

УДК 661.12+543.544

## Хроматография в отечественной фармацевтической промышленности

С. М. Староверов

*СЕРГЕЙ МИХАЙЛОВИЧ СТАРОВЕРОВ — доктор химических наук, заведующий лабораторией «Новые химические технологии для медицины», кафедра химической энзимологии Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Генеральный директор ЗАО «БиоХимМак СТ». Область научных интересов: анализ лекарственных веществ, хроматография.*

*119899 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, БиоХимМак СТ,  
E-mail starover@bcm.chem.msu.ru*

В 2005 году в практику отечественной фармацевтической промышленности предусмотрено введение международных GMP-нормативов (Good Manufacturing Practice) на технологию и качество продукции, но уже сегодня существенно увеличивается потребность фармацевтической промышленности в системах аналитической и препаративной жидкостной хроматографии. Современные хроматографические ВЭЖХ-системы позволяют не только контролировать качество сырья и готовых лекарственных препаратов, они используются также в технологических процессах разделения и очистки многокомпонентных смесей широкого круга лекарственных веществ различного действия.

Высокоэффективная жидкостная хроматография может в значительной мере помочь решить проблемы, накопившиеся в отечественном фармацевтическом производстве за последнее десятилетие, связанные с производством чистых субстанций. С одной стороны, метод ВЭЖХ позволяет доводить до необходимых требований чистоты относительно дешевые, но зачастую некачественные субстанции, в частности, приобретаемые в странах Азии. С другой стороны, на применении промышленной ВЭЖХ базируются новые или воссоздаваемые технологии получения и выделения лекарственных веществ, в том числе синтетических и природных пептидов, геноинженерных продуктов.

Попытки внедрения зарубежных технологических процессов выделения той или иной субстанции не всегда приводят к успеху, к тому же

импорт технологии всегда связан со значительными, зачастую неоправданными финансовыми затратами. В России и, в частности, фирмой «БиоХимМак СТ» накоплен значительный опыт применения промышленной ВЭЖХ в фарминдустрии, позволяющий найти оптимальные решения на основе отечественных технологий.

Понятие промышленного масштаба определяется прежде потребностями в том или ином виде продукта. Зачастую одна хроматографическая колонна диаметром 50 мм способна производить продукцию, обеспечивающую потребности целых регионов. Тем не менее, это скорее лабораторный или пилотный масштаб. Для реализации действительно промышленного масштаба нужны ВЭЖХ-системы с колоннами диаметром от 100 до 600 мм.

### Аппаратурное оформление промышленной хроматографии

Для решения задач промышленной ВЭЖХ могут быть использованы хроматографические колонны и системы следующих типов.

**Колонны аксиального сжатия**, фирмы-изготовители: «NovaSep» (Франция), «Amersham» (Швеция), «Varian» (США) и др.

Эффективная упаковка сорбента в колонне достигается путем дополнительного сжатия слоя сорбента вдоль оси колонны при перемещении внутреннего поршня. Усилие сохраняется и в процессе разделения. Такая конструкция позволяет потребителю самостоятельно перезаполнять

колонну выбранным им сорбентом, что обеспечивает гибкость производства.

**Колонны радиального сжатия**, фирмы-изготовители: «BioTage» (США), «Waters» (США).

Эффективная упаковка сорбента в таких колоннах достигается за счет дополнительного сжатия заполненного сорбентом пластикового картриджа в направлении, перпендикулярном оси колонны. Давление создается в пространстве между стенкой картриджа и металлическим держателем картриджа. Потребитель обычно использует готовые картриджи, поставляемые фирмой-изготовителем системы. Это ограничивает выбор используемых сорбентов, но зато избавляет потребителя от необходимости самому упаковывать колонны. Одну из наиболее известных пилотно-промышленных установок этого типа Kilorger производит фирма «BioTage» по лицензии фирмы «Waters». Лабораторный вариант той же системы Deltarger продолжает выпускать фирма «Waters».

**Хроматографические системы с симулированным движением неподвижной фазы** (SMB-системы, Simulated Moving Bed), фирмы-изготовители: «UOP» (США), «NovaSep» (Франция), «Кнауер» (Германия).

Симулированное противоточное движение сорбента и подвижной фазы достигается за счет применения специальных систем переключения потоков вводимой пробы и выводимых разделенных компонентов. Этот метод, разработанный в 1960-е годы фирмой «UOP», нашел широкое применение в нефтехимической и пищевой промышленности, где SMB-установки достигают поистине гигантских размеров (высота колонн до 20—25 м при диаметре до 5—10 м) и производительности до нескольких тонн очищенного продукта в день. В 1990-е годы фирма «NovaSep» выпустила на рынок SMB-установки для фармацевтической промышленности, разработанные с учетом специфики производства в этой отрасли. Фирма «Кнауер» также изготавливает компактные пилотные SMB-системы производительностью до 1000 кг в год, в которых, в отличие от предыдущих систем, переключение потоков осуществляется специальным многоходовым краном. В этих системах используется до 16 колонн традиционной конструкции диаметром 10—50 мм.

Наряду с ВЭЖХ в фармацевтической промышленности находит применение и классиче-

ская колоночная хроматография, использующая сорбенты с размером частиц 30—200 мкм. Крупнозернистые сорбенты применяются, прежде всего, на ранних стадиях очистки и выделения целевых компонентов из биологических жидкостей и при очистке белков с использованием мягких полимерных сорбентов (фирма «Amersham», Швеция). Техника аксиального и радиального сжатия эффективна также и для сорбентов с крупными частицами.

ВЭЖХ и традиционная колоночная хроматография не конкурируют, а скорее дополняют друг друга. Правильный выбор технологического подхода для каждой стадии выделения продукта в значительной степени определяет экономическую эффективность процесса в целом.

### **Сорбенты нового поколения для промышленной ВЭЖХ**

При оценке возможности использования того или иного сорбента в процессах промышленного разделения на первый план выходят три основных требования.

Первое из этих требований — воспроизводимость свойств сорбента. Дело в том, что в производственных условиях ограничены возможности изменения выбранных технологических приемов очистки. Зачастую стоимость вещества, выделяемого в одном хроматографическом цикле, достигает десятков-сотен тысяч долларов. Поэтому воспроизводимость свойств сорбента является, пожалуй, главным фактором в конкурентной борьбе фирм-производителей сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Не менее важна химическая и механическая стабильность сорбентов. Это требование обусловлено прежде всего экономическими соображениями. Стоимость сорбента для обращенно-фазного хроматографического процесса, реализуемого, например, в колонне диаметром 40 см и длиной 50 см, может превышать 100000 долларов. Количество хроматографических циклов (разделение-регенерация), которое может выдержать сорбент, в значительной степени определяет конечную стоимость очищенного продукта.

Третье важное требование касается нагрузочной емкости сорбента. Не все сорбенты, хорошо зарекомендовавшие себя в аналитической ВЭЖХ, столь же эффективно работают при высоких

**ЗАО «БиохимМак СТ» — производитель препаративных колонн традиционной конструкции диаметром до 50 мм и колонн аксиального сжатия диаметром 100 мм. Являясь официальными представителями фирм «Кнауер» и «BioTage» ЗАО «БиохимМак СТ» поможет Вам оптимизировать любой из описанных выше подходов для решения Ваших задач.**

нагрузках колонны. Механизм разделения в технологических процессах при высоких нагрузках более сложен, чем в случае аналитического разделения. В то же время чем выше величина нагрузки на колонку, тем экономичнее процесс разделения и ниже стоимость очищенного продукта.

Кроме упомянутых выше основных параметров сорбентов, на экономичность процесса влияют и другие факторы, такие как, инертность поверхности сорбента, узость фракционного состава, форма частиц, доступные в промышленных масштабах количество и ассортимент фаз.

За последнее десятилетие произошли существенные изменения в качестве промышленных сорбентов для ВЭЖХ. Технология их получения аккумулирует все лучшее, что достигнуто в производстве сорбентов для аналитической ВЭЖХ. Сорбенты с частицами нерегулярной формы практически полностью вытеснены с рынка сферическими сорбентами на основе сверхчистого силикагеля.

Обычно фирмы-производители предлагают аналогичные по характеристикам наборы сорбентов с диаметром частиц в диапазоне 3–10 мкм для аналитических разделений и более крупнозернистые для препаративных и технологических целей. Широко используются силикагели с привитыми поверхностными группами. Хорошо отлаженная технология химического модифицирования силикагелей позволяет обрабатывать большие количества сорбента и обеспечивает высокую плотность прививки и инертность поверхности. Промышленные партии ВЭЖХ сорбентов для технологических процессов проходят жесткое тестирование для контроля воспроизводимости их свойств и химической стабильности.

В качестве примера приведем некоторые характеристики сорбентов марки Kromasil производства фирмы «Eka Chemicals AB, Separation Products» (Швеция), одной из ведущих мировых производителей модифицированных кремнеземных сорбентов для промышленных целей. Фирма производит партии сорбентов от 100 кг и более при годовом производстве несколько тонн. В 2002 году в эксплуатацию введено новое производство сорбентов еще большей мощности. Для потребителя очень важен выпуск больших единичных партий сорбента, которые могут обеспечить заполнение промышленных колонн полностью однородным сорбентом. Легко подсчитать, что для заполнения колонны диаметром 600 мм и длиной 1 м требуется 270 литров или более 135 кг сорбента.

Основой выпускаемых сорбентов служит кремнезем с идеально сферическими частицами размерами 3,5; 5; 7; 10; 13 и 16 мкм. Различные по размерам фракции сорбента имеют совер-

шенно идентичные свойства. Это позволяет легко менять масштаб процесса (без потери его эффективности) — от аналитического разделения к препаративному и далее к промышленному. Сорбенты со сферической формой частиц, по сравнению с сорбентами с частицами нерегулярной формы, оказывают более низкое сопротивление потоку подвижной фазы в колонне и, следовательно, требуют меньшего давления при работе. Это обеспечивает более экономичную работу всей хроматографической системы. Сферические частицы имеют более высокую механическую прочность, что особенно важно при резких перепадах давления и механических воздействиях на сорбент, например, при упаковке колонн. Механическая прочность частиц сорбента также зависит от объема и размера пор сорбента и от технологии его получения. Обычно механическая прочность сорбента снижается с увеличением диаметра и объема пор, но при этом возрастает нагрузочная емкость сорбента, что очень важно для достижения высокой производительности хроматографической системы.

Нагрузочная емкость сорбента определяется, главным образом, его удельной поверхностью, размером пор и распределением пор по размерам.

Для достижения максимальных нагрузочных характеристик выбранного сорбента должно обеспечиваться оптимальное соотношение этих параметров, а также учитываться размеры молекул в разделяемой смеси. Для большинства сорбентов Kromasil используется силикагелевая матрица с удельным объемом пор около 0,9 мл/г при среднем диаметре пор 10–11 нм и удельной поверхности 290–340 м<sup>2</sup>/г. При таком сочетании этих параметров удается совместить высокую механическую прочность с высокой нагрузочной емкостью сорбентов.

Важной характеристикой модифицированных силикагелей является их химическая стабильность. Высокая химическая стойкость сорбента обеспечивает более длительную его эксплуатацию, малое изменение времен удерживания и селективности в ходе работы, меньшее содержание в конечном продукте веществ, образующихся при деградации сорбента.

Стабильность современных сорбентов на основе силикагеля удалось значительно улучшить за счет применения чистотой матрицы, однородности и нейтральности силанольных групп, а также благодаря новым подходам к химическому модифицированию, обеспечивающим в промышленном масштабе высокую плотность прививки модифицирующего агента. Современные сорбенты, используемые в обращенно-фазном варианте хроматографии, обычно достаточно стабильны в пределах pH 2–8.

Химическую стабильность модифицированных кремнеземов в щелочной среде наглядно

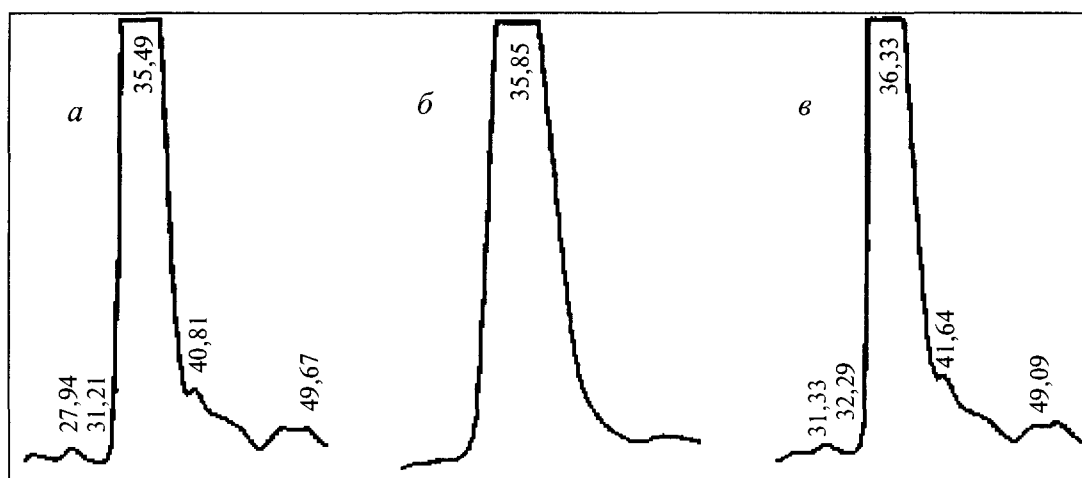


Рис. 1. Хроматограммы, полученные при очистке свиного инсулина с проведением регенерации сорбента.

Нагрузка 12 г препарата на 1 л сорбента; а — первый ввод пробы,  $p = 35$  бар; б — после 50 вводов пробы,  $p = 65$  бар; в — после регенерации колонны раствором 0,1 М NaOH/ EtOH (4:6), прокачено пять объемов элюента,  $pH = 13$ ,  $p = 35$  бар

демонстрируют хроматограммы, представленные на рис. 1. В процессе очистки инсулина на сорбенте накапливаются прочно удерживаемые полимерные примеси, которые приводят к увеличению давления в колонке и снижению селективности процесса. Промывка щелочным раствором ( $pH = 13$ ) обеспечивает очистку сорбента и восстановление характеристик разделения. Исследования показывают, что современные силикагелевые сорбенты сохраняют свои характеристики даже после пропускания 10–30 объемов щелочного элюента.

Содержание продуктов деградации сорбента при использовании высококачественных промышленных обращенно-фазных сорбентов незначительно (до 4 ppm) даже при пропускании через колонну 100 объемов элюента с предельными значениями  $pH$  (2 и 8).

#### Примеры использования пилотно-промышленной ВЭЖХ в отечественной практике

В середине 1980-х годов в нашей стране были проведены обширные исследования по применению препаративной хроматографии для очистки соединений различного строения и происхождения. Однако финансовые трудности последующего периода не позволили реализовать эти разработки на практике. Лишь отдельные организации и предприятия продолжали развивать данное направление как в научно-исследовательском плане, так и в плане создания реальных масштабных хроматографических процессов.

Фирма «БиоХимМак СТ» организовала производство отечественных препаративных колонн лабораторно-пилотного масштаба диаметром до 50 мм, а к концу 1990-х годов выпустила колонны аксиального сжатия диаметром 10 см, что позволяет наладить промышленную наработку целого ряда соединений. Сорбенты серии «Диасорб» на основе несферической матрицы и сорбенты серии «Диасфер» на основе высокоочищенного сферического силикагеля используются для производства высокоочищенных синтетических пептидов, низкомолекулярных белков природного и геноинженерного происхождения, полипептидов и соединений стероидного строения.

Хроматограммы на рис. 2 иллюстрируют возможности применения обращенно-фазной ВЭЖХ в производстве полусинтетического инсулина.

Важным примером использования химически модифицированных кремнезёмов в отечественном промышленном производстве фармацевтических препаратов являются технологии получения высокоочищенных вирусных препаратов. В частности, в производстве вакцин против гриппа, клещевого энцефалита, бешенства, вирусного гепатита В эффективная очистка достигается методом гель-проникающей хроматографии на модифицированных силохромах и макропористых стеклах. Хроматографическая технология очистки вирусов гриппа и бешенства реализована в середине 1980-х годов на предприятии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, на Уфимском предприятии вакцин и сывороток

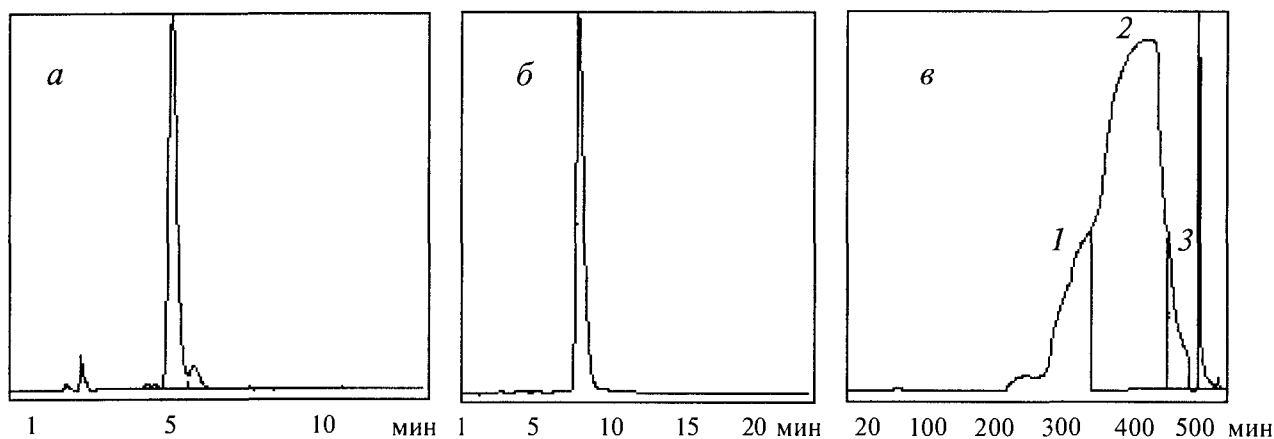


Рис. 2. Хроматограммы, полученные при очистке инсулина (человека) на сорбенте Диасфер С-18:

*a* — инсулин-сырец (чистота 90,6%); *б* — высокоочищенный инсулин (чистота 98,01%); условия для *a* и *б*: колонка 4×250 мм, диаметр частиц сорбента 6 мкм, градиентное элюирование ацетонитрилом; *в* — инсулин-сырец, колонка 100×330 мм, диаметр частиц сорбента 15 мкм, градиентное элюирование изопропиловым спиртом (2 — целевая фракция)

и на Омутнинском комбинате. Технология очистки вируса клещевого энцефалита внедрена в 2001 г. на предприятии «Вирион» (г. Томск). Результатом процесса гель-хроматографической очистки является снижение на три порядка содержания белковых примесей, вызывающих побочные действия вакцин.

#### Аналитическая ВЭЖХ в производстве и сфере обращения лекарственных препаратов

Методы аналитической ВЭЖХ требуются для контроля производства готовых лекарственных форм и для контроля качества лекарственных препаратов на разных стадиях фармообращения. Решающее значение при выборе аналитической ВЭЖХ-системы имеет возможность гибкой трансформации системы в зависимости от конкретных задач анализа или при необходимости проведения лабораторно-пилотных исследований очистки лекарственных субстанций.

Оборудование фирмы «Knauer», представляемое на российском рынке фирмой «БиоХимМак СТ», в наибольшей степени отвечает этим задачам. Системы построены по модульному принципу, и потребитель сам может определять стратегию развития своей аналитической (лабораторно-препаративной) деятельности. Модульное исполнение позволяет работать с различными по сложности системами, начиная с простейшего хроматографа, функционирующего в изократическом режиме, с фотометрическим детектором (комплект, наиболее часто используемый в фармацевтическом анализе) и кончая автоматизированным комплексом, состоящим из нескольких

приборов разной компоновки и управляемым с помощью одного или нескольких компьютеров. В течение получаса аналитическая система может быть трансформирована в лабораторную препаративную систему. В случае необходимости использования оборудования в пожароопасных помещениях, электромеханическая часть прибора может быть отделена от детектора с помощью световодов.

Наряду с высоким качеством используемого оборудования, важное значение имеет правильный выбор системы разделения. Новое поколение ВЭЖХ-сорбентов, полученных на основе высокочистого сферического силикагеля, обладающего инертной поверхностью и высокой химической стабильностью, позволяет найти оптимальные варианты выполнения аналитических задач и повысить разрешающую способность многих методов.

Сохраняют свое значение и сорбенты предыдущего поколения, такие как Nucleosil, Lichrospher, Sherisorb и другие, на основе которых разработаны тысячи методик аналитического контроля. Подавляющее большинство этих методик может быть перенесено на сорбенты нового поколения, хотя это и требует дополнительных затрат. Но в конечном итоге будет получен положительный экономический эффект ввиду большей продолжительности жизни колонн с сорбентами нового поколения.

В настоящее время фирма «БиоХимМак СТ» выпускает сорбенты нового поколения под торговой маркой «Диасфер» на основе высокочистого сферического носителя со средним диаметром пор 11 нм и удельной поверхностью 290–340 м<sup>2</sup>/г.

# ТЕХНОЛОГИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ

Препаративные, пилотные  
и промышленные установки  
на основе оборудования  
немецкой фирмы KNAUER

Препаративные и  
пилотно-промышленные  
ВЭЖХ колонны

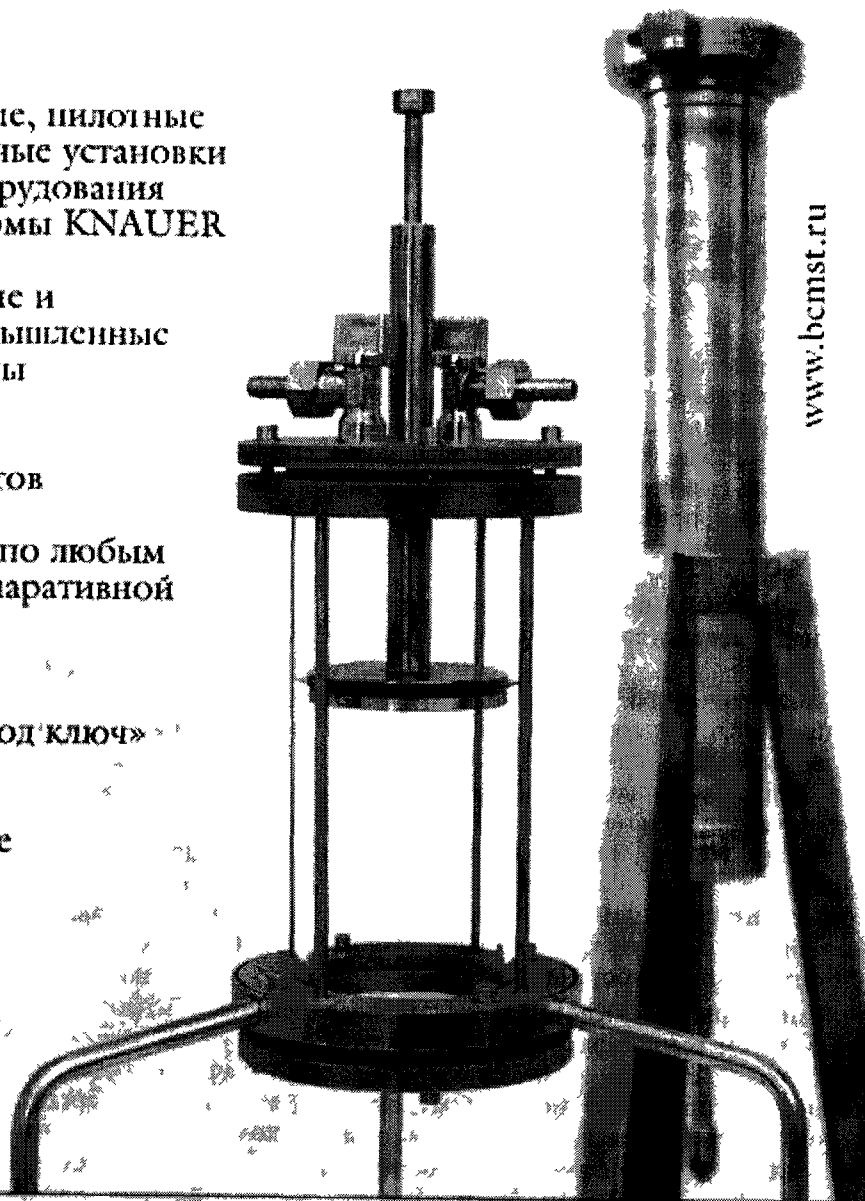
Оптимальный  
выбор сорбентов

Консультации по любым  
вопросам препаративной  
очистки

Разработка  
технологий «под ключ»

Авторское  
сопровождение  
технологии

Обучение  
персонала



[www.bcmst.ru](http://www.bcmst.ru)

## БИОХИММАК СТ



**Biotage**

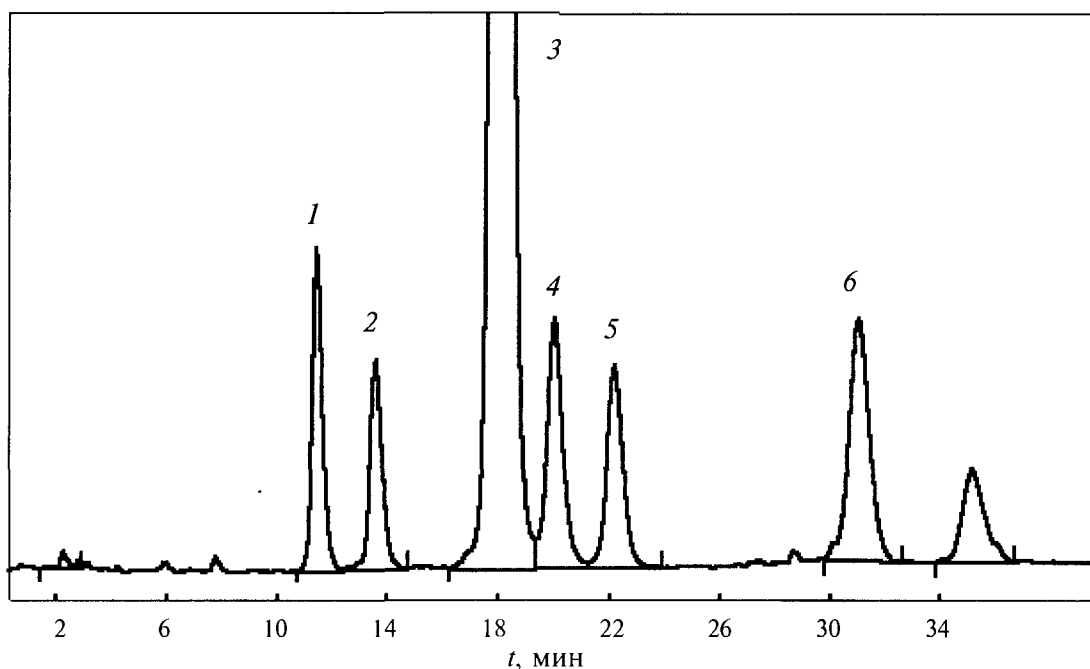
# ФЛЕШ-ХРОМАТОГРАФИЯ

МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ  
ПАРАЛЛЕЛЬНЫЙ СИНТЕЗ  
КОМБИНАТОРНАЯ ХИМИЯ

ПИЛОТНО-  
ПРОМЫШЛЕННЫЕ  
СИСТЕМЫ  
БИОРАЗДЕЛЕНИЕ  
ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ

[WWW.BCMST.RU](http://WWW.BCMST.RU)

# БИОХИММАК СТ



**Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси примесей и основного вещества препарата Декапептил.**

Условия разделения: колонка 4×250 мм, сорбент «Диасфер-110-Фенил», диаметр частиц 5 мкм, градиентное элюирование ацетонитрилом в фосфатном буферном растворе (pH = 2,0), 1 мл/мин, давление 9,6 МПа, 45 °С, УФ-детектор, работающий на длине волны 210 нм.

Идентификация: 1 — L-трипторелин — (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-L-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>); 2 — тетрадекапептид — (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>); 3 — трипторелин — (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>); 4 — формил-нонапептид — (For-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>); 5 — пируват-нонапептид — (Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-OH); 6 — гексапептид — (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-OH)

Эти сорбенты имеют инертную поверхность и близкие к зарубежным маркам ВЭЖХ-сорбентов характеристики. Для демонстрации аналитических возможностей сорбентов серии «Диасфер» на рис. 3 приведена хроматограмма препарата Декапептил — субстанции пептидной природы.

Возрастающий в последние годы интерес отечественных производителей к современным хроматографическим методам получения высокочистых препаратов позволяет надеяться на ши-

рокое развитие и внедрение в практику производства и применения фармацевтических препаратов современных методов ВЭЖХ, как аналитических, так и промышленных.

Практическое использование ВЭЖХ-методов для анализа и технологий очистки, несомненно, приведет к возрождению отечественного приборостроения, разработке новых сорбентов и колонн и дальнейшему развитию самого метода хроматографии.