разделения. Рассматривая массоперенос, можно выделить несколько факторов, способствующих размыванию пика (рис. 2.11), а именно:

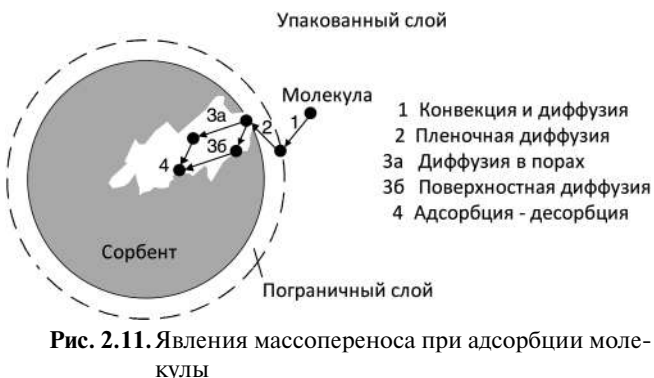


Рис. 2.11. Явления массопереноса при адсорбции молекулы

- перенос к частицам адсорбента за счет конвекции и диффузии;
- диффузия в пограничном пленочном слое вокруг частиц, где течение подвижной фазы ламинарное;
- диффузия в порах частиц (а) и по поверхности пор (б);
- кинетика стадий адсорбции и десорбции.

Отдельные частицы сорбента в упакованном слое окружены пограничной пленкой жидкости, которая рассматривается как стагнантная жидкая фаза. Толщина

пленки зависит от распределения жидкости в объеме упакованного слоя. Перенос молекул к пограничному слою частицы за счет конвекции или диффузии является первым этапом (1) процесса разделения.

Второй этап представляет собой диффузионный перенос молекулы растворенного вещества через пограничную пленку. Он называется пленочной диффузией (2). Транспорт молекул растворенного вещества к центрам адсорбции внутри системы пор частиц сорбента является третьим этапом процесса адсорбции. На этом этапе возможны два различных механизма переноса: диффузия в порах (3а) и поверхностная диффузия (3б); они могут действовать раздельно или параллельно друг другу.

Если массоперенос происходит за счет поверхностной диффузии (3б), молекула растворенного вещества адсорбируется и переносится глубже в систему пор, двигаясь вдоль поверхности пор. В течение всего процесса переноса молекулы находятся в пределах действия сил притяжения поверхности сорбента. Примечательно, что силы притяжения между поверхностью и адсорбированными молекулами часто настолько велики, что для многих распространенных систем адсорбтив – адсорбент, встречающихся в препаративной хроматографии, поверхностная диффузия неактуальна [33].

Диффузия в порах (3а) обусловлена ограниченной диффузией молекул растворенного вещества в свободном объеме пор, описываемой законами Фика. В процессе переноса молекулы растворенного вещества находятся вне сил притяжения поверхности адсорбента.

Как только молекула растворенного вещества достигает свободного адсорбционного центра на поверхности, происходит фактическая адсорбция (4). Если адсорбционные процессы (1–4) протекают медленно по сравнению с конвекционным потоком жидкости через упакованный слой, элюируемые пики несимметрично размываются. Из-за медленного движения тех молекул растворенного вещества, которые проникают глубже в систему пор, может наблюдаться значительное размывание заднего фронта пика.

В жидкой фазе внешний массоперенос (1) и адсорбция – десорбция (4) обычно протекают относительно быстро [33, 17]. Процессами, ограничивающими скорость разделения, обычно являются пленочная диффузия (2) и массоперенос внутри системы пор (3а, 3б).

Для частиц диаметром >5 мкм, которые применяются в большинстве препаративных хроматографических разделений, сопротивление переносу внутри пор является доминирующим вкладом в общее сопротивление массопереносу [26, 27].

На описанные выше факторы переноса влияют морфология частиц адсорбента, а также химический состав их поверхности. Размер пор влияет на хроматографические свойства двумя основными способами. Первый эффект обусловлен стерическими затруднениями. Молекулы могут проникать только в поры, размер которых больше определенного предельного значения. Для более крупных молекул теоретически достижимая площадь поверхности доступна только частично. Второй фактор связан с распределением пор по размерам. Поскольку транспорт внутри мезопористой системы носит диффузный характер, размывание пиков резко увеличивается, когда поры частиц сорбента существенно различаются по размеру. Это связано с тем, что молекулы в порах большего размера имеют меньшее время удерживания, чем молекулы, адсорбированные в порах меньшего размера.

В идеальном сорбенте все адсорбционные центры должны быть одинаковыми и пространственно доступными, чтобы расстояния, преодолеваемые молекулами

при диффузии, оставались небольшими. Это предварительное условие означает: предпочтительно, чтобы все поры были одинакового размера, отсутствовали глубокие тупиковые поры и все поры были одинаково доступны для конвективного потока элюента в упакованном слое.

Упомянутые выше факторы указывают на то, что идеальные хроматографические сорбенты должны иметь большую площадь поверхности, но умеренные объем и размеры пор (которые достаточно велики, чтобы обеспечить доступность для адсорбирующихся молекул), поскольку эти три физических параметра взаимосвязаны. Их нельзя регулировать независимо друг от друга. Их взаимозависимость определена в уравнении Уиллера, при выводе которого предполагается, что диаметры пор частиц постоянны. В уравнении (2.37) d_{pore} — диаметр поры (нм), V_{pore} — объем поры ($\text{мл} \cdot \text{г}^{-1}$), а S_{BET} — удельная площадь поверхности ($\text{м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$):

$$d_{\text{pore}} = 4000 \frac{V_{\text{pore}}}{S_{\text{BET}}}. \quad (2.37)$$

Разработка сорбента для препаративной хроматографии всегда предполагает компромисс между большой площадью поверхности (с возможностью высокой нагрузки и ограниченной механической прочностью) и высокой механической прочностью (с уменьшенной площадью поверхности). Следует отметить, что, определяя возможность диффундировать в поры частиц, размеры пор влияют на эффективность разделений через член C уравнения Ван-Деемтера, приведенного выше (уравнение (2.24)).

2.3.2. Распределение жидкости в колонке

Критическими точками для аксиальной дисперсии в колоночной хроматографии являются распределение жидкости на входе в колонку и сбор фракций на выходе из колонки (раздел 10.3.2.2). Этим факторам следует уделять большое внимание, особенно в случае колонн большого диаметра. Распределение жидкости на входе в колонку в значительной степени определяется перепадом давления в уплотненном слое, под действием которого разделяемое вещество радиально распределяется внутри входного фильтра. Поэтому важно использовать высококачественные фильтры, обеспечивающие равномерное радиальное распределение жидкости. В хроматографии низкого давления с большими размерами частиц сорбента, а также в колонках с новыми типами сорбентов, такими как монолитные насадки, в которых перепады давления гораздо меньше, распределение жидкости имеет еще большее значение. Производители колонок разработали несколько подходов к оптимизации распределения для решения проблемы распределения потока при низком давлении. Внедрение специально разработанных распределителей жидкости значительно улучшило ситуацию (раздел 10.3.2.2).

Причины неравномерного распределения жидкости можно разделить на макроскопические, мезоскопические и микроскопические [38]. Эти различные эффекты показаны на рис. 2.12.

Отклонение распределения жидкости от идеального на микроскопическом уровне вызвано динамической адгезией жидкости к частицам сорбента внутри микроскопических каналов упакованного слоя. Адгезия приводит к более высокой скорости жидкости в середине потока по сравнению с областями, близкими к твердой поверх-

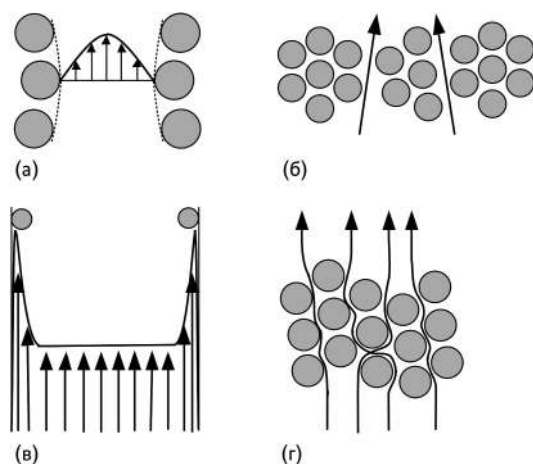


Рис. 2.12. Причины нарушения равномерности распределения жидкости в соответствии с работой [38]: (а) на микроскопическом уровне, (б) на мезоскопическом уровне, (в) на макроскопическом уровне и (г) вследствие вихревой диффузии. Воспроизведено с разрешения издательства Elsevier

ности (рис. 2.12а). Таким образом, молекулы разделяемого вещества в середине потока имеют меньшее время удерживания, чем молекулы, движущиеся у стенок колонки.

Локальные неоднородности пористости являются вторым источником возрастания разброса среднего времени удерживания. Образование агломератов мелких частиц, непроницаемых для потока жидкости, является еще одной причиной аксиальной дисперсии. На рис. 2.12б представлено это отклонение распределения жидкости от идеального на мезоскопическом уровне. Этот эффект приводит к локальным различиям в скорости потока и в длине пути молекул разделяемого вещества, проходящих непосредственно сквозь агломераты частиц,

по сравнению с молекулами, огибающими их. Второй эффект называют вихревой диффузией (рис. 2.12г). Из-за сходного происхождения это статистическое явление также относят к мезоскопическим гидродинамическим эффектам.

Несовершенство макроскопического распределения жидкости вызвано локальными неоднородностями пустот между частицами, которые особенно вероятны в области стенок колонки (рис. 2.12в).

Все вышеупомянутые эффекты вызывают уширение пиков и вносят дополнительный вклад в общее размывание зоны вещества помимо сопротивления массопереносу, о котором пойдет речь далее*.

2.3.3. Дефекты упаковки

Дефекты не позволяют упаковать сорбент в хроматографическую колонку оптимальным образом с получением плотного гексагонального упакованного слоя. Эти дефекты можно разделить на явления, обусловленные процедурой упаковки и свойствами самого сорбента. Упаковка сопряжена с несколькими такими явлениями, из которых наиболее важны пристеночный эффект и образование мостиков частиц. Авторы работы [23] установили, что пристеночный эффект влияет на эффективность колонки в слое толщиной около 30 др. Следовательно, на это явление следует обратить особое внимание при использовании колонок малого диаметра. Чем больше диаметр колонки, тем меньше этот эффект. Вторая причина, которая может привести к дефектам упаковки сорбента в колонку, — это неправильная процедура упаковки. Если частицы не могут расположиться оптимальным образом в процессе упаковки, они образуют

* Сопротивление массопереносу уже рассматривалось в разделе 2.3.1. (Прим. перев.)

мостики, которые можно разрушить только под действием огромного направленного вдоль оси колонки давления. При этом возникает опасность повреждения частиц. Одним из способов уменьшить образование мостиков является упаковка колонки под вакуумом с последующей аксиальной компрессией осевшего слоя. Для получения дополнительной информации см. раздел 10.5.

Недостаточное сжатие упакованного слоя, которое приводит к образованию пустот на входе в колонну, является еще одним источником аксиальной дисперсии. Таким образом, компрессия упакованного слоя способствует более высокому качеству препаративных колонн.

2.3.4. Внеколоночные эффекты

Каждый внеколоночный объем, включающий объемы соединительных капилляров, а также объем ячейки любого детектора, расположенного между точкой ввода образца и точкой отбора фракций, способствует аксиальной диффузии образцов и, таким образом, снижает концентрации полученных целевых продуктов и эффективность разделения. Очевидно, что следует минимизировать длину соединительных капилляров. Важно обеспечить плотное соединение капилляров и колонки, избегая мертвых зон, где может накапливаться жидкость и особенно образец. Диаметр капилляров зависит от скорости потока в системе, и его надо выбирать в соответствии с давлением в системе. Капилляры должны как можно меньше влиять на падение давления в системе и не создавать дополнительный мертвый объем.

2.4. Термодинамика состояния равновесия

2.4.1. Определение изотерм

Наиболее важным отличием аналитической хроматографии от препаративной является расширение рабочего диапазона до нелинейной области изотерм адсорбции. Поэтому без информации о поведении отдельных веществ, а также их смесей в широком диапазоне концентраций не обойтись.

Как и любое другое фазовое равновесие, адсорбционное равновесие определяется равенством химических потенциалов всех взаимодействующих компонентов во всех фазах. Более подробное описание основ термодинамики можно найти в литературе [33, 17].

Знание количества, адсорбированного на твердой поверхности вещества, имеет ключевое значение для количественной оценки хроматографических процессов. Поверхностная концентрация может быть определена как отношение количества адсорбированного вещества к площади поверхности адсорбента в моль·м⁻² или г·м⁻². Однако площадь внутренней поверхности адсорбента трудно определить, поскольку она зависит от природы и размера молекул разделяемых веществ. Рекомендуется вместо этого рассматривать отношение количества адсорбированного вещества к массе или объему адсорбента. Тогда нагрузка выражается в моль·г⁻¹ (или г·г⁻¹) или моль·л⁻¹·(г·л⁻¹). Как обсуждалось выше, объем адсорбента может быть выражен через общий объем адсорбента, V_{ads} , или через объем твердого адсорбента, $V_{solid} = V_{ads} - V_{pore}$ (уравнение (2.2)). В уравнении (2.38) $c_{p,i}$ представляет собой концентрацию вещества i