

Andrzej BYLINA¹, Marian KAMIŃSKI²

¹ emeryt TZF POLFA S.A., 03-176 Warszawa, ul. Fleminga 2,

² Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, 80-2333 Gdańsk, ul. Narutowicza 11/12

Adresy do korespondencji:

Andrzej Bylina,

ul. Siwińskiego 3 m 16

05-120 LEGIONOWO

e-mail: andrzej.bylina@gmail.com

Tel. (22) 7749349

Marian Kamiński

ul. Narutowicza 11/12

80-233 GDAŃSK

e-mail: mknkj@chem.pg.gda.pl

Tel. (58) 3471729, albo 601401824

PREPARATYWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA, PODSTAWOWE ZASADY EFEKTYWNEGO STOSOWANIA, ELEMENTY PRAKTYKI

Preparatywna chromatografia cieczowa jest techniką używaną do wyodrębniania pojedynczej, lub kilku substancji z mieszaniny kilku, albo bardzo wielu substancji, szczególnie o bardzo zbliżonych strukturach molekularnych, w tym, także do rozdzielania i otrzymywania izomerów optycznych. W pracy zamieszczono ogólne zasady optymalnego stosowania. Szczególną uwagę zwrócono na wybór sorbentu, ekonomię i problem rozpuszczalności próbki. Te problemy zostały opisane w oparciu o rzeczywiste procedury rozdzielania, stosowane w praktyce w laboratorium przemysłu farmaceutycznego.

Słowa kluczowe: *preparatywna chromatografia cieczowa, zasady ogólne stosowania, dobór sorbentu, rozpuszczalność próbki.*

PREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY, PRINCIPLES AND EXAMPLES OF APPLICATION IN PRACTICE

Preparative liquid chromatography has been used as a tool for isolation of pure substances from a crude material first of all for separation of very complex mixtures and mixtures of similar compounds, e.g. isomers, optical isomers etc.. The general principles of PLC application, sorbent selection, economy and sample solubility problems are described based on the fragments of the real experiments and procedures.

Key words: *preparative liquid chromatography, general principles of application, sorbent selection, sample solubility.*

WSTĘP

Teoria preparatywnej chromatografii, została sformułowana wiele lat temu. Podstawy tej dziedziny zawarte są w godnej polecenia monografii [1]. Jest też kilka innych publikacji o fundamentalnym znaczeniu, a wśród nich prace Hupe i Lauera [2]. Z polskich autorów należy wymienić, nieżyjących

już - inicjatora rozwoju polskiej aparatury i opracowania metod wykorzystania preparatywnej chromatografii cieczowej, prof. Jerzego S. Kowalczyka [3] i dr Barbarę Śledzińską [4].

Ogólne zasady postępowania w celu maksymalizacji efektywności wykorzystania chromatografii do rozdzielania i otrzymywania użytkowych ilości substancji, w tym, szczególnie substancji o aktywności farmaceutycznej, zostały m.in. opisane w cytowanych powyżej pracach [1-6]. Najważniejsze wnioski tam zawarte można streścić w następujący sposób:

- Produktywność kolumn o jednakowej długości jest proporcjonalna do powierzchni przekroju poprzecznego wypełnienia. Stąd n -krotne zwiększenie średnicy kolumny powoduje ok. n^2 -krotny wzrost produktywności.
- Ze względów ekonomicznych wszystkie parametry procesu rozdzielania należy optymalizować w skali kolumny modelowej o średnicy dc 4-8 mm, o długości (L_c) i wypełnionej takim samym sorbentem, jak kolumna preparatywna. W warunkach kolumny modelowej należy dobrać optymalnie: układ chromatograficzny, tzn. rodzaj fazy stacjonarnej i skład eluentu, długość kolumny (L_c), wielkość ziaren wypełnienia (d_p), prędkość przepływu eluentu (u), objętość dozowania (V_{inj}), stężenie roztworu dozowanego (C_{inj}), rodzaj rozpuszczalnika wsadu (najkorzystniejsze jest stosowanie eluentu jako rozpuszczalnika wsadu), punkty kolekcji frakcji, zapewniające określoną czystość produktu, a także warunki detekcji zapewniające wystarczającą czułość oraz liniowość odpowiedzi detektora.
- Najważniejsze znaczenie dla uzyskania wysokiej produktywności kolumny ma maksymalizacja selektywności układu chromatograficznego przy jak najwyższej sprawności kolumny oraz utrzymanie wartości współczynnika retencji rozdzielanych składników szybciej eluowanych z kolumny – w zakresie od 1 do 5 oraz składników najpóźniej eluowanych z kolumny – w zakresie od 5 do 12;
- Należy preferować elucję izokratyczną, tzn. z zastosowaniem eluentu o stałym składzie. Tylko w przypadku rozdzielania peptydów i białek, konieczne jest z reguły wykorzystywanie elucji gradientowej, ponieważ elucja izokratyczna nie zapewnia najczęściej dostatecznej selektywności rozdzielania tych substancji.
- Gdy to tylko możliwe, należy dążyć do stosowania warunków, tzw. przeładowania stężeniowego kolumny (wysokie stężenie i mała objętość dozowania), a nie objętościowego (niskie stężenie i wysoka objętość dozowania, konieczne niestety, gdy rozpuszczalność rozdzielanych substancji w eluencie jest bardzo niska). Korzystny jest więc taki dobór eluentu, aby był on dobrym rozpuszczalnikiem wszystkich składników wsadu do kolumny i najkorzystniej jest dozować mieszaninę substancji rozdzielanych rozpuszczoną w eluencie.
- W praktyce istnieje optymalna wartość długości kolumny preparatywnej (L_c) oraz linowej prędkości przepływu eluentu (u), zapewniająca maksymalną produktywność kolumny preparatywnej. Optymalna wartość L_c jest tym mniejsza, a optymalna prędkość przepływu eluentu oraz produktywność kolumny, a także konieczne maksymalne ciśnienie pompowania

eluentu - tym większe, im mniejsza jest średnica ziaren wypełnienia kolumny.

W dalszej części niniejszej pracy opisano kilka problemów praktycznych związanych z optymalnym stosowaniem cieczerwowej chromatografii preparatywnej do rozdzielania i otrzymywania czystych substancji i podano optymalne, uzyskane w rezultacie badań, ich rozwiązania.

Każde zadanie zaczynające się od słów „należy wyodrębnić ...”, o czystości nie gorszej niż ...”, posiada wiele uwarunkowań lokalnych, poczynając od szczegółów syntezy, własności wyodrębnianej substancji, po warunki techniczne, jakimi dysponuje zamawiający opracowanie. Wspomaganie komputerowe doświadczeń [8, 9] oraz ocena elementów ekonomicznych chromatograficznego procesu przemysłowego [10] są niezbędne przy realizacji postawionego zadania. Celem niniejszej pracy jest zwrócenie uwagi na niektóre elementy postępowania (dobór sorbentu, rachunek ekonomiczny) i trudności, z jakimi spotyka się eksperymentator (np. słaba rozpuszczalność składników próbki (wsadu)). W opisie przytoczono niektóre wyniki uzyskane w praktyce.

Pierwsze polskie wdrożenia

Dr B. Śledzińska i współpracownicy [4,7] opracowali optymalne warunki technologii otrzymywania lanatozydu C z ekstraktu alkoholowego *digitalis lanata* (z brunatnicy wełnistej), a potem proscylarydyny otrzymywanej z ekstraktu alkoholowego, z tzw. cebuli morskiej. Obie technologie zostały wdrożone i stosowane w latach 80. ubiegłego wieku w KZF POLFA w Kutnie. Warto przy tym zwrócić uwagę, że zastosowano wówczas chromatografię w układzie faz normalnych z dynamicznie generowaną fazą stacjonarną bogatą w wodę. „Nośnik” stanowił żel krzemionkowy typu H60, a fazę ruchomą mieszanina metanolu i chlorku metylenu w stosunku objętościowym 94/6, zawierającą ok. 0.12% wody (poniżej granicy rozpuszczalności wody w układzie $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$). W tych warunkach ma miejsce kondensacja kapilarna roztworu wody i metanolu w porach wypełnienia kolumny i typowe warunki chromatografii podziałowej [4]. Tego typu układy chromatograficzne charakteryzują się szczególnie wysoką pojemnością sorpcyjną i wysoką wydajnością kolumny. Są też one szczególnie odporne na występujące w śladowych stężeniach zanieczyszczenia wsadu, silnie sorbowane do powierzchni żelu krzemionkowego. Są szczególnie przydatne do rozdzielania i otrzymywania, także w skali procesowej, glikozydów i alkaloidów.

Buprenorfina

Należało odzyskać cenny produkt - buprenorfinę (lek przeciwbólowy), a także nieprzereagowany cenny substrat z mieszaniny poreakcyjnej, gdy w czasie reakcji pojawiły się produkty rozkładu buprenorfiny (MS). Podczas jednego rozdzielania i wyodrębniania, z zastosowaniem odpowiedniej kolumny preparatywnej, zdołano otrzymać 1500 mg czystego krystalicznego produktu w pierwszej zebranej frakcji oraz czysty substrat reakcji, zawarty

w drugiej frakcji. Nie była to ogromna masa, ale był to surowiec na prawie 4000 tabletek leku (WZF POLFA).

2-CDA

Wilgotne kryształy o brunatnym zabarwieniu były surowcem, z którego po syntezie [11] wyodrębniano czystą substancję nazywaną w skrócie 2-CDA (2-chlorodeoxyadenozyna, lek przeciw białaczce kosmatokomórkowej). Wykorzystano kolumnę produkcji Merck (Niemcy) o wymiarach $L_c \times d_c = 20 \times 5$ cm, wypełnioną sferycznym sorbentem C18, o ziarnie $d_p = 7$ μm . W fazie ruchomej (ACN / MeOH / bufor), używanej do oznaczeń analitycznych, zamieniono bufor fosforanowy o $\text{pH} = 2.50$ na roztwór H_2SO_4 w wodzie o takim samym pH . Wyniki rozdzielania wykonanego w warunkach braku przeładowania kolumny (w warunkach „analitycznych”) z zastosowaniem kolumny preparatywnej (dozowanie 3 ml roztworu, zawierającego 30 mg surowca rozpuszczonego w fazie ruchomej, przepływ 30 ml/min, detekcja 254 nm), były następujące: zanieczyszczenie 1 ($k_1 = 3.8$, $N_1 = 11560$), zanieczyszczenie 2 ($k_2 = 6.27$), 2-CDA ($k_3 = 7.67$, $\alpha_{32} = 1.22$), dalsze zanieczyszczenia $k > 15$. Po symulacjach z wykorzystaniem programu Craiga ustalono optymalne warunki rozdzielania preparatywnego (w warunkach stężeniowego przeładowania kolumny). Wykonano następującą procedurę: do kolumny dozowano roztwór wsadu o objętości $2.6 V_0$, tzn. 2.6-krotność tzw. objętości martwej kolumny (500 ml surowca rozpuszczonego w wodzie, w tym około 5 g 2-CDA), z kolei, po wprowadzeniu mieszaniny substancji zaadsorbowanych na powierzchnię wypełnienia kolumny, procedura elucji była następująca: $7.7 V_0$ fazy ruchomej, $1.5 V_0$ metanolu (tzw., „mycie” kolumny, tzn. elucja silnie sorbowanych zanieczyszczeń wsadu w formie jednej strefy), $1.5 V_0$ (reaktywacja zdolności sorpcyjnej kolumny z zastosowaniem eluentu). W opisanym postępowaniu, po wprowadzeniu do kolumny rozdzielanego roztworu (wsadu), ciśnienie w układzie wzrastało powoli od poziomu 800 psig, nie przekraczając dopuszczalnej dla kolumny wartości 1400 psig, aż do momentu, gdy zanieczyszczenie 1 opuściło kolumnę. W wycieku z kolumny (eluacie) można było zauważyć „nietrwałą mgiełkę” wytrąconej substancji. Po tym momencie ciśnienie szybko wracało do pierwotnego poziomu. Było to następstwo „szoku stężeniowego” wywołanego zmianą fazy wodnej, którą stanowił roztwór dozowany do kolumny, na duże stężenie rozdzielanych substancji w fazie ruchomej, przewyższające stężenie roztworu nasyconego. Wystąpiła krystalizacja, jednak nie blokująca całkowicie kolumny chromatograficznej.

Fracja główna była kierowana na grawitacyjną kolumnę jonitową. Odkwaszony roztwór służył do wyodrębnienia czystej substancji (odzysk $> 90\%$, zanieczyszczenia poniżej 0.2% ww.). Wydajność procesu chromatograficznego: 3 g krystalicznej substancji 2-CDA/godz. lub 4.5 g podczas każdego cyklu rozdzielania. Wartość dwóch chromatograficznych rozdzielań zwracała zakup kolumny. Obecnie parametry tego procesu chromatograficznego są już inne, składniki fazy ruchomej zostały zastąpione innymi substancjami, wydajność jest nieco mniejsza, zaś ryzyko niepowodzenia pod-

czas rozdzielania zostało sprowadzone do minimum, a 2-CDA służy do wytwarzania leku (BIOTON).

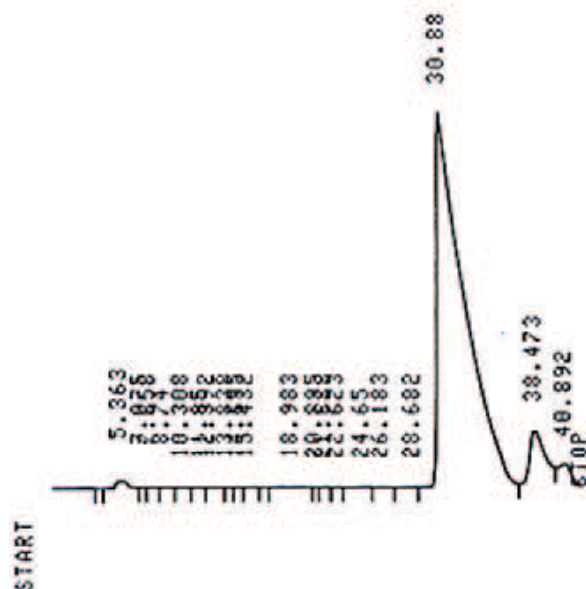
Analog prostaglandyny

Z zastosowaniem siedmiu wybranych sorbentów (handlowe analityczne kolumny wypełnione 5 μm sorbentem, w tym przypadku pełniące funkcję kolumn modelowych), przeprowadzono pomiar współczynników pojemnościowych produktu i najbliższych sąsiadujących zanieczyszczeń (z_1 , z_2), wyliczono selektywność kolumny (α), sprawność badanych kolumn (N) oraz oceniono względną pojemność sorbentów w stosunku do produktu (k_{2x}/k_{2G}). Pomiary prowadzono stosując wcześniej dobraną fazę ruchomą w układzie faz normalnych (NP). Przy doborze składu fazy ruchomej obserwowano zmniejszanie się selektywności rozdzielania ze wzrostem udziału moderatora fazy. Wyniki pokazano w tabeli 1.

Tabela 1. Badanie sorbentów

Kolumna analityczna wypełniona sorbentem	k_1 z1	k_2 produkt	k_3 z2	α_{21}	α_{32}	N_2	Względna pojemność
A (silica gel)	12.25	13.66	16.17	1.12	1.18	8900	2.28
B (silica gel)	7.40	8.14	9.56	1.10	1.17	6500	1.36
C (silica gel)	9.42	10.32	12.19	1.096	1.18	8100	1.73
D (silica gel)	8.94	9.74	11.53	1.089	1.18	9000	1.63
E (silica gel NH_2)	10.13	11.17	12.62	1.10	1.13	10500	1.87
F (silica gel CN)	4.36	4.85	5.37	1.11	1.11	12300	0.81
G (silica gel)	5.27	5.98	6.88	1.14	1.15	10200	1.00

Im mniejsza selektywność sorbentu tym mniejsza wydajność otrzymywania czystej substancji. Im większe k -tym większe zużycie fazy ruchomej. Wybrano kolumnę analityczną wypełnioną sorbentem G i wykonano chromatogram w warunkach przeładowania kolumny. Dozowano 500 μL roztworu surowca (10 mg/mL) w heptanie. Każde dozowanie zostało poprzedzone dozowaniem do kolumny 500 μl czystego heptanu, przepływ fazy ruchomej 0.5 ml/min, chromatograf Shimadzu LC-6A pracował w warunkach izokratycznych. Na rysunku 1 pokazano chromatogram z tego doświadczenia. Zebrano frakcję główną poczynając od maksimum piku do 1/3 wysokości rejestrowanego piku. Odebrany roztwór został poddany pomiarom HPLC na rutynowej kolumnie analitycznej i kolumnach stereospecyficznych z uwagi na strukturę analogu prostaglandyny. Dalsze doświadczenia były prowadzone na większej kolumnie wypełnionej 5 μm sorbentem G.

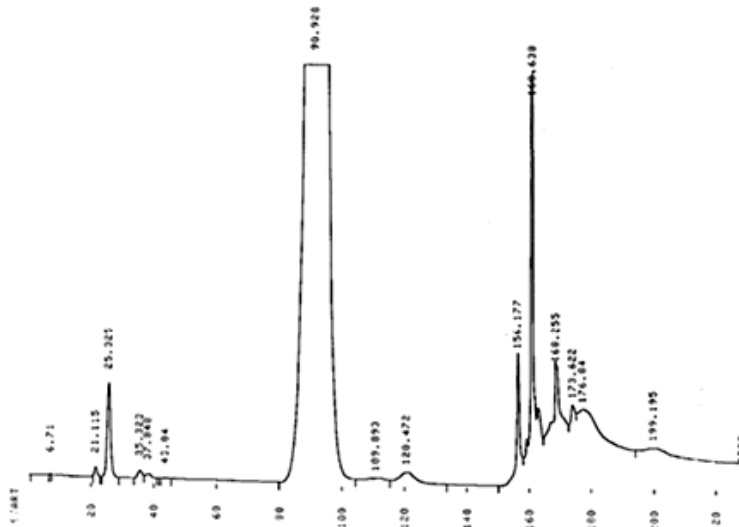


Rysunek 1. Preparatywny chromatogram surowca po syntezie analogu prostaglandyny wykonany z zastosowaniem kolumny analitycznej (modelowej) wypełnionej 5 µm sorbentem G

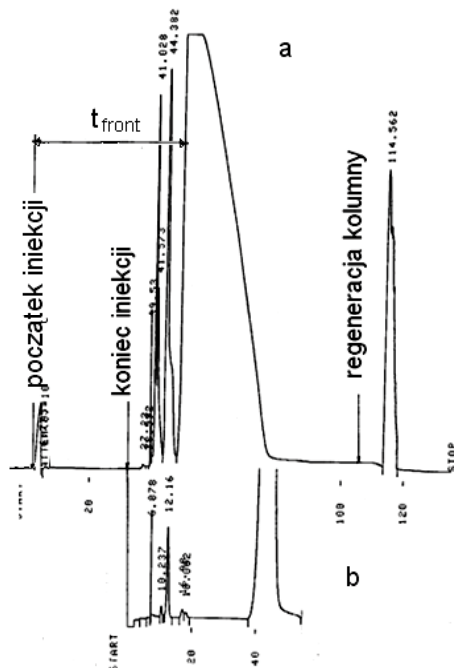
AZT

Przykładem opisu doboru warunków i oceny wielkoskalowego procesu wyodrębniania na kolumnie 10x25 cm było otrzymanie AZT (azydotymidyna, lek o działaniu anti-HIV) z surowca po syntezie, zawierającego ok. 90% AZT. Doświadczenia wykonano z wykorzystaniem kolumny mikropreparatywnej 1x25 cm wypełnionej sorbentem sferycznym DAISOGEL C8, o $d_p = 13 \mu\text{m}$, firmy DAISO CO LTD, na chromatografii Shimadzu LC-6A oraz BIO-RAD, z fazą ruchomą $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 20/80$ (v/v). Planowanie rozdziałów preparatywnych było poprzedzone wyliczeniami opartymi na modelu idealnej chromatografii. Na rys. 2 przedstawiono chromatogram z analitycznym naniesieniem wykonany na mikropreparatywnej kolumnie (20 µl wodnego roztworu surowca o stężeniu 10 mg/ml, roztwór prawie nasycony).

Porównanie chromatogramów uzyskanych z analitycznego i preparatywnego naniesienia wykonanych na tej samej kolumnie przedstawiono na rys. 3. Oba chromatogramy są tak złożone, że czasy końca zastrzyku są wspólne. Tam, gdzie znajduje się koniec etapu dozowania, pojawia się w kolumnie chromatograficznej prawie zerowe stężenie substancji i ten punkt „wędruje” wzdłuż kolumny tak samo wolno jak strefa substancji dozowana w warunkach braku przeładowania. Oba takie punkty opuszczają kolumnę w tym samym czasie licząc od końca czasu dozowania mieszaniny do kolumny.



Rysunek 2. Chromatogram AZT po syntezie, kolumna 1x25 cm, faza ruchoma MeOH/H₂O = 20/80, przepływ 1.2 ml/min, detekcja 265 nm, ciśnienie ok. 3 bary, V₀ = 12.76 ml, chromatografia izokratyczna do 140 minut, potem 20-minutowa elucja gradientowa do 100% MeOH i dalej 100% MeOH.



Rysunek 3. Chromatogram preparatywny (a) i analityczny (b) zostały tak zestawione, aby pokrył się czas końca dozowania. Przepływ 2.5 ml/min, detekcja 300 nm (a), 265 nm (b), ciśnienie około 17 bar, objętość dozowania V_{inj} = 80 ml (800 mg) (a), V_{inj} = 20 μl (0.2 mg) (b). Regenerację kolumny (a) włączono około 107 minut.

Opracowana procedura miała następujące parametry: przepływ 5 ml/min, długość fali detekcji 300 nm, ciśnienie około 35 bar, objętość dozowania $V_{inj} = 120\text{ml}$ ($V_{inj}/V_0 = 9.40$, czas iniekcji 24 min, masa 1200 mg, 120 mg surowca na 1 g sorbentu). Objętość fazy ruchomej pompowana do wystąpienia frontu piku AZT wynosiła 25 ml ($V_{front}/V_0 = 1.96$, czas 5 min). Frakcję główną odbierano pomiędzy absorbancją 2.56 (sygnał detektora poza zakresem pomiarowym), a absorbancją 0.5 (koniec frakcji). Była to objętość $V_{frakcja} = 69\text{ ml}$ ($V_{frakcja}/V_0 = 5.4$, czas 13.8 min). Regeneracja kolumny: 26 ml MeOH ($V_{MeOH}/V_0 = 2.04$, czas 5.2 min), regeneracja wodą: 13 ml ($V_{H_2O}/V_0 = 1.02$, czas 2.6 min). Całkowity czas rozdzielania z regeneracją kolumny wynosił 51 minut. Po odparowaniu do sucha frakcji głównej i po krystalizacji pozostałości z wody, uzyskano 1.02 g AZT. Wykonano 5 różnych chromatogramów, a ich wyniki posłużyły do wyznaczenia pojemności stężeniowej kolumny C^0 [M]. Posłużono się zależnością opisującą w modelu idealnej chromatografii czas pojawienia się frontu przeladowanego piku (rys. 3):

$$\frac{t_{front}}{t_0} = 1 + v_{inj} + g_{front} \quad (1)$$

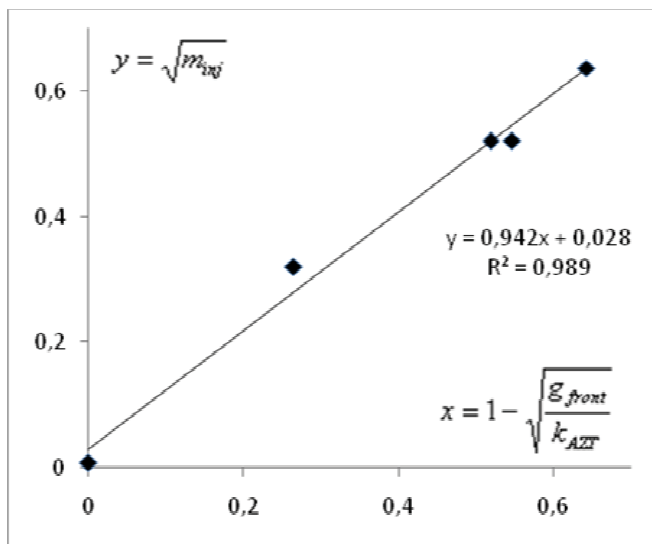
oraz zależnością wiążącą bezwymiarową masę m_{inj} dozowanego AZT z współczynnikiem pojemnościowym g_{front} charakteryzującym położenie frontu piku AZT na chromatogramie pojedynczej substancji w przypadku izoterm Langmuira:

$$\sqrt{m_{inj}} = \sqrt{C_{inj} \cdot v_{inj}} = \sqrt{\frac{C_{inj}[M] \cdot V_{inj}}{C^0[M] \cdot V_0}} = 1 - \sqrt{\frac{g_{front}}{k_{AZT}}} \quad (2)$$

Wyniki zestawiono w tabeli 2 i na rysunku 4. Wyznaczona metodą najmniejszych kwadratów stężeniowa pojemność kolumny wynosi $C^0 = 0.78$ [M], a to oznacza, że 1 liter badanej kolumny posiada $0.78 \cdot V_0/V_{geom} = 0.51$ mola miejsc aktywnych do adsorpcji AZT.

Tabela 2. Położenie frontu przeladowanego piku AZT na chromatogramie

F [ml/min]	V_{inj} [ml]	t_{front} [min]	$v_{inj} = V_{inj}/V_0$	g_{front}	m_{inj}
1,2	0,02	90,9	0,002	7,55	6,77E-05
1,2	30	79	2,35	4,08	0,102
2,5	80	46	6,27	1,74	0,271
5,0	80	22,5	6,27	1,55	0,271
5,0	120	29	9,40	0,96	0,406



Rysunek 4. Zależność zastrzykniętej masy AZT od położenia frontu piku

Należy zwrócić uwagę na stężenie AZT w maksimum piku chromatograficznego około 30 mg/mL. Jest to stężenie dużo wyższe niż w roztworze dozowanym, wyższe niż rozpuszczalność AZT w wodzie, lub fazie ruchomej. Taki „szok stężeniowy” ma miejsce w czasie kontaktu fazy ruchomej z substancją zaadsorbowaną z fazy bogatszej w wodę niż faza ruchoma. Ten szokowy wzrost stężenia jest następstwem bilansu masy i równowagi termodynamicznej obowiązującej substancję adsorbującą się pomiędzy powierzchnią sorbentu i fazą ruchomą. W tym przypadku ustala się równowaga procesu adsorpcji–desorpcji pomiędzy powierzchnią sorbentu bogatego w AZT zaadsorbowany z fazy wodnej roztworu dozowanego ($k_{H_2O}^{AZT} \gg k_{faza}^{AZT}$), a fazą MeOH/H₂O = 20/80, dając w efekcie stężenie AZT w fazie ruchomej dużo wyższe niż w roztworze nasyconym. Trwałość roztworu przesyconego zależy od wielu czynników, dlatego w takich postępowaniach wymagana jest daleko posunięta ostrożność i ciągła kontrola ciśnienia mierza chromatografu.

Badanie czystości produktu na płytce TLC (fluorescencja) wykazała obecność jednego zanieczyszczenia, którego zawartość oceniono na mniej niż 0.5%. Było to zanieczyszczenie zawierające rdzeń tyminy, nie należące do zanieczyszczeń wymienianych przez farmakopee. Na wykonanym wg farmakopei chromatogramie stwierdzone zanieczyszczenie znajduje się na końcu zbocza piku AZT.

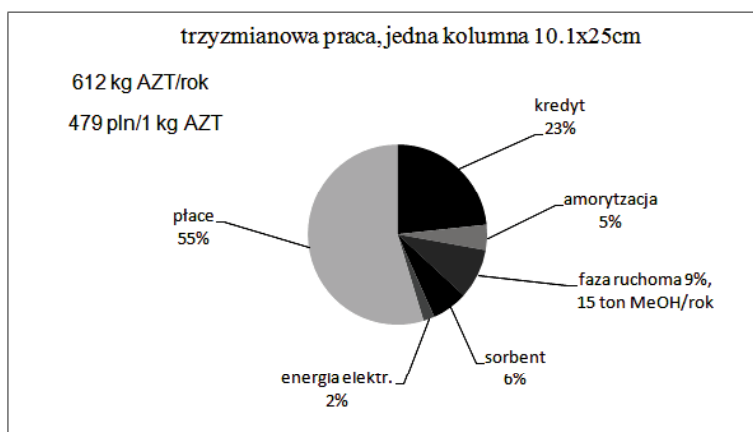
Taka sytuacja wymaga dodatkowych badań. Są to: wyodrębnienie zanieczyszczenia, aby stwierdzić jego strukturę (MS, NMR), sprawdzenie, czy nie jest to produkt reakcji zanieczyszczenia, któregoś z głównych substratów, procesu otrzymywania AZT, podziału frakcji głównej na dwie frakcje,

z których jedna poddana byłaby dodatkowej obróbce, itp. Wykonanie takich badań wymaga pracy na większej kolumnie z wykorzystaniem większej ilości materiału po syntezie.

Tabela 3. Dane kolumny mikropreparatywnej, prognoza dla kolumny preparatywnej

Wyszczególnienie	Kolumna mikro preparatywna	Kolumna produkcyjna
Masa sorbentu w kolumnie	10 [g]	1.01 [kg]
Objętość geometryczna złoża	19.6 [ml]	2.00 [l]
Objętość własna kolumny V_0	12.76 [ml]	1.30 [l]
Przepływ fazy przez kolumnę	5.0 [ml/min]	0.51 [l/min]
Objętość dozowania V_{inj}	120 [ml]	12.24 [l]
Dozowana masa M_{inj}	1.2 [g]	0.122 [kg]
Objętość fazy r. do frontu AZT	25.0 [ml]	2.55 [l]
Objętość frakcji głównej	69.0 [ml]	7.04 [l]
Masa odzyskanego AZT	1.02 [g]	0.104 [kg]
Regeneracja metanolem	25.5 [ml]	2.60 [l]
Regeneracja wodą	12.8 [ml]	1.30 [l]
Czas całkowity 1 cyklu rozdzielania	51 [min]	51 [min]

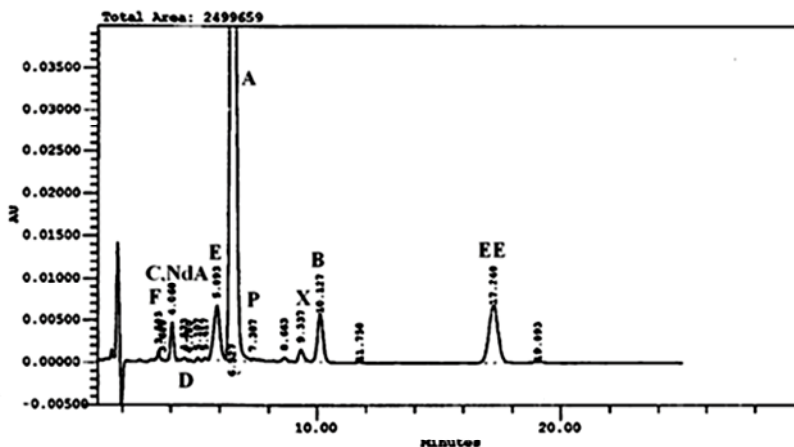
Wyniki doświadczeń przeliczono i zestawiono niektóre parametry kolumny 1x25 cm i procesu z kolumną (oferowaną) 10.1x25 cm wypełnioną badanym sorbentem (tabela 3). Sporządzono ocenę udziału różnych czynników w koszcie chromatograficznego oczyszczania 1 kg AZT na drodze preparatywnej chromatografii na jednej kolumnie 10.1x25 cm, pracującej 5000 godzin w ciągu roku (praca trzymianowa). Ocena została sporządzona do dyskusji w kierownictwie firmy, w warunkach ekonomicznych roku 1998 przy kursie: 3.54 pln/USD. Wynik przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Rozkład różnych udziałów w cenie uzyskania 1 kg AZT oczyszczonego w procesie chromatografii preparatywnej

Wzorce EMC

Produkcja erytromycyny A (EMC A, antybiotyk) w TZF POLFA, do kontroli postępu biosyntezy i procesu oczyszczania produktu wymagała wielu analiz dziennie. Cały proces technologiczny otrzymywania EMC A był kontrolowany metodami chromatograficznymi korzystającymi z wzorców (HPLC metoda farmakopealna w środowisku obojętnym, trwająca 60 minut, HPLC w środowisku alkalicznym 20 minut, HPLC z detekcją elektrochemiczną 10 minut i TLC). Sprawdzano obecność EMC innych niż EMC A. Proces technologiczny charakteryzują następujące stwierdzenia. Erytromycyna B powstaje obok EMC A w warunkach niedotlenienia hodowli *Sterptomyces erythreus*. Przyjmuje się, że EMC C jest prekursorem EMC A, EMC D jest prekursorem EMC B, EMC F jest prekursorem EMC E. Anhydro EMC A (EMC P), enoloeter EMC A (EE), enoloeter pseudo-EMC A (EMC X) powstają w wyniku kwaśnej hydrolizy EMC A [12, 13]. Na rysunku 6 przytoczono przykładowy chromatogram pokazujący położenia pików zanieczyszczeń.

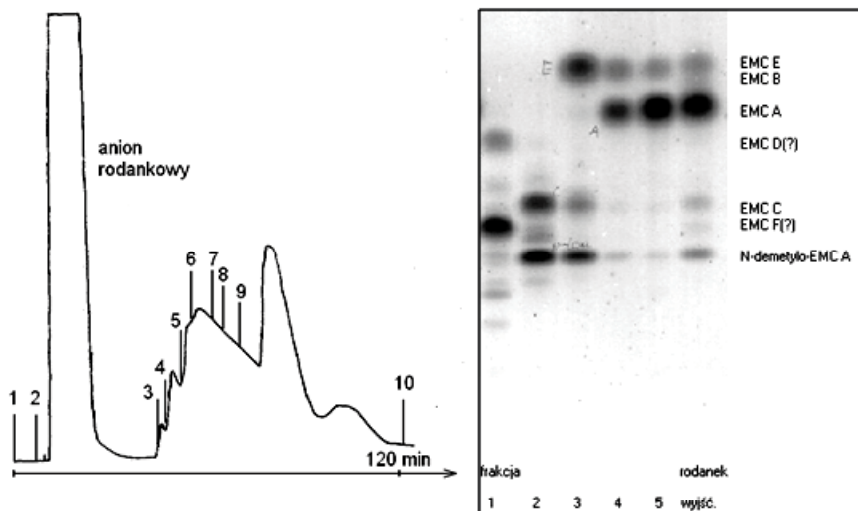


Rysunek 6. Chromatogram EMC w środowisku alkalicznym (20 mM $K_2HPO_4/ACN = 1/1$, pH = 10.5, kolumna Suplex PKB-100), pokazujący rozkład zanieczyszczeń EMC A [14]

Te lokalne wzorce o czystości powyżej 95% czystej substancji otrzymywano na drodze preparatywnej chromatografii z odpadów po krystalizacji przeznaczonych do utylizacji. Były to wzorce EMC: C, E, F, N-demetylo-EMC A (NdA). Do otrzymania wzorców EMC A i EMC B wykorzystywano handlową EMC A oraz 70% substancje z doświadczalnej produkcji EMC B. Substancje EMC P, EE, EMC X otrzymywano na drodze prostych przekształceń chemicznych EMC A [12,13] z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii po syntezie.

Opis warunków wyodrębniania EMC z odpadów: chromatograf Delta Prep Waters, przepływ 25 ml/min, detekcja 270 nm, droga optyczna 0.2 cm, zakres 2.0 AUFS, kolumna DAN Process 25x5 cm wypełniona sorbentem Daisogel C8, dp = 13 μm , faza ruchoma: 38% bufor (0.1 M $(NH_4)HCO_3$

o pH = 10.0) oraz 62% MeOH (v/v), dozowanie 200 ml przesyconego roztworu 10 g rodanku EMC (postępowanie wg specjalnej procedury), faza regenerująca kolumnę: 20 mM NaHSO₄/EtOH = 25/75, faza „postojowa” podczas przechowywania kolumny: H₂O/EtOH = 30/70. Przykładowy chromatogram preparatywny oraz wynik analizy TLC otrzymanych frakcji pokazano na rysunku 7.



Rysunek 7. Chromatogram preparatywny. Markery: 1-2 zakres dozowania, 3-4 frakcja 1 (60 ml; 65 mg), 4-5 frakcja 2 (125 ml; 375 mg), 5-6 frakcja 3 (100 ml; 424 mg), 6-7 frakcja 4 (180 ml; 1100 mg), marker 8: początek zrzucania fazą regenerującą, 7-9 frakcja 5 (200 ml; 1000 mg). Marker 10 koniec regeneracji i początek stabilizacji kolumny fazą ruchomą (2 V₀). Chromatogram TLC: frakcje od 1 do 5 i materiał wyjściowy

Z każdej odebranej frakcji usuwano MeOH na wyparce próżniowej w temperaturze 50°C, a produkt ekstrahowano chlorkiem metylenu z wodnego roztworu.

Otrzymane frakcje, po uzyskaniu odpowiedniej masy substancji, rechromatografowano raz, dwa lub trzy razy w warunkach podobnych do opisanych. Produkt końcowy krystalizowano otrzymując dwu-wodzian konkretnej EMC. Otrzymanie 1 g spodziewanej EMC F, do analiz identyfikacyjnych MS i NMR i jako wzorca, wymagało wielu powtórzeń. Łączne otrzymanie np. 100 g wzorców wg wybory laboratorium Kontroli Jakości wymagało pracy 3 osób i czasu około 3 miesięcy. Stosowano też naniesienie 30 g rodanku EMC oraz fazę ruchomą o składzie 45%bufor/55%MeOH. Erytromycyna A charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością i ujemnym współczynnikiem temperaturowym rozpuszczalności w wodzie i wodno metanolowych roztworach. We wszystkich postępowaniach z EMC, roztwór do naniesienia na kolumnę był roztworem silnie przesyconym, sporządzanym wg następującej procedury. Naważka preparatu była rozpuszczana w MeOH, sączona

i schładzana do -23°C . Ten zimny roztwór był mieszany z podobnie schłodzonym roztworem buforu, tak by końcowe objętościowe stężenie metanolu było niższe niż w danej fazie ruchomej (np. 50% MeOH). Sporządzony roztwór był natychmiast wprowadzany na kolumnę chromatograficzną, a osoba wykonująca tę czynność pilnowała, aby żaden mały pojawiający się kryształek nie został zassany do pompy chromatografu.

Ujemny współczynnik temperaturowy rozpuszczalności EMC wskazuje na możliwość istnienia termodynamicznie nietrwałej formy krystalograficznej [15]. Takie podejrzenia potwierdzały różniące się rentgenogramy proszkowe wykonane w roztworze będącym zawiesiną wytrąconych w niskiej temperaturze kryształów oraz po wysuszeniu ich na powietrzu. Stwierdzono też, że wodny roztwór EMC A otrzymany z frakcji głównej, po usunięciu metanolu na wyparce, nie krystalizował, choć jego stężenie w 50°C sięgało 140 mg/ml, zaś stwierdzona rozpuszczalność (równowaga roztworu z kryształami preparatu wyjściowego) wynosiła w tych warunkach mniej niż 1 mg/ml. Świadczy to o trudnościach w powstawaniu znanej struktury ortorombowej kryształu dwu-wodzianu erytromycyny A [16, 17], pod nieobecność innych podobnych związków lub śladów kwasów tłuszczowych z procesu biosyntezy.

Pik X doksycykliny

Na początku farmakopealnego chromatogramu doksycykliny (antybiotyk) występuje tzw. pik X. Wyodrębnienie tej substancji z odpadów po produkcji formy leku dla potrzeb Kontroli Jakości było beznadziejnym przedsięwzięciem. Na podstawie sugestii o tym, co powoduje powstanie tej substancji i kilku prób, wykonano poniższe doświadczenie. W wodnym roztworze (200 ml) rozpuszczono 10 g doksycykliny (hyclate), 50 g Na_2SO_4 , 100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (przeciwutleniacz). Roztwór umieszczono na 48 h w temperaturze 50°C . Do roztworu dodano 50 ml fazy ruchomej (woda/EtOH = = 80/20) i wprowadzono na kolumnę 5x25 cm wypełnioną sorbentem Daisogel C8. Z otrzymanej frakcji głównej ($2 V_0$) usunięto etanol na wyparce, a roztwór wodny poddano liofilizacji. Otrzymano 500 mg brązowej substancji zawierającej wg HPLC 95.3% substancji X. Pomiar MS pokazał identyczność doksycykliny i substancji X. Na podstawie ^{13}C NMR potwierdzono wniosek z MS. Na podstawie ^1H NMR stwierdzono, że podwojone sygnały 6- CH_3 należą do dwóch epimerów doksycykliny. Pik X jest mieszaniną 4-epidoksycykliny i 4,6-epidoksycykliny.

To opracowanie poświęcamy pamięci tragicznie zmarłej Pani mgr Grażyny Osmólskiej, Kierowniczki Laboratorium Badawczo-Rozwojowego Insuliny TZF POLFA, a także niezującym już pionierom praktycznego stosowania preparatywnej chromatografii do otrzymywania farmakopealnie czystych leków nasercowych – Pani dr Barbary Śledzińskiej i twórcy w roku 1964 pierwszego w Polsce semi-preparatywnego wysokociśnieniowego chromatografu cieczowego - Panu prof. Jerzemu S. Kowalczykowi.

LITERATURA

1. Guiochon G., Golshan-Shirazi S., Katti A.: *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Academic Press (1994).
2. Hupe K.P., Lauer H.H.: Optimization of Preparative LC Separation, *J. Chromatogr.*, 203, (1981), 41-57.
3. Kowalczyk J.S., Gazda K., Kamiński M., Klawiter J., Makuch B.: Cieczowa chromatografia preparatywna i produkcyjna, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 33, (1988), 237-257.
4. Kamiński M., Śledzińska B., Klawiter J.: Studies on the Optimization of Parameters of Preparative Liquid Chromatographic Columns for Production of Cardiac Glycosides, *J. Chromatogr.* 367, (1986) 45-58.
5. Kamiński M.: Problemy stosowania kolumnowej chromatografii cieczowej jako techniki otrzymywania substancji. Praca habilitacyjna, Politechnika Gdańska, Gdańsk, (1981).
6. Kamiński M., Reusch J.F.: Preparative HPLC Under Infinite Diameter Conditions, *Preparative Chromatography*, 1, (1991), 367-402.
7. Śledzińska B., Kamiński M., Klawiter J., Majer Z., Klauze M.: Patent PRL nr 135 728 i patent dodatkowy nr 137, 576, p.t., Sposób otrzymywania lanatozydów A, B i C z ich mieszanin, zgł. (1982).
8. Makowiecka A., Kaczorek P., Złamański T., Bylina A.: Online simulation for preparative liquid chromatography using the Craig algorithm with Langmuir competitive isotherm. *ABiD*, 5-19, (2008).
9. <http://plc.uksw.edu.pl> Symulacja komputerowa preparatywnej chromatografii.
10. Katti A.M. and Jagland P., Development and optimization of industrial scale chromatography for use in manufacturing; *ANALYSIS MAG.* 26, M38-45, (1998).
11. Kazimierzczuk Z. and Kamiński J.: Patent PL No 194162 B1, (1999).
12. Wiley P.F., Gerzon K., Flynn E.H., Sigal M.V., Weaver O., Quarck U.C., Chauvette R.R., Monahan R.: Erythromycin. X. Structure of erythromycin. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6062-70, (1957).
13. Kibwage I.O., Busson R., Janssen G., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H., Bracke J.: Translactonization in erythromycins. *J. Org. Chem.* 52, 990-6, (1987).
14. Gwóźdź E., Holska W. i Kulińska A.: Application of highly alkaline pH in erythromycin separation by high performance liquid chromatography; *Chem. Anal. (Warsaw)*, 36, 219, (1991).
15. Brzozowski S.: Klatraty jako sorbenty chromatograficzne. *Rocz. Chem.* 47, 617, (1973).
16. Stephenson G.A., Stowell J.G., Pascal H.T., Pfeiffer R.R., Byrn S.R.: Solid-state investigations of erythromycin A dihydrate: structure, NMR spectroscopy, and hygroscopicity. *J. Pharm. Sci.*; 86: 1239-1244, (1997).
17. Mirza S., Miroshnyk I., Heinämäki J., Christiansen L., Karjalainen M., Yliruusi J.: Influence of Solvents on the Variety of Crystalline Forms of Erythromycin. *AAPS Pharm. Sci.* (2), 5, (2003).