

## ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ НИЗКОМ ДАВЛЕНИИ

О. А. Писарев

*Институт высокомолекулярных соединений РАН, г.С.- Петербург, Россия  
pisarev@imc.macro.ru*

В течение последних лет требования к чистоте лекарственных субстанций резко возросли в связи с прогрессом медико-биологических исследований и новыми требованиями ВОЗ, исключающими применение препаратов, способных вызвать лекарственные заболевания. Выявилась необходимость строгого анализа аллергенности, токсичности и других форм воздействия препаратов на организм человека. Большинство ведущих фармацевтических фирм вышла на новый уровень качества лекарственных субстанций. Главным требованием к созданию современного медицинского и биотехнологического производства становится использование экономичных и безопасных для окружающей среды технологий в соответствии с гигиеническими нормативами ISO и достижением уровня чистоты препаратов, регламентируемой последними требованиями ВОЗ и стандартов развитых стран. Производственные схемы получения большинства лекарственных субстанций из продуктов химического и микробиологического синтеза, растительного и животного сырья включают в себя многостадийные экстракционные процессы, характеризующиеся применением токсичных галогенсодержащих растворителей, длительностью технологического цикла, большими потерями целевого продукта и несоответствием его качества нормативам мировых стандартов. Поэтому, развитие фармацевтической промышленности и биотехнологии требует развития новых селективных способов получения целевых биологически активных веществ (БАВ) из многокомпонентных сред.

Наиболее технологически гибким и относительно дешевым методом получения высококачественных лекарственных субстанций является препаративная хроматография низкого давления на полимерных сорбентах, возможности которой в отличие от метода ВЭЖХ не ограничены дороговизной процессов, протекающих при повышенном давлении с использованием микрогранульных сорбентов, а следовательно, и высокой стоимостью продуктов.

В докладе рассмотрены особенности структуры и свойств высокопроницаемых гетеросетчатых полимерных сорбентов, синтезированных в ИВС РАН посредством осадительной радикальной сополимеризации карбоновых кислот и различных поливинильных сшивающих агентов, а также использование этих сорбентов для получения лекарственных субстанций высокого качества.

Показано, что неоднородные сетчатые структуры возникают при всех режимах взаимодействующих сомономеров. В случае термодинамически “хорошего” растворителя образуются малые микробулы, порядка нанометра, которые при сшивании образуют сетчатую структуру с расстояниями между наноглобулами того же порядка, что приводит к формированию макропористой структуры. Процесс сополимеризации идет медленно, сопровождается значительной внутримолекулярной сшивкой, которая обуславливает циклизацию за счет подвешенных двойных связей. При использовании термодинамически “плохого” растворителя, несольватирующего сополимер, микробулы агломерируют в макропоры, что приводит к формированию макропористой структуры. Повышенное содержание бифункционального мономера приводит к образованию относительно жестких структурно - устойчивых сшитых

полимеров, которые характеризуются малым изменением степени набухания при изменении pH раствора.

Резко повысить степень содержания основного вещества в конечных препаратах позволяет использование двухстадийных хроматографических систем. Целью первой стадии является реализация режимов фронтальной хроматографии, при которых наблюдается максимальная термодинамическая селективность сорбции - десорбции целевого БАВ и родственных ему по химической структуре веществ из многокомпонентной смеси или культуральной жидкости ("квазиаффинная" стадия, но в отличие от аффинной хроматографии реализуемая с равновесными сорбционными емкостями, достигающими до 0.5-2.0 грамм БАВ на грамм сорбента). Элюат первой хроматографической колонки, содержащий уже только целевое БАВ и родственные ему компоненты, подается на вторую хроматографическую колонку, где осуществляется процесс малого термодинамического "сдвига" физико-химических параметров элюирующего раствора (pH, ионной силы, концентрации органического растворителя и т.д.). При этом примеси концентрируются в хроматографической зоне, отличной от зоны, занимаемой целевым компонентом, и в зависимости от типа используемого хроматографического процесса элюируются либо перед, либо после хроматографического фронта целевого БАВ. Метод "малых сдвигов" использован для получения субстанций противоопухолевых антибиотиков рубомицина, доксорубицина, карминомицина, по степени чистоты удовлетворяющим Фармакопее США, XXIII.

Известно, что при условии равновесного обострения границ стационарность фронтов хроматографических зон коионов достигается быстрее, чем у противоионов. Такую кинетическую ситуацию наиболее легко реализовать при взаимодействии органических анионов с слабокислотными карбоксильными катионитами. В этом случае селективная сорбция должна в основном определяться неионным взаимодействием сорбент-сорбат, а селективная десорбция - ионизацией кислотных групп сорбента и сорбата, и, соответственно, переходом сорбированного органического иона в состояние коиона. Кроме того, изучение взаимодействия органических анионов с карбоксильными катионитами полезно и в технологическом плане, так как использование полимерных анионитов в препаративной хроматографии сильно затруднено из-за сложности и длительности регенерации, незначительной устойчивости полимерной структуры к действию гидролизующих агентов, а также малых значений величин равновесных коэффициентов распределения по целевым анионам. Метод коионно-гидрофобной хроматографии применен для очистки органического аниона - антибактериального антибиотика фузидиевой кислоты.

Антибактериальный антибиотик эремомицин, инсулин из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота, а также главный компонент пчелиного яда - мелиттин получены в высокоочищенном состоянии методом фронтально-вытеснительной хроматографии, где образование резких фронтов хроматографических зон разделяемых компонентов достигается подбором соответствующего вытеснителя.

Ещё одним подходом к оптимизации препаративных хроматографических разделений биологически активных веществ является реализация различий в кинетике сорбции для отдельных компонентов сорбтива с использованием эффектов инверсии селективности сорбции. Для конкретных наборов равновесных и кинетических характеристик сорбтивов могут быть определены области неравновесных режимов динамики сорбции, при которых дистанция между разделяемыми компонентами значительно увеличивается при существенном сокращении времени эксперимента по сравнению с традиционным принципом максимального различия коэффициентов распределения в рамках равновесного хроматографического процесса.