

ПРЕПАРАТИВНАЯ ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИЯ: РЕШЕНИЯ КОМПАНИИ SANTAİ TECHNOLOGIES

УДК: 542.07, 54.058
БАК: 02.00.03;
02.00.08

Чазов А.И., chazov@element-msc.ru, **Черкасов А.М.**, ООО "ЭЛЕМЕНТ",
Шахнович И.В., ООО "НИИИТ"

Метод препаративной флэш-хроматографии далеко не нов – впервые он был описан 44 года назад. Пережив бурное развитие в 1990-е годы, сегодня он выходит на новый уровень массового промышленного применения. Неудивительно, что многие известные бренды предлагают рынку свои решения в области флэш-хроматографии, ряд известных компаний практически полностью специализируется в данном направлении. Одна из них, пока малоизвестная на российском рынке – Santaï Technologies из КНР. Давайте познакомимся с ее решениями.

ПРЕПАРАТИВНАЯ ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИЯ

Препаративная хроматография широко используется как метод выделения и очистки продуктов во многих отраслях промышленности – от фармацевтики и биотехнологии до оптоэлектроники и тонкого органического синтеза. В отличие от аналитической хроматографии, когда работают с малыми количествами, на препаративном уровне имеют дело с большими объемами и/или высокими концентрациями целевого вещества в пробе. При разделении это, в частности, может приводить к перегрузке колонок, уширению и несимметричности хроматографических пиков и, как следствие, к потере качества разделения. Поэтому препаративные хроматографические методы имеют свою специфику, отличную от аналитических.

Изначально в препаративной хроматографии применялся так называемый гравитационный колоночный метод, когда в вертикально расположенную колонку вносится растворитель и образец, а движение элюента в колонке происходит под действием силы гравитации. Это очень медленный процесс – разделение граммов образца может длиться часами. В 1978 году известный американский химик-органик, профессор Колумбийского университета У.К.Стилл (W. Clark Still) вместе с коллегами предложил метод, названный им флэш-хроматографией (flash chromatography) [1].

Суть нового способа разделения заключалась в том, что растворитель с образцом проталкивался сквозь частицы неподвижной фазы посредством давления воздуха, поэтому данный метод называют также хроматографией среднего давления. Внешнее давление позволяет уменьшить размер частиц сорбента с 200–500 до 40 мкм и ниже, что существенно увеличивает эффективность колонки. В опытах Стилл изначально использовал 18-дюймовую стеклянную трубку диаметром 20 мм с плоским дном и установленным в нем запорным краном (рис.1). В основание запорного крана вставлялась заглушка из стекловаты. На дно трубки на 1/8 дюйма насыпался слой мелкодисперсного песка,

затем колонка заполнялась на 5,5–6 дюймов сухим силикагелем (неподвижная фаза) с диаметром частиц 40–63 мкм. Сверху сорбент покрывался еще одним 1/8-дюймовым слоем песка. На входе колонки располагался игольчатый клапан, регулирующий подачу воздуха. Колонка заполнялась растворителем и уплотнялась воздушным потоком. Затем на верхний слой песка наносился образец в растворе (концентрация 20–25%). На колонку плотно устанавливался регулятор потока, и под воздействием избыточного давления воздуха происходил процесс элюирования с разделением.

Уже первые эксперименты показали эффективность нового метода флэш-хроматографии – время разделения образцов массой до 10 г снизилось с 2–3 часов до 15 минут. Все дальнейшие работы были направлены на автоматизацию процесса, увеличение разрешающей способности и производительности флэш-хроматографических систем. Появились готовые, предзаполненные сорбентом пластиковые картриджи для флэш-хроматографов, позволяющие работать при давлении вплоть до 250 бар. В качестве неподвижной фазы стали использоваться сферические частицы диаметром 40–60 мкм и менее. В результате ряд компаний начали выпускать линейки флэш-хроматографов с крайне высокими характеристиками, вплотную приближающимися по возможностям разрешения к препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (препаративная ВЭЖХ), но существенно более привлекательными по стоимости и коммерческой эффективности в целом. Среди них такие системы, как Reveleris (Buchi), Isolera (Biotage), Puriflash (Interchim) и др.

Основной альтернативой флэш-хроматографии выступает препаративная ВЭЖХ с рабочими давлениями до 300 бар и сорбентами с размером частиц до 15 мкм (табл.1). Однако ВЭЖХ, отличаясь высокими разрешением и воспроизводимостью, не идеален. Прежде всего, ВЭЖХ как аналитический метод ориентирован на малые объемы образцов –

Табл.1. Сравнение флэш-хроматографии и препаративной ВЭЖХ

Параметры	Флэш-хроматография	Препаративная ВЭЖХ
Размер частиц сорбента, мкм	15–63	5–15
Внутренний диаметр колонок, мм	12–170	10–50
Скорость потока, мл/мин	15–1000	5–100
Максимальная емкость загрузки образца, г, не более	1000	10
Максимальное давление, бар	100	300

не более десятков миллиграмм. Чтобы получить граммы очищенного продукта, необходимо многократное разделение. Кроме того, возникает и проблема упаривания больших объемов растворителя, что не только долго и не полезно с точки зрения экологии, но и может повредить очищаемые компоненты. В частности, подобная проблема известна при выделении синтетических аналогов цефалоспоринов [3, 4]. Как отмечено в работе [4], цефалоспорины содержат β-лактамный цикл, который раскрывается при температуре выше 40 °С. Поэтому длительное упаривание водных фракций после ВЭЖХ-разделения на роторном испарителе



Рис.1. Первая система флэш-хроматографии из работы У.К.Стилла [1]

приводило к потере вещества и повторному загрязнению продуктами деградации. В то же время объемы растворителя были слишком велики для лиофильного высушивания. Кроме того, и сами хроматографы, и колонки для препаративной ВЭЖХ достаточно дороги, особенно в случае обращенно-фазовой хроматографии, что нельзя не учитывать при решении производственных задач.

Более того, по мере увеличения объемов образца эффективность ВЭЖХ-колонок существенно падает (рис.2), и при нагрузке порядка 100 мг различие колонок с 12-мкм и 60-мкм сорбентом становится незначительным [5]. Флэш-хроматография позволяет избежать ряда подобных проблем. А с появлением пластиковых картриджей, допускающих многократное использование, системы флэш-хроматографии по удобству применения и эффективности ощутило превзошли препаративную ВЭЖХ. Поэтому для массовых и рутинных применений, а также для стадий предварительной очистки метод флэш-хроматографии сегодня стал предпочтительным.

НОВОЕ ВРЕМЯ – НОВЫЕ ИГРОКИ

С развитием флэш-хроматографии стали появляться компании, специализирующиеся именно на этой технологии. Одна из них – Santaï Technology (Changzhou) из КНР. Основанная в 2004 году фирма специализируется на разработке и производстве препаративных флэш-хроматографических систем для научных и прикладных задач в фармакологии, биотехнологиях, тонком химическом синтезе, нефтехимии и пр. Фирма выпускает линейку флэш-хроматографов SeraBean machine, а также колонки серии SeraFlash. В первую очередь они предназначены для таких областей, как:

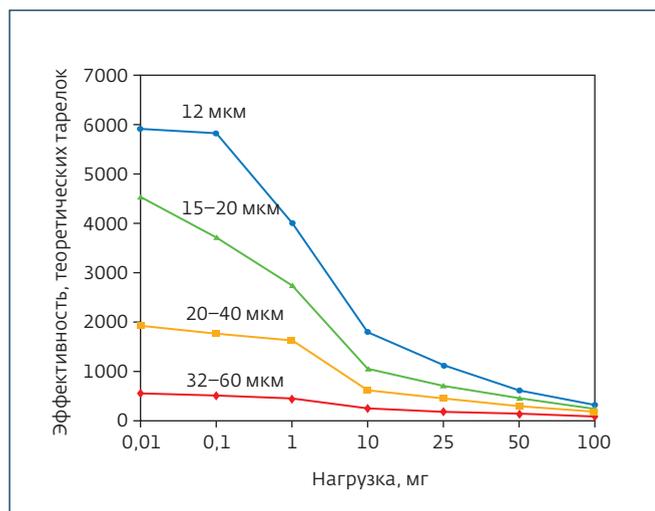


Рис.2. Эффективность разделения на обращенно-фазовых колонках в зависимости от величины нагрузки [5]

Табл.2. Системы флэш-хроматографии серии SepaBean

Параметры	SepaBean machine U		SepaBean machine T	SepaBean machine	SepaBean machine 2	SepaBean machine L
Описание	Модель начального уровня со всеми возможностями управляющего ПО SepaBean. Соответствует всем требованиям рутинного разделения, включая нормальнофазное и с обращенной фазой		Бюджетная модель. Опционально: ELSD-детектор для расширения спектра образцов	Базовая модель. Бинарный градиент на стороне высокого давления	Модель среднего давления, великолепно сочетающаяся с колонками SepaFlash HP для большей эффективности разделения	Модель с высокой скоростью потока для больших объемов очистки, до 1 кг в одной загрузке
Скорость потока, мл/мин	Модель U100: 1–100	Модель U200: 1–200	1–200		1–300	50–1000
Максимальное давление, бар	Модель U100: 6,9	Модель U200: 13,8	13,8		34,5	100
Насос	Необслуживаемый керамический				Двухплунжерный	Необслуживаемый керамический бинарный
Растворители, градиент	Две линии растворителей. Бинарный градиент		Четыре линии растворителей. Бинарный градиент с комбинацией из любых двух растворителей	Четыре линии растворителей. Бинарный градиент на стороне высокого давления	Четыре линии растворителей. Бинарный градиент с комбинацией из любых двух растворителей, третий растворитель как модификатор	
Детекторы спектрофотометрические	<ul style="list-style-type: none"> с фиксированной длиной волны (254 нм, другие опционально) диодная матрица 200–400 нм диодная матрица 200–800 нм 		<ul style="list-style-type: none"> диодная матрица 200–400 нм диодная матрица 200–800 нм 			<ul style="list-style-type: none"> диодная матрица 200–400 нм диодная матрица 200–800 нм
	Опционально: испарительный детектор светорассеяния (ELSD)					
Масса образца	10 мг–33 г					8–1000 г
Размер колонок (масса сорбента)	4–330 г, с адаптером – до 3 кг					0,8–10 кг

- многостадийный органический синтез – для удаления побочных продуктов промежуточных реакций;
- биотехнологическое производство – выделение пептидов, олигонуклеотидов, олигосахаридов и т.п.;
- производство биологически активных добавок – очистка экстрактов, выделение активных компонентов;
- фармацевтика – очистка исходного сырья, промежуточных и конечных продуктов;
- осветление растворов на активированном угле.

Рассмотрим особенности метода флэш-хроматографии на примере ее продукции.

УСТАНОВКИ ФЛЭШ-ХРОМАТОГРАФИИ СЕРИИ SERABEAN

На сегодня в портфолио Santai Technologies с учетом модификаций входят семь различных систем препаративной флэш-хроматографии, от начального уровня до высокопроизводительных промышленных установок (табл.2). Решения начального уровня представлены установками типа SeraBean machine U100 с максимальным давлением 100 psi (6,9 бар) и скоростью потока элюента до 100 мл/мин (рис.3). Топовая модель среднего давления SeraBean machine 2 (рис.4) рассчитана на давление до 34,5 бар и скорость потока до 300 мл/мин. Системы серии SeraBean работают с колонками емкостью до 330 г позволяют загружать до 33 г очищаемого образца (а с дополнительным держателем – до 3 кг/300 г) и оснащены встроенным коллектором фракций. Многие флэш-картриджи допускают многократное использование, для очистки систем от остатков растворителей предусмотрен встроенный воздушный насос.

Для контроля процесса хроматографического разделения все системы SeraBean комплектуются спектрофотометрическими детекторами на УФ-диапазон (200–400 нм) либо на УФ+видимый диапазон (200–800 нм). Младшие модели могут поставляться с детектором на фиксированную длину волны (стандартно – 254 нм). Кроме того, возможно комплектование испарительным детектором светорассеяния (ELSD), что важно при работе с образцами, не поглощающими свет в видимом либо УФ-диапазоне либо не допускающими воздействия УФ-излучения. Это сахара, липиды, некоторые полимеры, жирные кислоты, аминокислоты и т.п. Все установки оснащены встроенной функцией сканирования по всем доступным длинам волн.

Особняком стоит высокопроизводительная система SeraBean machine L (рис.5), позволяющая работать под давлением до 100 бар, обеспечивающая скорость потока до 1000 мл/мин, допускающая загрузку до 1 кг образца и работу с колонками до 10 кг. Установка может комплектоваться коллектором фракций на восемь каналов, а также модулем загрузки образцов с регулируемой скоростью загрузки и потока.



Рис.3. Установка начального уровня SeraBean machine U100

Программное обеспечение

Все системы SeraBean работают под управлением встроенного программного обеспечения (ПО) с удобным пользовательским интерфейсом и широким спектром полезных функций (рис.6). Работой можно управлять по беспроводным каналам с мобильных устройств через специальное



Рис.4. Система среднего давления SeraBean machine 2



Рис.5. Высокпроизводительная система SeraBeau machine L

приложение. Для удобства пользователей установки оснащены держателем беспроводных планшетов типа iPad.

Одна из особенностей систем SeraBeau – встроенная в ПО база данных (БД) методов разделения, которая автоматически рекомендует наиболее эффективный метод очистки конкретных образцов. Это позволяет работать с системами SeraBeau даже начинающим операторам – разумеется, если речь идет о рутинных анализах. БД обновляется пользователями систем SeraBeau по всему миру и доступна по защищенным каналам. Возможна организация закрытой базы в рамках одной компании посредством закрытой сети. Если в организации используется несколько систем SeraBeau, все они могут быть автоматически связаны по локальной сети, что позволяет обновлять и синхронизировать их БД.

Важно, что системы SeraBeau устойчивы к остановкам работы. Если по каким-либо причинам система SeraBeau оказалась выключенной или даже ее пришлось заменить, можно продолжить работу на другой аналогичной установке. Для этого в рабочую систему SeraBeau достаточно



Рис.6. Графический интерфейс пользователя

перенести картридж, на котором выполнялся прерванный процесс разделения, а также емкость сбора фракции. После чего остается только подключиться к локальной сети и продолжить работу с прерванного места.

Одна из примечательных особенностей ПО SeraBeau – функция TLC-to-Gradient (ТСХ в градиент). Во многих случаях для выбора оптимального метода разделения перед флэш-хроматографией проводят анализ образцов посредством тонкослойной хроматографии (ТСХ) на специальных пластинках. К слову, их также производит компания Santaï Technologies. Достаточно ввести данные, полученные посредством ТСХ для конкретного образца, ПО автоматически предложит оптимальный тип колонки и градиент элюирования. Аналогично работает и функция HPLC-to-Gradient (ВЭЖХ в градиент). Оператор вводит информацию по аналитическому ВЭЖХ-разделению, включая время удерживания, процентный состав растворителей на момент полного выхода целевого компонента, площадь пика целевого компонента и основных примесей, а система автоматически сформирует градиент элюирования.

ФЛЭШ-КАРТРИДЖИ СЕМЕЙСТВА SERAFLASH

Компания Santaï Technologies разрабатывает и производит не только установки, но и разделительные колонки. Картриджи для систем флэш-хроматографии выпускаются под маркой SeraFlash. Они на 100% совместимы с флэш-системами других производителей, таких как Biotage, Büchi, Teledyne Isco, Interchim и многих других. Все картриджи, кроме некоторых моделей серии iLOK, поставляются заполненными сорбентом. При заполнении используется специальная технология сухой набивки, в результате формируется однородный слой сорбента, что снижает канальный эффект, хроматографические пики становятся более узкими и симметричными. Как следствие, возрастает точность и воспроизводимость разделения и очистки. Доступны пять основных серий картриджей: Standard, E, HP, Bonded и iLOK. Рассмотрим их особенности.

Картриджи серии Standard (рис.7) доступны в размерах от 4 г до 10 кг, что позволяет очищать от 10 мг до 1 кг целевых компонентов. Колонки заполнены силикагелем с нерегулярной или сферической формой частиц, от 15 до 75 мкм, размер пор 50-70 Å. Картриджи изготавливаются посредством запатентованной технологии сухой упаковки.

Картриджи серии E имеют ту же конструкцию, что и в серии Standard, и обладают сходными характеристиками. Однако они заполняются либо экономичным силикагелем с нерегулярными частицами размером 40–63 мкм (размер пор 60 Å), либо оксидом алюминия с размером частиц 50–75 мкм (размер пор 55 Å). Такие колонки доступны размером от 4 г до 3 кг (силикагель) либо от 8 г до 6 кг (оксид алюминия). Причем если в случае силикагеля pH составляет 6,5–



Рис.7. Картриджи серии Standard

7,5, то сорбент из оксида алюминия может быть кислотным (рН 3,8–4,8), нейтральным (рН 6,5–7,5) и основным (рН 9–10). Такие колонки – очень бюджетное и эффективное решение для ежедневных рутинных работ.

Картриджи серии HP (рис.8) предназначены для работы в составе высокопроизводительных систем с повышенным давлением до 27,6 бар. Их корпус изготовлен из цельного полипропилена с утолщенными стенками, а торцевая крышка присоединена методом ротационной сварки трением.

Картриджи производятся в диапазоне масс сорбента от 4 до 330 г, что позволяет очищать от 10 мг до 50 г целевого соединения. Они могут заполняться не только сорбентами с нерегулярными частицами, но и высокоэффективным силикагелем со сферическими частицами диаметром 20–45 мкм и порами до 70 Å. Такой сорбент в сочетании с рассчитанной на повышенное давление конструкцией картриджа обеспечивает высокую производительность без увеличения противодавления.

В рамках серии HP выпускаются и колонки с повышенной эффективностью. Они заполняются силикагелем со сферическими частицами диаметром 25 и 15 мкм и размером пор 50 Å. Эффективная площадь поверхности такого сорбента возрастает на 40%, что позволяет использовать меньшие (и более дешевые) картриджи для достижения такой же степени очистки. Например, если нагрузочная способность обычной 330-граммовой колонки серии HP с размером сферических частиц 20–45 мкм составляет 50 г образца (15%), то для аналогичной колонки с повышенной емкостью допустимая масса образца – 99 г (30%).

Картриджи серии SepaFlash Bonded упакованы силикагелем с частицами от 20 до 63 мкм с различными привитыми



Рис.8. Флэш-картриджи SepaFlash серии HP

функциональными группами. Доступно более 20 видов сорбентов, отличающихся типом частиц (нерегулярные и сферические), размером (от 15 до 40–63 мкм), а также видом их химической модификации. Поставляются колонки с силикагелем, химически модифицированным аминопропилсиланом (NH₂), четвертичными аммонийными группами (SAX), бензол-сульфокислотой (SCX), бутилсиланом (C4), октилсиланом (C8), октадецильными группами (C18), нитрильными группами (CN), диолами (Diol), фенильной (Phenyl) и фенилгексильными группами (Phenyl-Hexyl). Производятся колонки для гидрофильной хроматографической очистки с присоединенными группами аргинина (HILIC ARG) (табл.3).

Отдельной веткой в серии Bonded выступают картриджи серии SepaFlash HP Bio. Они доступны в широком диапазоне размеров (от 5,4 до 410 г), позволяя выделять от миллиграммов до граммов вещества. Их особенность – возможность заполнения силикагелем со сферическими частицами диаметром 20–45 мкм с увеличенным размером пор до 300 Å. Это необходимо для работы с биомолекулами, масса которых превы-



Рис.9. Флэш-картриджи SepaFlash серии iLOK

Табл.3. Картриджи семейства SepaFlash Bonded

Тип частиц	Привитая фаза	Размер частиц, мкм	Размер пор, Å
Нерегулярные	C18	40–63	60
	C18		90
	NH2		60
	SAX		
	SCX		
Сферические	C18	40–60	120
		30–50	
		40–75	100
		15	
		20–45	
	C18(AQ)	20–45	100
	CN		
	C4		
	ARG		
	C8		
	C8(AQ)		
	Diol		
	Phenyl		
Phenyl-Hexyl			

шает 2 кДа. В картриджах используется силикагель UltraPure с привитыми фазами C18, C8 или C4.

Картриджи iLOK с удобной, надежно закручивающейся крышкой (система iLOK) (рис.9) созданы для ручной загрузки образцов. Они универсальны – возможна не только сухая загрузка, но и прямой ввод раствора. Картриджи выпускаются в диапазоне от 4 до 330 г. Они поставляются заполненными силикагелем и пустыми.

Картриджи серии iLOK-SL изначально заполнены на 85% для удобства сухой загрузки образцов. Возможно заполнение силикагелем с различным типом и размером частиц, а также с разнообразными привитыми фазами. Размер картриджей – от 3,5 до 280 г.

Чтобы завершить разговор о картриджах, отметим ряд особенностей, характерных для продукции Santai Technolo-



Рис.10. 3-килограммовая флэш-колонка SepaFlash

gies. Компания выпускает колонки очень больших размеров – до 3 и 10 кг (рис.10). Конструкция всех колонок позволяет соединять их последовательно, увеличивая эффективную длину колонки и тем самым – разрешение. Все колонки допускают многократное использование. А для их продувки от остатков растворителей все флэш-хроматографы Santai Technologies оснащены воздушным насосом.

ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ

Линейка флэш-хроматографических систем SepaBeau с колонками SepaFlash позволяет подобрать наиболее оптимальное решение в очень широком спектре приложений, от малых и учебных лабораторий до производственных задач. Они с успехом применяются во многих областях – от фармацевтики и пищевой промышленности до микроэлектроники. Рассмотрим лишь некоторые из них, относящиеся к области фармацевтики.

Очистка низкомолекулярных пептидов с помощью картриджей SepaFlash серии HP Bio

С развитием биотехнологий и технологий синтеза пептидов ширится производство и применение пептидных фармакологических препаратов. При твердофазном синтезе таких соединений в условиях массового произ-

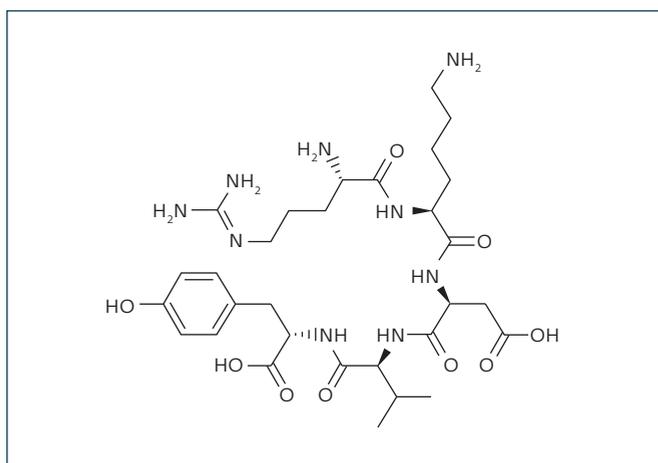


Рис.11. Тимопентин TP-5

водства необходимы методы надежной очистки. Традиционно для этого применяли ионообменную и обращенно-фазовую ВЭЖХ. Однако методы, замечательные для аналитических задач, обладают низкой производительностью (малый допустимый объем загрузки образцов), высокой стоимостью сорбентов, оборудования и пр. Флэш-хроматографические решения Santaï Technologies позволяют избавиться от подобных недостатков, обеспечивая высокую чистоту (>94%) готового продукта. Это показали авторы работы [6] на примере очистки образца тимопентина – синтетического пентапептида с аминокислотной последовательностью Arg-Lys-Asp-Val-Tyr, с брутто-формулой $C_{30}H_{49}N_9O_9$ и молекулярной массой 679,41 Да. В работе использовался образец типа TP-5 с аминокислотными остатками тимозина II в позициях 32–36 (рис.11). Данный препарат является иммуномодулятором, используемым в клинической практике с 1980-х годов, в частности для больных СПИДом. Для очистки препарата использовались 12-граммовый картридж SeraFlash HP Bio с привитой фазой C18, сферические частицы силикагеля диаметром 15 мкм с порами 100 Å. Чистота исходного материала и очищенного образца контролировалась с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 с аналитической колонкой C18 (4,6×150 мм, размер частиц 5 мкм). Исходный материал содержал 80,5% TP-5 (рис.12).

В процессе очистки 45 мг исходного материала TP-5 растворяли в 1 мл раствора метанола в воде (V:V=3:7), после чего вводили во флэш-картридж. Растворителями служили вода (а) и метанол (б). Градиент метанола – линейный, от 10% изначально до 90% к минуте 10 (рис.12б). Очистка проводилась в один проход. После лиофильной сушки масса образца составила 27,5 мг, а определенная посредством ВЭЖХ чистота – 94,1%.

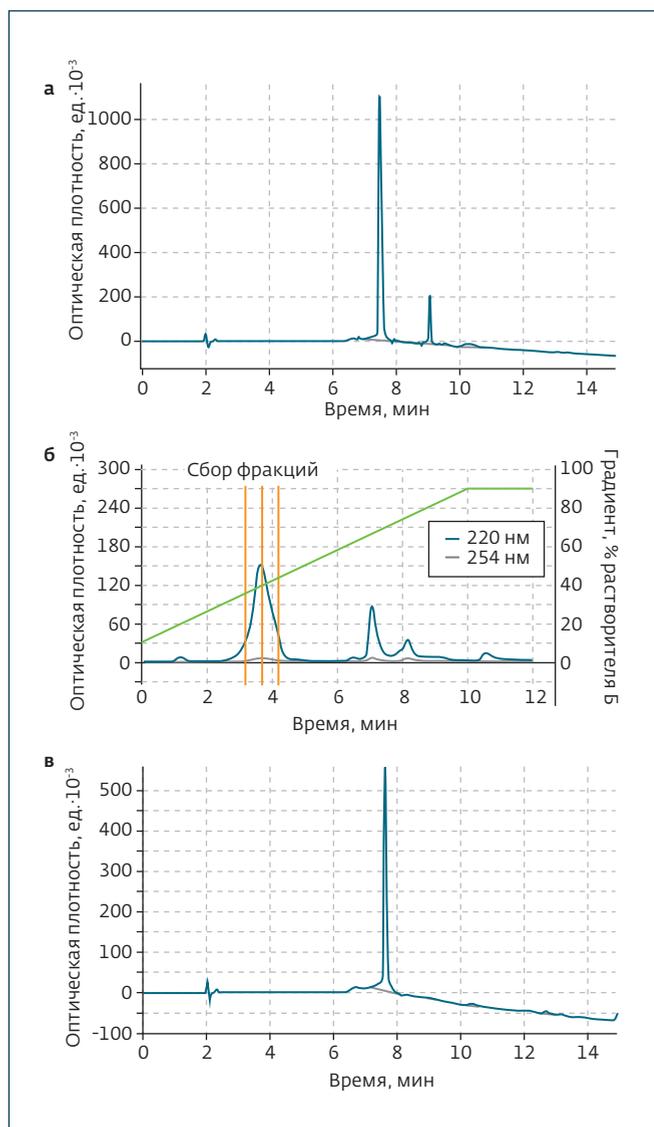


Рис.12. ВЭЖХ исходного материала TP-5 (а), выход очищенного продукта (детектирование на длинах волн 220 и 254 нм) (б) и ВЭЖХ очищенного TP-5 (в)

Очистка сильно полярных пептидов

Мы рассмотрели пример очистки достаточно низкомолекулярного неполярного пептида. Но как быть, если необходимо разделение пептидов с высокой степенью полярности, имеющих в составе остатки полярных аминокислот, таких как цистеин, глутамин, аспарагин, серин, треонин, тирозин и т.п.?

Традиционный метод разделения таких соединений – обращенно-фазовая хроматография с силикагелем с привитым октадецилсиланом (C18). Однако на сорбентах C18 по мере увеличения полярности образцов время их удерживания на неподвижной фазе уменьшается, поскольку неподвижная фаза неполярна. Для ком-

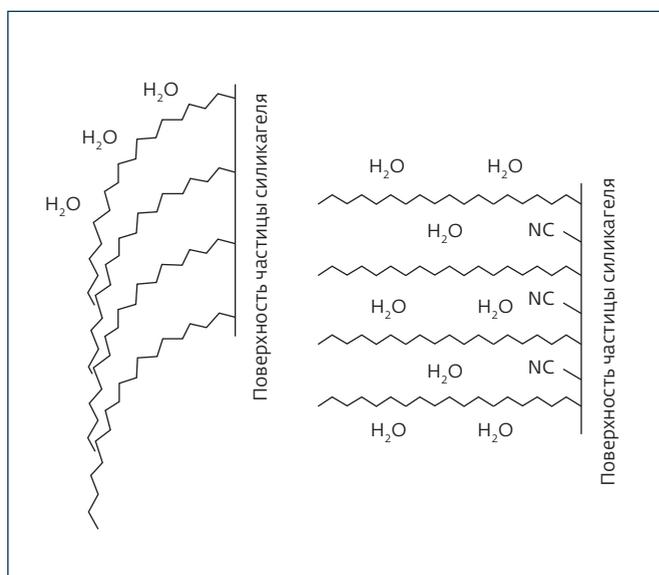


Рис.13. Эффект гидрофобного коллапса на поверхности силикагеля C18 (слева) и предотвращение этого эффекта на силикагеле C18AQ за счет нитрильных групп (справа)

пенсации этого эффекта обычно увеличивают долю полярного растворителя, т.е. воды или водных солевых растворов. Проблема в том, что по мере увеличения концентрации воды возрастает опасность так называемого гидрофобного коллапса. Суть этого явления – длинные хвосты октадецилсилана (в случае C18), привитые на частицы силикагеля, в силу их гидрофобности отталкивают молекулы воды, начинают взаимодействовать друг с другом – как бы слипаются (рис.13). В результате взаимодействие с полярной подвижной фазой снижается в еще большей мере, компоненты образца практически перестают удерживаться. Причем зачастую повреждения колонки необратимы, даже если ее промыть органическими растворителями.

Для предотвращения гидрофобного коллапса разработаны специальные сорбенты. Например, поверхность частиц силикагеля C18 модифицируют гидрофильными нитрильными группами (CN). Такие колонки обозначают как C18AQ (от aqueous – водные), они радикально решают проблему работы с сильнополярной подвижной фазой. В работе [7] описан сравнительный анализ колонок с сорбентами C18 и C18AQ при очистке полярного пептида с молекулярной массой порядка 1 кДа. В эксперименте использовалась установка SepaBean machine 2 и одинаковые 12-граммовые картриджи SepaFlash серии NP bonded. Они различались только сорбентом. В одной был стандартный C18 со сферическими частицами силикагеля диаметром 20–45 мкм и порами 100 Å. В другом картридже использовался аналогичный по размеру

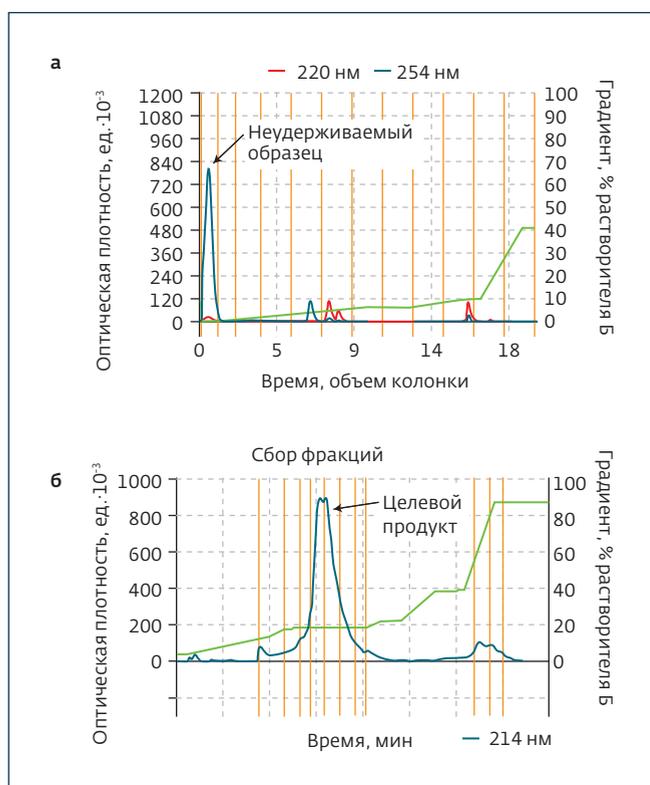


Рис.14. Очистка сильно полярного пептида на колонках C18 (а) и C18AQ (б)

частиц сорбент C18AQ, модифицированный для водных растворов.

Чистота исходного образца составляла 80%. 60 мг образца растворили в 5 мл чистой воды. При разделении в качестве растворителей использовалась чистая вода (а) и ацетонитрил (б). Образец, разделенный на две равные части, загружался в колонки и подвергался разделению при ступенчатом градиенте ацетонитрила. В результате образец не удерживался на колонке C18 (рис.14а), практически полностью вымываясь с растворителем в самом начале процесса. Напротив, в случае колонки C18AQ пептид эффективно удерживался в колонке (рис.14б). После лиофильной сушки чистота образца составила 98,2%.

Очистка сильнополярных тиазидных соединений посредством SepaFlash HILIC ARG

Тиазиды – гетероциклические соединения, содержащие азот и серу. На их основе, прежде всего бензотиазидина, производится целый класс диуретиков, например гидрохлоротиазид (рис.15).

Для очистки таких препаратов в компании Santai Technologies разработан специальный флэш-картридж SepaFlash HILIC ARG, в которой к сферическим части-

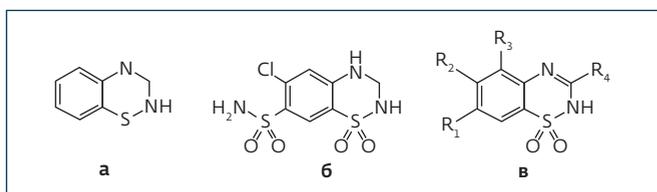


Рис.15. Бензотиадизин (а), его дериват – диуретик гидрохлортиазид (б) и сходное с ним исследуемое соединение (в)

цам силикагеля привиты группы аргинина (см.рис.15). Авторы работы [8] провели сравнительный анализ очистки образца производной бензотиадизина посредством традиционных колонок SepaFlash C18 и SepaFlash HILIC ARG.

Исследуемый образец (рис.15в) представлял собой полярное основное соединение, малорастворимое в большинстве растворителей, включая метанол, воду и др. По данным ВЭЖХ, чистота исходного образца составляла около 81%. Стандартный в таких случаях подход заключается в применении обращенно-фазовой хроматографии с колонками C18. Чтобы повысить растворимость, в воду добавили небольшое количество трифторуксусной кислоты (CF₃COOH) для образования растворимой соли. Полученный раствор вводили в картриджи для последующего разделения на установке SepaBean machine T. В процессе очистки использовалась смесь двух растворителей – воды (А) и ацетонитрила (Б), в каждый из которых добавляли 0,1% CF₃COOH.

В первом случае раствор вводился в 12-граммовый картридж SepaFlash HP Bonded со сферическими частицами силикагеля (диаметр 20–45 мкм, поры 100 Å). Градиент – линейный, концентрация ацетонитрила в течение 10 мин возрастала от 10 до 90% (рис.16а). Скорость элюирования – 15 мл/мин, масса загруженного образца – 100 мг. Как видно из рис.16а, удерживание образца на сорбенте C18 было низким, благодаря высокой полярности смесь легко вымывалась из колонки в составе элюента, без качественного разделения.

Другой подход заключался в применении метода гидрофильной хроматографии (HILIC – hydrophilic interaction liquid chromatography) [9], который сочетает полярные подвижные фазы, характерные для обращенно-фазовой ЖХ, с неподвижными фазами, характерными для нормально-фазовой хроматографии. Для эксперимента использовался картридж SepaFlash HILIC ARG, в точности аналогичный картриджу C18, но с привитыми группами аргинина (рис.17) В отличие от первого эксперимента, концентрация воды возрастала – от 30% в начале процесса до 100% к 35-й минуте (рис.17б). Масса загруженного образца составляла 500 мг, скорость элю-

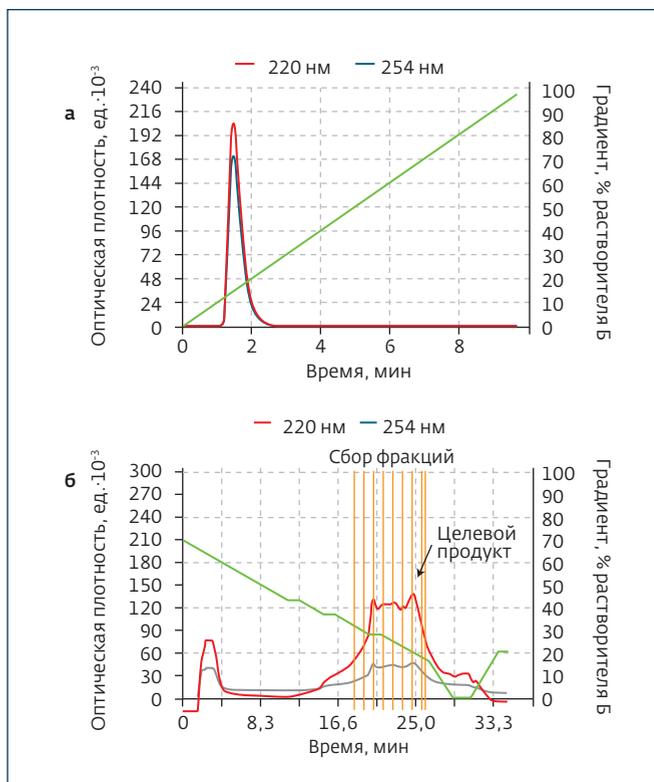


Рис.16. Очистка деривата бензотиадизина с применением стандартного картриджа C18 (а) и SepaFlash HILIC ARG (б)

ирования – 50 мл/мин. Как видно из рис.17б, удерживание на сорбенте с привитыми остатками аргинина существенно выше, что обеспечило эффективное разделение. После лиофильной сушки полученных фракций, по данным ВЭЖХ, чистота продукта составила 95,3%.

Ортогональная очистка синтетических промежуточных фармацевтических субстанций

В отдельных случаях сложные смеси тяжело разделить каким-либо одним способом. Тогда на помощь приходят сочетания методов разделения на основе различных (ортогональных) механизмов. Например, последовательное разделение на нормально- и обращенно-фазовых колонках. Такой подход при разделении промежуточного фармацевтического продукта описан в работе [10].

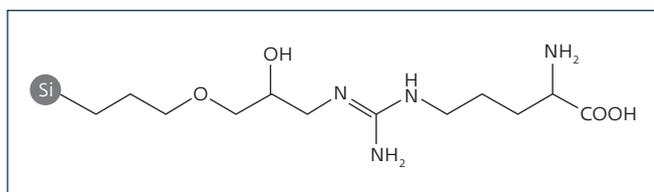


Рис.17. Стационарная фаза SepaFlash HILIC ARG

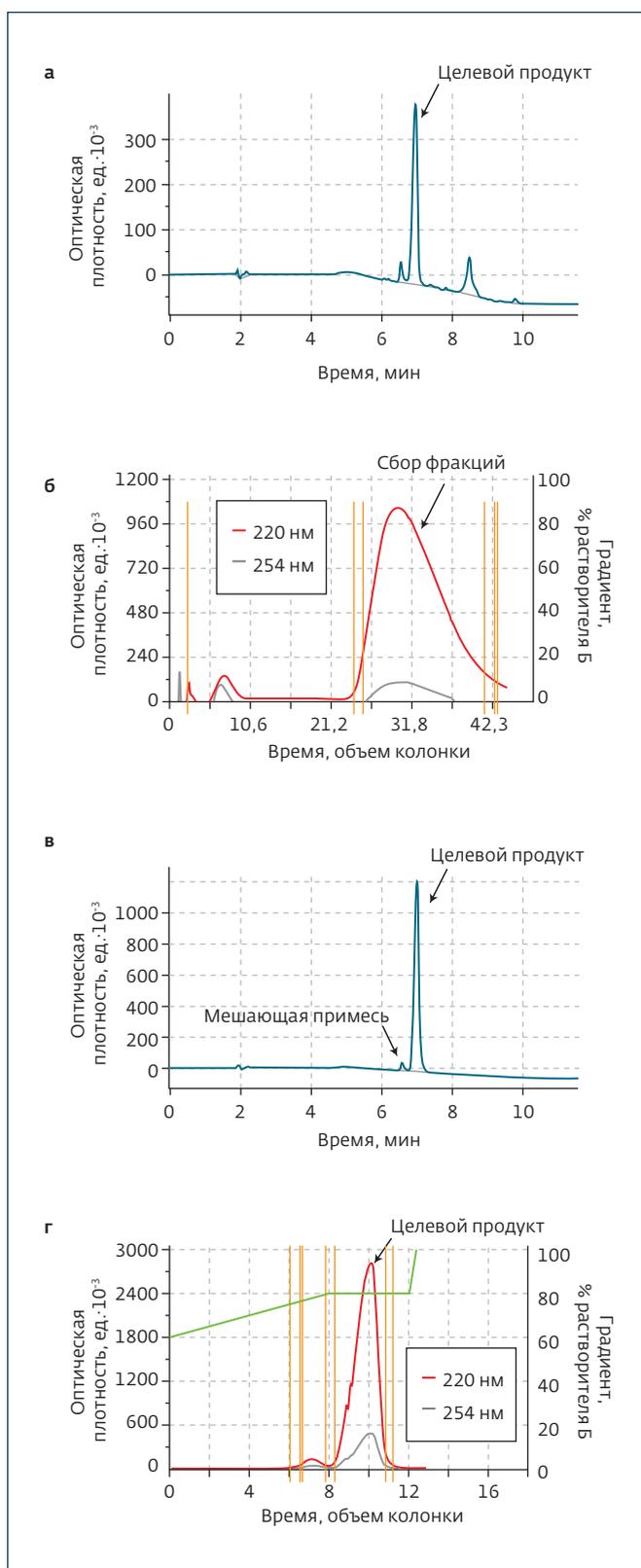


Рис.18. Хроматограмма смеси (а), первый этап разделения, нормально-фазовая хроматография (б), ВЭЖХ-хроматограмма собранной фракции (в), второй этап разделения методом обращенно-фазовой хроматографии (г)

Образец изначально был растворен в малом количестве метанола и проанализирован посредством ВЭЖХ. Концентрация целевого компонента в смеси составила 66% (рис.18а). Причем время удержания одной из мешающих примесей было близко к времени удержания целевого соединения, что и определяло основную сложность разделения.

На первом этапе использовался метод нормально-фазовой ХХ. Сначала 3 г образца растворили в метаноле и абсорбировали на 6 г силикагеля того же типа, что и в картридже, – с нерегулярными частицами размером 40–63 мкм и порами 100 Å. После чего органический растворитель был удален в роторном испарителе, а полученный образец загружен в пустой картридж серии iLOK (метод сухой загрузки).

Разделение проводилось на установке SераBeau machine T, картридж – 80-граммовый SераFlash серии Standard Series, растворитель – этилацетат, скорость элюирования – 50 мл/мин, изократический градиент (рис.18б).

ВЭЖХ-анализ собранной после разделения фракции показал содержание целевого продукта на уровне 92% (рис.18в), что не удовлетворяло производственным требованиям (не ниже 95%). Главным образом мешали примеси с близким временем удерживания при нормально-фазовой хроматографии.

На втором этапе из собранной на первом этапе фракции удалили остатки растворителя на роторном испарителе. Затем 300 мг образца растворили в 2,5 мл метанола с добавкой нескольких капель диметилсульфоксида. Затем жидкий образец ввели в 120-граммовый картридж C18 (SераFlash HP Bonded со сферическими частицами силикагеля, привитыми C18, диаметр 20–45 мкм, поры 100 Å) и провели разделение при скорости элюирования 30 мл/мин. Растворители – вода (а) и метанол (б). Концентрация метанола в процессе разделения линейно изменялась от 60 до 80% за время элюирования 8 объемов колонки, затем оставалась неизменной, в конце процесса увеличилась до 100% (рис.18г). В результате концентрация целевого продукта в собранной фракции составила порядка 98%.

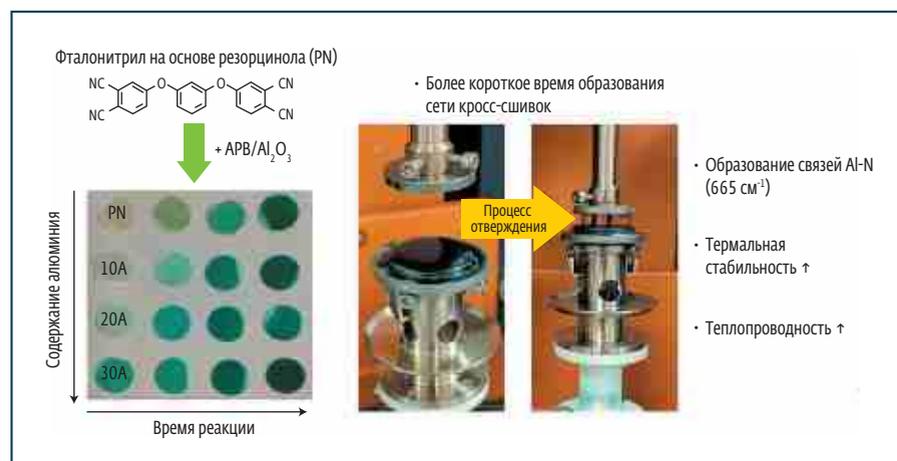
* * * *

Продукты компании Santai Technologies в области препаративной флэш-хроматографии позволяют решать актуальные задачи получения чистых субстанций в современной фармацевтике, при тонком органическом синтезе и во множестве других областей. Немаловажно, что компания работает в области флэш-хроматографии с 2004 года и вот уже 18 лет развивает линейку своих решений. Оборудование Santai Technologies может стать достойной альтернативой решениям многих известных брендов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Still W.C., Kahn M., Mitra A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution // J. Org. Chem. 1978. V. 43. No. 14. P. 2923–2925.
2. <https://www.barts-blog.net/flash-chromatography-vs-prep-hplc-you-want-speed-or-precision/>
3. Pohlmann J., Vasilevich N.I., Glushkov A.I., Kellenberger L., Shapiro S., Caspers P., Page M.G.P., Danel F. Propenylamide and propenylsulfonamide cephalosporins as a novel class of anti-MRSA β -lactams // Bioorg. & Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. P. 4635–4638.
4. Василевич Н.И. Новые возможности препаративного разделения пептидов: обращенно-фазовая флэш-хроматография // Лаборатория и производство. 2019. № 3. С. 48–54.
5. Achieve Highly Pure Peptides white paper // Biotage, Application notes. PPS510.
6. Wenjun Qiu, Meiyuan Qian, Bo Xu. The Purification of Small Molecule Peptide by SepaFlash HP Bio Series Flash Cartridge // Santai Technologies, Chromatography Application Note AN 006.
7. Rui Huang, Bo Xu. The Application of C18AQ Columns in the Purification of Strong Polar Peptides // Santai Technologies, Chromatography Application Note AN 018.
8. Run Xiao, Rui Huang, Bo Xu. The Application of SepaFlash HILIC ARG Cartridge for the Purification of Strong Polar Thiazide Compound // Santai Technologies, Chromatography Application Note AN 026.
9. Чернобровкина А.В., Смоленков А.Д., Шпигун О.А. Гидрофильная хроматография – перспективный метод определения полярных веществ // Лаборатория и производство. 2018. № 4. С. 76–92.
10. Meiyuan Qian, Bo Xu. The Application of Orthogonal Chromatography for the Purification of Synthetic Pharmaceutical Intermediates // Santai Technologies, Chromatography Application Note AN024.

Одновременное улучшение кинетики полимеризации и свойств фталонитрила с помощью оксида алюминия



ные свойства полимеров. Для подбора оптимального наполнителя важно определить химическую совместимость между чистыми наполнителями и фталонитриловым полимером. Известны успешные поверхностные модификации фталонитриловых смол керамическими наполнителями, такими как карбид кремния (SiC), нитрид кремния (Si_3N_4), оксид кремния (SiO_2), оксид алюминия (Al_2O_3) и оксид титана (TiO_2). Однако исследования возможных внутренних взаимодействий между наполнителями и фталонитрилом не проводились.

Недавно сингапурские исследователи продемонстрировали, что частицы оксида алюминия действуют не только как наполнители, но и как катализаторы полимеризации фталонитрила. Подтверждено, что взаимодействие между наполнителями из оксида алюминия и фталонитрилом носит химический характер, результаты ИК-спектроскопии и рентгенофазового анализа указывают на образование новых связей Al-N. Благодаря этому отмечено не только ускорение медленного процесса отверждения фталонитрила, но и значимое улучшение термомеханических свойств такого композита (термическая стабильность, коэффициент температурного расширения, механическая прочность). Снижение затрат на обработку такого "улучшенного" материала позволит расширить область применения фталонитриловых смол в медицине, сельском хозяйстве и машиностроении.

Фталонитриловые смолы – относительно новый класс коммерческих высокоэффективных технических терморезистивных материалов. По сравнению с традиционными полимерами, такими как полиимидные и цианатные сложные эфиры, они обладают высокой термической и окислительной стабильностью и выдающимися высокотемпературными свойствами. Они не изменяют свои физические свойства до разложения при последующем отверждении и не имеют вязкоупругого перехода до термического разложения. Другими важными преимуществами фталонитриловых смол являются очень низкое поглощение воды, исключительная структурная целостность при нагревании и отличная коррозионная стойкость. Но процесс их отверждения может быть очень медленным и требует

высоких температур. Чтобы понизить температуру обработки фталонитриловых смол предпринимались попытки модификации химической структуры мономера фталонитрила – включение аминогрупп для обеспечения самокаталитической полимеризации и использование различных типов катализаторов или отвердителей для катализа процесса полимеризации.

Фталонитриловые смолы хорошо смешиваются с другими полимерами или армируются различными типами наполнителей для улучшения термомеханических свойств. Керамические наполнители обычно обладают высокой прочностью, превосходной твердостью, улучшенными свойствами износа, низкой диэлектрической проницаемостью, улучшают термомеханические и антикоррозион-

ACS Omega, 2022;
DOI:10.1021/acsomega.2c02667