

## ПРЕПАРАТИВНАЯ ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ\*



Л.Д. Аснин,  
кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник,  
Институт технической химии  
УрО РАН



А.А. Горбунов,  
кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник,  
Институт технической химии  
УрО РАН

Рассматриваются теоретические и прикладные аспекты применения метода хроматографии для получения индивидуальных оптических изомеров. Особое внимание уделено применению хроматографических технологий в фармацевтических исследованиях и производстве лекарственных веществ.

### ВВЕДЕНИЕ

Начало исследованию хиральных молекул положил физик Жан-Батист Био, в 1815 году обнаруживший способность терпентинного масла вращать плоскость поляризации проходящего через него поляризованного света. Подобные вещества названы были оптически активными, а само явление – оптической активностью. Значительный вклад в его понимание внес Луи Пастер, показавший в 1848 году, что оптически неактивная виноградная кислота состоит из равных количеств двух кислот, одна из которых вращает поляризованный свет вправо, а другая – влево. Первая оказалась хорошо известной Пастеру винной кислотой, а вторая – еще неизвестным соединением, которое по своим химическим и физическим свойствам (за исключением знака вращения поляризованного света и формы кристаллов) совпадало с винной кислотой. Так было открыто явление оптической изомерии. Позже было установле-

но, что оптические изомеры, или энантиомеры, отличаются друг от друга пространственным строением, а именно: их молекулы представляют собой несовместимые при наложении зеркальные изображения друг друга (рис. 1). Такие молекулы были названы *хиральными*. Слово происходит от греческого «хейр» – рука и символизирует подобие симметрии оптических изомеров и симметрии правой и левой рук. Хиральность молекулы обусловлена наличием в ней *элемента хиральности*. Чаще всего это *асимметрический* или *хиральный атом*, обычно – атом углерода, связанный с четырьмя разными заместителями. Существуют молекулы с *осью хиральности* и *плоскостью хиральности*.

Учитывая отношение оптических изомеров к плоскополяризованному свету, для их обозначения используют символы (+), что значит правовращающий, и (–) – левовращающий. Другой способ различе-

\* Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (07-03-91106-АФГИР-а) и CRDF (RUC2-2873-PE-07), а также гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых (МК-3723.2008.3).

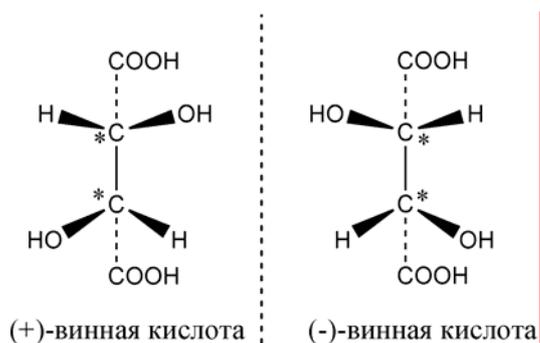


Рис. 1. Оптической изомерия. В качестве примера приведена общая формула аминокислоты. Атом углерода в центре тетраэдра – хиральный. Симметрия оптических изомеров подобна симметрии правой и левой руки – они являются зеркальным отражением друг друга, но не совмещаются при наложении

ния и наименования – применение символов *D* и *L* – связан с отнесением данного соединения к ряду *D*- или *L*-глицеринового альдегида, т.е. к его право- или лево-вращающей форме<sup>1</sup>.

Важнейшие строительные блоки живого вещества – α-аминокислоты (кроме глицина) и моносахариды – являются хиральными соединениями. Удивительно, но жизнь, как мы ее знаем, может быть построена только из *L*-аминокислот и *D*-

оптических изомеров на человеческий организм может быть различным. Первые очевидные доказательства были найдены в области косметической химии. Парфюмеры заметили, что запахи оптических изомеров могут существенно отличаться (табл. 1). С развитием химии синтетических лекарственных препаратов стали накапливаться свидетельства различного физиологического действия энантиомеров (табл. 2). Трагический опыт связан с талидомидом – хиральным соединением, применявшимся в середине 1950-х в качестве успокоительного средства для беременных женщин. Его синтезировали и применяли в виде рацемической смеси, т.е. эквимолярной смеси оптических изомеров. Через несколько лет активного использования было обнаружено, что талидомид вызывает повышенный риск врожденных уродств. Этот побочный эффект связали с (–)-талидомидом, тогда как (+)-энантиомер не обладал подобным действием [1].

В 1992 году Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and Drug Administration) приняло положение [2], согласно которому энантиомеры рассматриваются как индивидуальные

Таблица 1

Запахи оптических изомеров душистых веществ		
Вещество	(–)-изомер	(+)-изомер
Карвеол	Мятный	Плесневый
Транс-эпоксикарвон	Слабый тминный	Слабый цветочный
Лимонен	Резкий хвойный	Острый цитрусовый
1-(пара-мент-3'-ил)этанол	Без запаха	Цитрусовый

сахаров. Осознание этого факта, на которое ушли многие десятилетия, привело исследователей к выводу, что действие

химические вещества, их фармакологическая и токсикологическая активности должны проверяться для каждого энан-

Таблица 2

Свойства различных энантиомерных форм лекарственных веществ		
Вещество	Функция	
	<i>L</i> -форма	<i>D</i> -форма
Соталол	β-блокатор	Антиаритмическое средство
Пропранолол	β-блокатор	Нет
Напроксен	4 % противовоспалительной активности	100 % противовоспалительной активности
Левамизол	Иммуномодулятор	Вызывает рвоту
Карнитин	Витамин	Вызывает симптомы злокачественной миастении

<sup>1</sup> *D* и *L* – первые буквы латинских слов *dexter* и *laevus* (правый и левый). Принадлежность к ряду означает практическую или теоретическую возможность синтеза соединения из *D*- или *L*-глицеринового альдегида, синтеза, не меняющего конфигурацию исходного хирального центра альдегида.

тиомера отдельно. При существенном различии в активности в лекарственной форме должен использоваться энантиомер, показывающий больший терапевтический эффект. Данная позиция FDA привела к перестройке фармацевтической промышленности на выпуск энантиомерно чистых веществ, причем не только в североамериканских государствах (США, Канада), но и в странах Европы. По дан-

ным на 1997 года из 500 наиболее продаваемых лекарственных средств 269 представляли собой индивидуальные энантиомеры [3]. В 2002 году объем мировых продаж лекарственных препаратов на основе индивидуальных энантиомеров превысил 159 млрд долл., ежегодный рост доходов в этой области составляет 11 % [4].

## ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Потребность в энантиомерно чистых веществах стимулировала развитие методов разделения и анализа смесей энантиомеров. Известны несколько способов разделения оптических изомеров. Исторически первый метод – прямая кристаллизация. Возможно выделение чистых энантиомеров с использованием мембранных и биохимических технологий. Особое место среди методов разделения занимает хроматография благодаря возможности получения особо чистых энантиомеров в одну стадию [5].

Поскольку различия в свойствах оптических изомеров проявляются только в хиральном окружении, для их хроматографического разделения необходимо применение вспомогательного хирального агента, который бы образовывал с разделяемыми изомерами диастереомерные комплексы<sup>2</sup>. Такой хиральный агент мо-

жет быть иммобилизован на поверхности носителя или добавлен в подвижную фазу. В первом случае говорят о прямой хиральной хроматографии, во втором – о косвенной. Принцип действия хиральной хроматографии иллюстрируется на рис. 2.

Косвенный метод широко применялся до начала массового коммерческого производства хиральных адсорбентов в 1990-х годах. Такой подход до сих пор остается актуальным в капиллярном электрофорезе. Очевидным недостатком этого метода в препаративной практике является необходимость извлечения энантиомеров из диастереомерных комплексов после осуществления разделения. Поэтому препаративное разделение предпочитают выполнять прямым методом на так называемых хиральных неподвижных фазах (ХНФ).

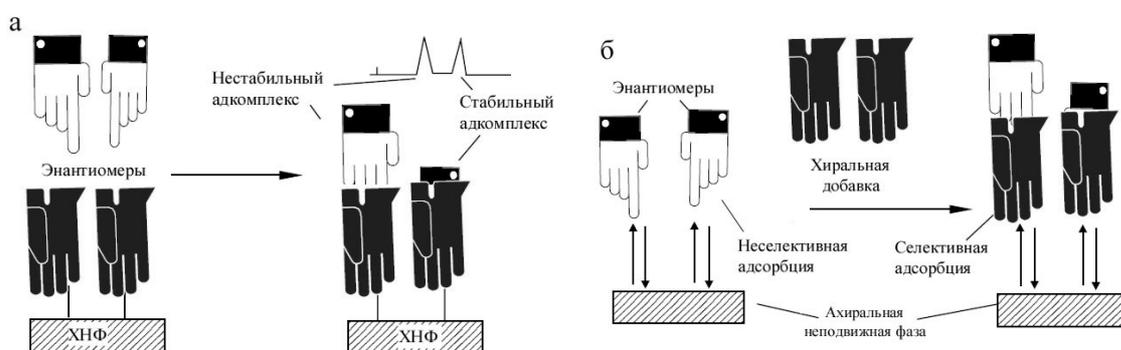


Рис. 2. Принцип действия прямой (а) и косвенной (б) хиральной хроматографии. В косвенном методе адсорбция осуществляется на нехиральной неподвижной фазе

<sup>2</sup> Диастереомеры – изомеры, имеющие два или более хиральных центра, которые отличаются пространственным строением, но не являются энантиомерами. Комплексы, образованные хиральной молекулой с парными энантиомерами, будут диастереомерами по отношению друг к другу.

## ХИРАЛЬНЫЕ НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ

### Полисахариды

Углеводы были первыми природными соединениями, введенными в хроматографическую практику для разделения энантиомеров: Гендерсон и Рул в 1938 году разделили *D*- и *L*-изомеры производного камфоры на *D*-лактозе [6], а в 1944 году Прелог и Виланд на этом же адсорбенте разделили изомеры оснований Трёгера [7]. Полисахариды в виде доступного в то время материала – целлюлозной бумаги – начали использовать несколько позже, в 1951 году [8]. Природные поли- и дисахариды не отличались высокой эффективностью, более перспективными ХНФ оказались производные полисахаридов. Окамото с сотрудниками в середине 1980-х годов продемонстрировал преимущества производных целлюлозы и амилозы для энантиоразделения широкого круга хиральных соединений [9]. Эти ХНФ были выпущены фирмой Daicel под торговыми марками Chiralcel (производные целлюлозы) и Chiralpak (производные амилозы) и сыграли огромную роль в развитии хиральной хроматографии [10]. Первые коммерческие адсорбенты получали механическим нанесением полисахаридов на силикагель. Такие ХНФ нельзя было использовать в водных растворителях, что значительно ограничивало сферу их применения. Позже появились адсорбен-

ты с химически привитой к силикагелю органической фазой. Франкotte рекомендует проводить термическую обработку или облучение ХНФ на основе нанесенных полисахаридов, что также повышает их устойчивость к действию полярных растворителей [5].

В самом общем виде эффект энантиораспознавания объясняется образованием хиральных полостей между перекрученными цепочками полисахаридов. Удержание зеркальных изомеров в этих полостях происходит с разной энергией благодаря действию стерических факторов.

### Циклодекстрины

Циклодекстрины (ЦД) – макроциклические олигосахариды природного происхождения, состоящие из остатков *D*-(+)-глюкопиранозы, соединенных 1,4-гликозидными связями. Благодаря тороидальной структуре (рис. 3) они способны к образованию комплексов включения. Поскольку макроцикл построен из хиральных фрагментов, внутренняя поверхность тора обладает соответствующими элементами асимметрии, следовательно, при взаимодействии с оптически активными веществами будет проявляться эффект энантиораспознавания.

Наиболее распространенные  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -ЦД состоят соответственно из 6, 7 и 8

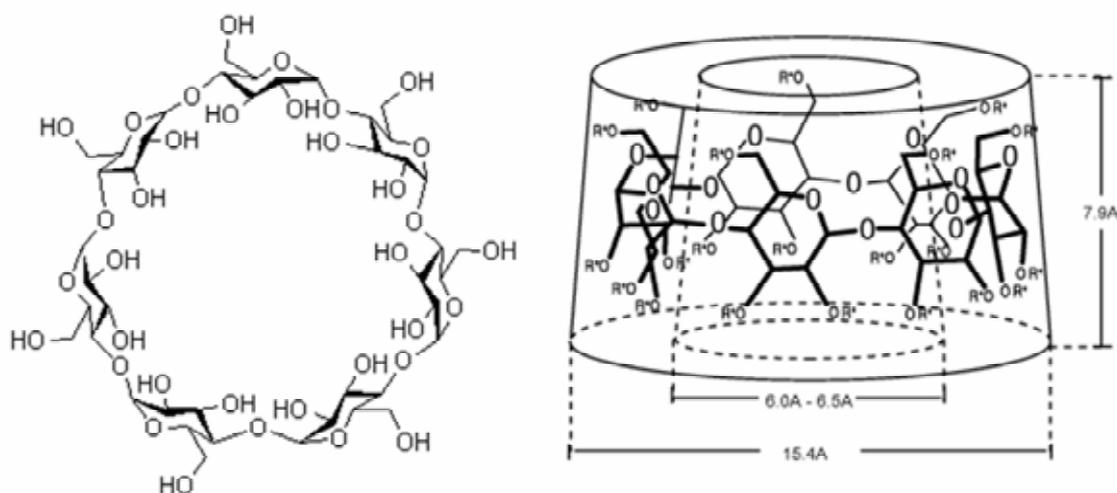


Рис. 3. Структура  $\beta$ -циклодекстрина: слева – структурная формула; справа – объемное изображение

элементарных звеньев. В хроматографии широкое применение нашли  $\beta$ - и  $\gamma$ -ЦД и их производные, в то время как  $\alpha$ -ЦД в литературе упоминаются эпизодически. ЦД водорастворимы, поэтому для использования в жидкостной хроматографии с водными элюентами их необходимо прививать к поверхности твердого носителя. Коммерчески доступны колонки для ВЭЖХ на основе ЦД различных производителей: YMC (YMC Chiral CD BR), ASTEC (Cyclobond), Macherey-Nagel (Nucleodex). В аналитической хроматографии накоплен большой опыт применения ЦД [10], в препаративной хроматографии они используются редко.

### Белки

Белки представляют собой естественные хиральные селекторы. Центром хирального распознавания служит активный (стереоселективный) домен, образованный третичной структурой белка. ХНФ с иммобилизованными белками используют как для изучения их взаимодействий с биологически активными веществами, так и в аналитических целях. В хроматографических адсорбентах применяют фермент целлобиогидролазу I и  $\alpha_1$ -кислотный гликопротеин (соответствующие колонки под названием CHIRAL-CBH и CHIRAL-AGP выпускаются шведской фирмой Chrom Tech), бычий альбумин (Resolvosil BSA-7, Macherey-Nagel, Германия) и яичный белок овомукоид. Они характеризуются высокой стереоспецифичностью по отношению к большому числу соединений, проявляющих физиологическую активность. С другой стороны, такие адсорбенты обладают невысокой грузочной емкостью, поскольку на одну молекулу белка приходится один центр хирального связывания. Еще одним недостатком протеиновых ХНФ является медленная кинетика энантиоселективной адсорбции, обуславливающая низкую эффективность разделения энантиомеров и образование хвостов у пиков. По этой причине указанные ХНФ не применяются в препаративной практике.

### Хиральные полимеры

Хиральные полимеры являются важным классом энантиоселективных адсорбентов. Их изготавливают путем полимеризации хиральных мономеров. Для повышения технологических характеристик и снижения стоимости полученный полимер наносят на поверхность твердого носителя. Предложена технология, в которой процесс полимеризации протекает на поверхности силикагеля [11].

Адсорбенты Kromasil CHI-TBV и Kromasil CHI-DMB (Eka Chemicals AB, Швеция) – наиболее успешные представители этого класса ХНФ, специально созданные для разделения кислотных рацематов. Хиральной фазой в них служат сетчатые полимеры на основе производных полидиаллилдиамида *L*-винной кислоты, ковалентно привитые к поверхности силикагеля; материалы с маркировкой TBV и DMB отличаются природой заместителя молекулы мономера. Их применяли для разделения энантиомеров анастетика бупивакаина [12] и напроксена [13], выполнены работы по препаративному разделению рацематов ибупрофена [14] и мефенитоина [15].

Другим примером хиральных полимеров служит поли(*N*-акрилоил-(*S*)-фенилаланина этиловый эфир), разработанный для расщепления рацематов фармацевтических препаратов, содержащих амидную группу, и выпускаемый компанией Merck (Германия) под названием Chiraspher NT.

### Лигандообменные адсорбенты

Данный тип адсорбентов был предложен в 1968 году Даванковым и Рогожиным [16] для расщепления рацематов  $\alpha$ -аминокислот. Они представляют собой катионообменную смолу, функциональные группы которой содержат асимметрический центр и способны образовывать координационную связь с ионами переходных металлов. Закрепленный таким образом ион металла способен захватывать лиганды из подвижной фазы. Эффект энантиораспознавания достигается за счет того, что константы образования

комплексов с оптическими антиподами различны.

Первым сорбентом такого рода был сшитый полистирол с привитой аминокислотой *L*-пролином. Смолу подготавливали к разделению оптических изомеров аминокислот, обрабатывая раствором сульфата меди в водном аммиаке [16]. В настоящее время подобные колонки выпускает фирма Regis Technologis (США) под названием «колонки Даванкова».

*Неподвижные фазы с привитыми низкомолекулярными селекторами*

В эту группу входят ХНФ, состоящие из твердого носителя (силикагеля) и привитых к его поверхности молекул, обладающих одним или несколькими асимметрическими центрами. Такие адсорбенты часто называют фазами «щеточного» типа, так как привитые молекулы выставлены в подвижную фазу наподобие волосков щетки. Различают несколько типов таких ХНФ. В подгруппу так называемых фаз Пиркла объединяют адсорбенты с хиральными селекторами, отличающимися способностью к  $\pi$ -донорным или (*и*)  $\pi$ -акцепторным взаимодействиям

[17]. Примером  $\pi$ -акцепторных хиральных селекторов служат 3,5-динитробензоилпроизводные аминокислот, ставшие основой для целой серии коммерческих ХНФ; на рис. 4, *а* показано производное фенилглицина. ХНФ, проявляющие  $\pi$ -донорные свойства, получают, например, на основе *N*-арилпроизводных аминокислот (рис. 4, *б*) [17]. Возможно сочетание в одном селекторе  $\pi$ -донорных и  $\pi$ -акцепторных заместителей (рис. 4, *в*). Фазы Пиркла успешно используются в анализе различных веществ медицинского назначения ( $\beta$ -блокаторов и нестероидных противовоспалительных препаратов) [15, 17]. Механизмы взаимодействия оптически активных соединений с этими адсорбентами подробно обсуждаются в [18].

В качестве хиральных селекторов могут быть использованы макроциклические гликопептидные антибиотики [19]. Благодаря наличию в структуре антибиотиков функциональных групп различной природы – ионогенных основных и кислотных групп, ароматических фрагментов, неионогенных протондонорных и протонакцепторных центров – такие селекторы способны к одновременному образованию нескольких типов связей с се-

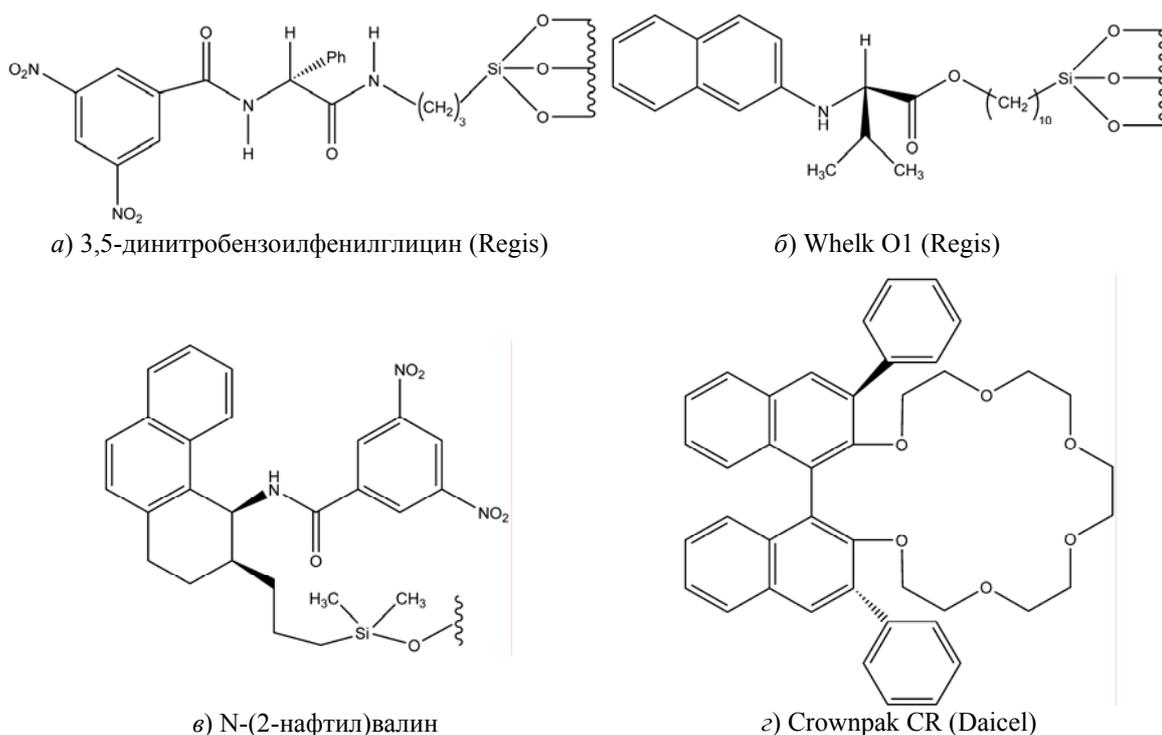


Рис. 4. Структурные формулы низкомолекулярных хиральных селекторов. (в скобках указан производитель)

лектантом, что и объясняет их высокую энантиоселективность по отношению к различным классам хиральных соединений. В настоящее время хроматографические колонки с привитыми антибиотиками выпускают компании ASTEC (США) под маркой Chirobiotic (доступны ХНФ с тейкопланином, ристоцетином и ванкомицином) и Биохиммак (Москва) под марками Диасфер-Chirasel-E, -V или -R (с эремомицином, ванкомицином и ристоцетином соответственно).

В отдельную подгруппу выделяют ХНФ с привитыми хининовыми алкалоидами и их производными. Первоначально эти неподвижные фазы были предложены итальянскими исследователями [20], интерес к ним возрос после того, как Линднер с сотрудниками разработали хиральные селекторы на основе карбаматов хи-

нина и хинидина [21, 22]. Такие ХНФ показывают исключительно высокую энантиоселективность по отношению к N-3,5-динитробензоилпроизводным аминокислот, однако практической значимости этот класс соединений не имеет. Способность хининовых адсорбентов к разделению энантиомеров других групп хиральных веществ (арилалкилкарбинолов, бинафтолов, арилкарбоновых кислот) мала [21, 22].

В качестве хиральных селекторов можно использовать асимметрические производные краун-эфиров. Механизм энантиоразделения в этом случае связан с образованием диастереомерных комплексов включения. Примером коммерческой колонки такого типа является Crownpak CR фирмы Daicel (рис. 4, з).

## ТЕОРИЯ ЭНАНТИОСЕЛЕКТИВНОЙ АДСОРБЦИИ

### *Механизм хирального распознавания*

Природа хирального распознавания до сих пор является предметом дискуссий. Базисный подход заключается в правиле трехточечного взаимодействия, которое утверждает, что хиральное распознавание возможно, если селектанд и селектор взаимодействуют не менее чем тремя точками [16]. Правило сформулировано на основании геометрических соображений, согласно которым простейшей фигурой, нетождественной своему зеркальному отражению, является треугольник с неравноценными вершинами (например, помеченными разными буквами). Такое свойство отсутствует у точки или отрезка, поэтому одноточечного и двухточечного взаимодействий недостаточно для энантиоселективного «узнавания». Впервые эта идея в несколько иных терминах была высказана Иссоном и Стэдманом в 1933 году [23]. Далглиш применил эту концепцию для объяснения энантиоселективной адсорбции ароматических аминокислот на целлюлозе [24]. Из его рассуждений применительно к данному частному случаю следовал вывод о том, что для реализации энантиоселективного

взаимодействия адсорбируемая молекула должна обладать тремя различными функциональными группами, образующими связи с тремя пространственно разделенными точками на поверхности адсорбента. Пиркл и Почапски дали более расширительное толкование правила «трех точек»: для хирального распознавания необходимо минимум три одновременных взаимодействия между ХНФ и одним из энантиомеров, при этом как минимум одно из взаимодействий должно быть стереохимически зависимым [18]. Авторы особо подчеркивали недопустимость механистического толкования термина «взаимодействие» как связи между двумя точками. Действительно, такие сложные виды взаимодействий, как диполь-дипольное, или  $\pi$ - $\pi$  взаимодействие, являются многоточечными по природе, но рассматриваются как одна связь.

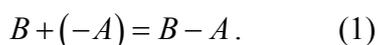
Эти представления, в течение долгого времени принимавшиеся как постулаты, активно обсуждались в последние два десятилетия. Так, было отмечено, что в адсорбционных процессах фактор поверхности редуцирует систему от трехмерной в двухмерную, и тогда процессов двухточечного взаимодействия достаточно для

дискриминации между энантиомерами [25]. Топиоль и Сабио опубликовали дискуссионную статью, в которой, пользуясь сложными геометрическими аналогиями, доказывали необходимость четырехточечного взаимодействия для хирального распознавания [26]. Их взгляды пока не нашли признания и в работах других авторов не упоминаются.

*Макроскопический механизм адсорбции на хиральной неподвижной фазе*

Описание процесса адсорбции, в котором не раскрывают механизм взаимодействия адсорбата с поверхностью твердого тела на молекулярном уровне, называют макроскопическим. В этом случае «элементарной единицей» поверхности выступает адсорбционный центр, структура которого не уточняется. Такой подход удобен в инженерных расчетах, кроме того, он позволяет получать важную информацию о строении поверхности, например, о концентрации и энергии адсорбционных центров. Широко используется он и при изучении хиральных адсорбентов.

Применение макроскопического метода заключается в измерении изотермы адсорбции – зависимости количества адсорбированного вещества от его концентрации в жидкой фазе в состоянии равновесия – и анализе полученной информации с привлечением модельных представлений. Простейшая модель адсорбции разработана Лэнгмюром и рассматривает поверхность как совокупность одинаковых адсорбционных центров; взаимодействием между молекулами адсорбата как на поверхности адсорбента, так и в объеме жидкой фазы пренебрегается. Такой процесс адсорбции можно представить как обратимую химическую реакцию между адсорбционным центром  $A$  и молекулой  $B$ :



Тогда уравнение изотермы адсорбции запишется следующим образом:

$$q = \frac{q^* b C}{1 + b C}, \quad (2)$$

где  $q$  и  $C$  – концентрация адсорбата на

поверхности и в объеме жидкой фазы соответственно;  $q^*$  – концентрация адсорбционных центров;  $b$  – коэффициент адсорбционного равновесия.

Модель Лэнгмюра может быть усовершенствована: введено представление о статистическом распределении энергии адсорбционных центров относительно некоторого среднего значения. Эти изменения предполагают, что природа центров адсорбции одинакова, но вследствие случайных дефектов в структуре поверхности энергии центров несколько отличаются. Важно, что при этом уравнение изотермы адсорбции остается одночленным и асимптотически стремится к некоторому значению предельной адсорбции. Такие уравнения называют изотермами лэнгмюровского типа. Изучение энантиоселективной адсорбции обнаружило, что подобные выражения не всегда удовлетворительно описывают адсорбционное равновесие в хиральных системах [27, 28]. Для объяснения этого факта было высказано предположение о наличии на поверхности ХНФ адсорбционных центров двух типов: энантиоселективных и неселективных [29]. Первые характеризуются разным сродством по отношению к оптическим антиподам, вторые с одинаковой энергией взаимодействуют с обоими энантиомерами. Адсорбцию на такой поверхности описывают с помощью уравнения, состоящего из двух термов:

$$q = q_s^* T_{s,i} (b_{s,i}, v_{s,i}, C) + q_{ns}^* T_{ns,i} (b_{ns,i}, v_{ns,i}, C). \quad (3)$$

Здесь параметр  $v$  обозначает фактор гетерогенности, который характеризует ширину распределения данной группы адсорбционных центров по энергиям. Первый терм в выражении (3) описывает адсорбцию энантиомеров (обозначены индексом  $i$ ) на селективных центрах. В этом случае  $T_{s,1} \neq T_{s,2}$ , соответственно коэффициенты адсорбции и (или) факторы гетерогенности для энантиомеров различаются. Второй терм характеризует неселективную адсорбцию, для которой  $b_{ns,1} = b_{ns,2} = b_{ns}$  и  $v_{ns,1} = v_{ns,2} = v_{ns}$ , следовательно  $T_{s,1} = T_{s,2}$ . Простейшим уравне-

нием такого типа является изотерма би-Лэнгмюра:

$$q = \frac{q_s^* b_{s,i} C}{1 + b_{s,i} C} + \frac{q_{ns}^* b_{ns} C}{1 + b_{ns} C} \quad (4)$$

С помощью уравнения (4) была исследована адсорбция некоторых энантиомерных пар на различных ХНФ. Как видно из табл. 3, концентрация неселективных адсорбционных центров всегда превышает концентрацию энантиоселективных центров. Ранее считалось, что неселективная адсорбция осуществляется на ахиральных структурах поверхности: незкранированных участках поверхности силикагеля, ахиральных фрагментах привитых молекул. Однако в последнее время получены доказательства того, что в качестве неселективных центров могут выступать хиральные селекторы [30, 31]. Именно этим обстоятельством объясняется низкая доля селективных центров в общей адсорбционной емкости ХНФ щеточного типа. Потеря энантиоселективности может быть связана с блокированием хирального центра молекулами растворителя или конформационными изменениями в структуре селектора. В этой связи интересна работа Линднера с сотрудниками. Изучая структуру карбамоилированного цинхонидина, они установили, что его молекулы находятся в растворе в различных конформациях и только некоторые кон-

формеры демонстрируют стереоспецифичность по отношению к тестовым веществам [32].

С низкомолекулярными селекторами может взаимодействовать более одной молекулы селектанда, о чем свидетельствуют высокие значения общей сорбционной емкости таких ХНФ по отношению к некоторым адсорбатам. Концентрация привитых частиц составляет величину порядка 600 ммоль/л. Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что адсорбция миндальной кислоты на ХНФ с привитым тейкопланином отвечает стехиометрии 3:1, а адсорбция 3-хлоро-1-фенилпропанола на хинидин-карбаматной ХНФ соответствует стехиометрии 2:1. Скорее всего, сверхстехиометрическое поглощение связано с неселективными взаимодействиями, однако однозначных доказательств этого нет.

Как правило, энантиоселективные центры характеризуются более высокой энергией адсорбции, чем неселективные. Обычно это объясняют участием в энантиоселективной адсорбции сильных специфических взаимодействий (донорно-акцепторных, диполь-дипольных, ион-ионных, образованием водородной связи). При этом полагают, что неселективная адсорбция осуществляется за счет слабого межмолекулярного взаимодействия (дисперсионного и электроиндукционно-

Таблица 3

Характеристики селективной и неселективной адсорбционной емкости хиральных неподвижных фаз

ХНФ	Вещество	$q_s$ , ммоль/л	$q_{ns}$ , ммоль/л	Ссылка
<i>Протеины:</i>				
CHIRAL-AGP	2-фенилбутановая кислота	3,8	29,4	[46]
CHIRAL-AGP	Метилвый эфир миндальной кислоты	2,1	12,6	[46]
CHIRAL-CВН I	Пропранолол	0,9	22,3	[47]
<i>Фазы щеточного типа:</i>				
Хинидин-карбамат	3-хлоро-1-фенилпропанол	122	1339	[30]
Хинидин-карбамат	2,2,2-трифторо-1-(9-антрил)-этанол	12,8	323	[31]
Chirobiotic T (тейкопланин)	Фенилглицин	28	110	[48]
Chirobiotic T	Триптофан	12	338	[48]
Chirobiotic T	Миндальная кислота (рН 4.0)	180	1720	[48]
Chirobiotic T	Миндальная кислота (рН 6.6)	48	1100	[48]
Diaspher-Chirasel-E (эре-момицин)	Метионин	2,1	94,0	[49]
<i>Полимеры:</i>				
Kromasil CHI-TBB	2-фенилбутановая кислота	125	450	[50]
<i>Полисахариды:</i>				
Chiralcel OJ	Метилвый эфир миндальной кислоты	25,4	549	[28]
Chiralcel OJ	Кетопрофен	85,3	598	[51]
Chiralcel OB	1-фенил-1-пропанол	3,7	392	[52]

го) или за счет образования единичных водородных связей [33]. В действительности доказательств последнего утверждения нет. Природа неселективного взаимодействия в хиральных системах специально не изучалась. Очевидно, что в неселективном связывании полярного вещества на полярной неподвижной фазе могут участвовать специфические взаимодействия. Однако они будут взаимно некоординированными и, возможно, число точек соприкосновения с поверхностью (селектором) будет меньше, чем при энантиоселективной адсорбции.

Существует еще один аспект проблемы, на который раньше не обращали внимания. Вывод о слабой неселективной связи делается на основании меньших значений коэффициентов  $b_{ns}$ . Однако в жидкостной хроматографии адсорбционный коэффициент определяется разностью парциальных энергий Гиббса адсорбата и растворителя. Поэтому нельзя исключать, что различие между энантиоселективной и неселективной адсорбцией связано с участием в процессе растворителя.

Концентрация энантиоселективных центров  $q_s$  и отношение  $(q_s b_s)/(q_{ns} b_{ns})$

являются важнейшими для препаративного разделения характеристиками ХНФ. Они определяют селективность разделения и загрузочную емкость колонки. Для достижения максимальной разделяющей способности недостаточно высокой концентрации селективных центров необходимо подавить неселективную активность адсорбента, т.е. стремиться к увеличению отношения  $(q_s b_s)/(q_{ns} b_{ns})$ . Как следует из приведенного обсуждения, для данной ХНФ указанные величины зависят от природы адсорбата и от состава элюента. Также они могут изменяться как функции температуры [33].

Данные табл. 3 показывают, что высокую загрузочную емкость обеспечивают ХНФ на основе полисахаридов и хиральных полимеров. В отдельных случаях высокое значение  $q_s$  показывают адсорбенты с привитыми антибиотиками, но это скорее исключение. Обычно подобные фазы характеризуют как малоемкие [5]. Наименьшей загрузочной емкостью обладают адсорбенты с привитыми протеинами. Выше уже отмечалось, что такие ХНФ не используют в препаративных целях.

## ПРЕПАРАТИВНАЯ ХИРАЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

### *Способы организации хроматографического процесса*

Прежде чем мы приступим к обсуждению конкретных приложений метода хроматографии, рассмотрим кратко способы реализации хроматографического разделения. Классическим и широко используемым в лабораторной практике приемом является элюентная колоночная хроматография. В этом методе разделяемую смесь помещают на вход в колонку, заполненную адсорбентом, после чего колонку промывают подходящим растворителем. На выходе из колонки собирают разделенные компоненты смеси. Метод отличается простотой технического оформления и легко автоматизируется. Его существенными недостатками, свя-

занными с периодическим характером процесса, являются невысокая производительность и большой расход подвижной фазы. С другой стороны, когда необходимо получить небольшие количества вещества, порядка нескольких миллиграммов, производительность и вопросы экономии не играют существенной роли и элюентная хроматография остается наиболее популярной препаративной техникой.

Повысить производительность при одновременном сокращении расхода элюента позволяет циркуляционная схема, когда часть элюата направляют из выхода колонки назад, на вход. Впечатляющей иллюстрацией возможностей циркуляционной техники стало разделение интермедиатов синтеза витамина  $B_{12}$  – одного из

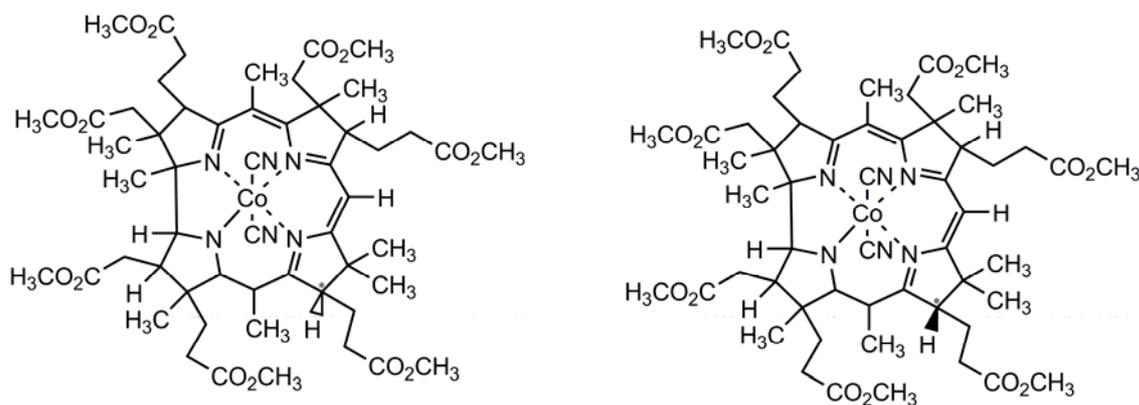


Рис. 5. Структурные формулы эимеров метилового эфира кобириновой кислоты. Структуры отличаются конфигурацией атома С в положении 13 (отмечено звездочкой)

сложнейших опытов в истории органической химии. На одной из стадий синтеза было необходимо отделить промежуточный эфир кобириновой кислоты (рис. 5) от его эимерного аналога. Жидкостная хроматография с рециклом позволила разделить два эимера в результате 7 проходов через трехметровую колонку, что эквивалентно одному проходу через колонку длиной 21 м [34].

Следующим шагом в повышении производительности препаративной хроматографии стала разработка способа непрерывного разделения, получившего название SMB-хроматографии (от английского термина *simulated moving bed* – имитированный движущийся слой). Подробное

обсуждение теории и практики техники SMB выходит за рамки данного обзора и содержится в [35, 36]. SMB-система (рис. 6) состоит из 4 соединенных в цикл секций, а каждая секция – из одной или нескольких одинаковых хроматографических колонок; между секциями находятся клапаны переключения потоков. Периодически и синхронно перемещая точки ввода и вывода на одну секцию в направлении потока подвижной фазы, клапаны имитируют движение слоя адсорбента навстречу потоку жидкости и обеспечивают непрерывный режим работы.

В SMB-методе исходная смесь разделяется на две фракции, так называемые рафинат и экстракт, что соответствует задаче разделения рацемата на два индивидуальных энантиомера. С другой стороны, это накладывает требование отсутствия других примесей в смеси; поступающее в SMB-установку сырье должно быть предварительно очищено. По этой же причине используемые в SMB-методе растворители не должны содержать примесей, которые не могут быть отделены от целевого продукта вместе с растворителем.

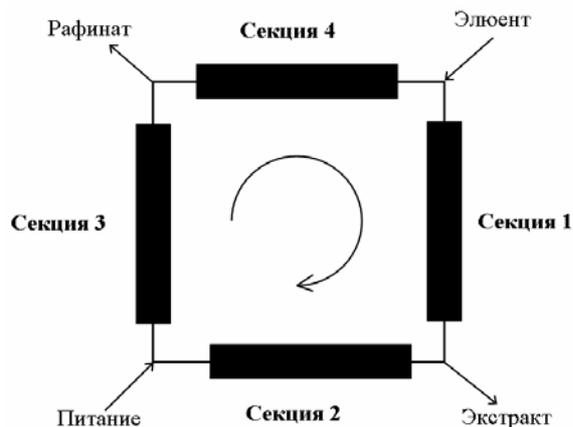


Рис. 6. Принципиальная схема SMB-установки. Круглой стрелкой показано направление потока подвижной фазы и переключения портов ввода и вывода. Порт «питание» служит для подвода разделяемой смеси, порт «элюент» – для подвода чистой подвижной фазы, порты «экстракт» и «рафинат» – для отбора сильнее сорбируемого и слабее сорбируемого компонента соответственно

#### Применение хиральной хроматографии в фармацевтической промышленности

В процессе разработки нового лекарственного препарата различают несколько этапов. Их формальное разбиение отличается в отечественной и зарубежной литературе. Для описания места хроматографических методов в этом процессе

удобно выделить четыре стадии: поисковую стадию, стадию доклинических испытаний, клинических испытаний и производства. На каждом из этих этапов предъявляются свои требования к количеству нарабатываемого материала, времени разработки методики выделения целевого вещества и его стоимости (табл. 4) [5].

На поисковой стадии на основании скрининговых исследований определяется, обладает ли новое вещество биологической активностью, и принимается решение о целесообразности его дальнейшего исследования. На этой стадии используют рацемат.

На этапе доклинических испытаний требуются оба энантиомера, поскольку их биологическая активность проверяется отдельно. Необходимы небольшие количества, которые можно получить в лабораторных условиях. Важно получить вещества в короткие сроки, при этом возможность дальнейшего масштабирования методики не рассматривается. По скорости разработки методики и простоте исполнения хроматография не имеет альтернатив среди других методов получения чистых энантиомеров [5]. Лабораторной препаративной хроматографии посвящено несколько обстоятельных обзоров [5, 15, 37]. Из недавних исследований, не вошедших в обзоры, следует отметить выделение оптически активных ингибитора протеазы ВИЧ [38] и противоопухолевого препарата группы имидазолина

[39].

На стадии клинических исследований (фаза III по терминологии FDA) изучается только энантиомер, показавший наиболее высокую фармацевтическую активность. Необходимое количество может достигать 100 кг. Такой объем образца получают на мелкотоннажных полупромышленных установках. Хотя вопрос стоимости не играет значительной роли, на этом этапе производители думают о расширении процесса до размеров крупнотоннажного производства, поэтому предпочитают использовать технологию, которую в дальнейшем будет проще масштабировать до промышленного размера. По этой причине относительно низкопроизводительная периодическая колоночная технология редко используется на этой стадии. В то же время SMB-методу уделяется все большее внимание. По производительности SMB-установки превышают обычную колоночную хроматографию на 30–530 % [35]; Нагаматсу с соавторами сообщали о 20-кратном превышении, достигнутом на установке Licoser 12-100 (Novasep, Франция) при разделении рацемической смеси эфира хинолин-мевалоновой кислоты [40]. Производительность в этом случае достигала 0,27 кг/(кг·день).

В промышленности основным критерием пригодности способа производства является стоимость, при условии, что технология позволяет получать целевой продукт в необходимом количестве с требуе-

Таблица 4

Требования к методике разделения энантиомеров [5]

Параметры	Стадия			
	Поисковая	Доклинические испытания	Клинические испытания и создание технологии	Производственная
Требуемое количество	1 мг – 50 г	100 г – 10 кг	5–100 кг	Тонны
Необходимый изомер	Оба энантиомера	Оба энантиомера	Активный энантиомер	Активный энантиомер
Временные ограничения *	Дни	Недели	Месяцы	
Стоимость	Не важно	Не важно	Умеренно важно	Определяющая
Легкость масштабирования	Не важно	Умеренно важно	Важно	Обязательно

Примечание: \* – время, требуемое на разработку методики разделения.

мой чистотой. Цена хиральных адсорбентов высока (5000–20000 евро/кг) для того, чтобы их применение в классическом периодическом варианте хроматографии было оправдано в многотоннажном производстве. Однако с внедрением высокопроизводительных систем непрерывного действия удельная себестоимость продукции снижается, и в некоторых случаях применение (непрерывного) хроматографического метода может стать экономически целесообразным. Так, компания

UCB Pharma объявила о начале производства оптически активного леветирацетама (противоишемического средства) из рацемического этирацетама на полисахаридной ХНФ Chiralpak AD. Производительность установки составляет 12 т/год при чистоте целевого энантиомера 98,5 % [41]. Компания «Пфайзер» использует SMB-системы в производстве антидепрессанта цертралина (фирменное название – золофт), объем продаж которого составил 2,7 млрд долл. в 2002 году [4].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Препаративная хиральная хроматография за 30 лет своего активного развития прошла значительный путь от первых, слабоселективных, малоэффективных сорбентов, создаваемых в лабораторных условиях на основе интуиции или путем копирования природных образцов, до высокоселективных и эффективных коммерческих ХНФ, хиральные селекторы для которых разрабатываются с помощью методов молекулярного дизайна и комбинаторной химии; от обычных жидкостных хроматографов до сложных автоматизированных систем непрерывного разделения; от лабораторного метода до крупнотоннажных производств. Сегодня практически нет такого рацемата, который нельзя было бы расщепить прямым хроматографическим методом. Единственным сдерживающим фактором внедрения хроматографических технологий является стоимость.

Дальнейшее развитие препаративной

хиральной хроматографии, по-видимому, будет идти по пути развития методов управления и оптимизации систем непрерывного разделения и циркуляционных систем. Весьма многообещающи в этой области работы Морбиделли с соавторами [42, 43]. Заметен растущий интерес к сверхкритическим флюидным технологиям [44, 45], связанный с возможностью исключения из процесса органического растворителя. Очевиден экологический эффект такого подхода, однако пока не ясно, будут ли такие промышленные установки экономически целесообразны.

К сожалению, энантиомерное производство в нашей стране практически отсутствует. Авторы надеются, что настоящий обзор послужит привлечению интереса исследователей и производителей к этой важной и перспективной отрасли фармацевтической промышленности.

### Библиографический список

1. Eriksson T., Björkman S., Roth B., Fyge Å., Höglund P. // *Chirality*. – 1995. – Vol. 7. – P. 44–52.
2. FDA // *Chirality*. – 1992. – Vol. 4. – P. 338–340.
3. Stinson S.C. // *Chem. Eng. News*. – 1998. – Vol. 76. – № 38. – P. 83.
4. Rouhi A.M. // *Chem. Eng. News*. – 2003. – Vol. 81. – № 18. – P. 45–55.
5. Francotte E.R. // *J. Chromatogr. A*. – 2001. – Vol. 906. – P. 379–397.
6. Henderson G.M., Rule H.G. // *Nature*. – 1938. – Vol. 141. – P. 917–918.
7. Prelog V., Wieland P. // *Helv. Chim. Acta*. – 1944. – Vol. 27. – P. 1127–1134.
8. Kotake M., Sakan T., Nakamura N., Senoh S. // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1951. – Vol. 73. – P. 2973–2974.
9. Okamoto Y., Kawashima M., Hatada K. // *J. Chromatogr.* – 1986. – Vol. 363. – P. 173–186.
10. Ward T.J. // *Anal. Chem.* – 2006. – Vol. 78. – P. 3947–3956.
11. Gasparrini F., Misiti D., Rompietti R., Villani C. // *J. Chromatogr. A*. – 2005. – Vol. 1064. – P. 25–38.
12. Da Silva Jr I.J., De Veredas V., Souza Carpes M.J., Santana C.C. // *Adsorption*. – 2005. – Vol. 11. – P. 123–129.
13. Yang Y., Su B., Yan Q., Ren Q. // *J. Pharm. Biomed. Analysis*. – 2005. – Vol. 39. – P. 815–818.
14. Peper S., Lübbert M., Johannsen M., Brunner G. // *Sep. Sci. Technol.* – 2002. – Vol. 37. – P. 2545–2566.

15. *Andersson S., Allenmark S.G.* // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – Vol. 54. – P. 11–23.
16. *Даванков В.А.* Лигандообменная хроматография. / В.А. Даванков, Дж. Навратил, Х. Уолтон. – М.: Мир, 1989. – С. 97–249.
17. *Welch Ch.* // J. Chromatogr. A. – 1994. – Vol. 666. – P. 3–26.
18. *Pirkle W.H., Pochapski T.C.* // Chem. Rev. – 1989. – Vol. 89. – P. 347–362.
19. *Armstrong D.W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill Ch., Chen J.-R.* // Anal. Chem. – 1994. – Vol. 66. – P. 1473–1484.
20. *Rossini C., Bertucci C., Pini D., Altemura P., Salvadori P.* // Tetrahedron Lett. – 1985. – Vol. 26. – P. 3361–3364.
21. *Lämmerhofer M., Lindner W.* // J. Chromatogr. A. – 1996. – Vol. 741. – P. 33–48.
22. *Krawinkler K.H., Gavioli E., Maier N.M., Lindner W.* // Chromatographia. – 2003. – Vol. 57. – P. 555–563.
23. *Easson L.H., Stedman E.* // Biochem. J. – 1933. – Vol. 27. – P. 1257–1266.
24. *Dalgliesh C.E.* // J. Chem. Soc. – 1952. – P. 3940–3942.
25. *Davankov V.A.* // Chirality. – 1997. – Vol. 9. – P. 99–102.
26. *Topiol S., Sabio M.* // J. Am. Chem. Soc. – 1989. – Vol. 111. – P. 4109–4110.
27. *Jacobson S., Golshan-Shirazi S., Guiochon G.* // J. Am. Chem. Soc. – 1990. – Vol. 11. – P. 6492–6498.
28. *Charton F., Jacobson S., Guiochon G.* // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 630. – P. 21–35.
29. *Fornstedt T., Sajonz P., Guiochon G.* // Chirality. – 1998. – Vol. 10. – P. 375–381.
30. *Asnin L., Kaczmarek K., Felinger A., Gritti F., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1101. – P. 158–170.
31. *Götmär G., Asnin L., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 1059. – P. 43–52.
32. *Czerwenka Ch., Zhang M.M., Kählig H., Maier N.M., Lipkowitz K.B., Lindner W.* // J. Org. Chem. – 2003. – Vol. 68. – P. 8315–8327.
33. *Fornstedt T., Sajonz P., Guiochon G.* // J. Am. Chem. Soc. – 1997. – Vol. – 119. – P. 1254–1264.
34. *Макдональд П.* // Препаративная жидкостная хроматография; [под ред. Б. Бидлингеймера] М., 1990. – С. 9–130.
35. *Juza M., Mazzotti M., Morbidelli M.* // Trends Biotech. – 2000. – Vol. 18. – P. 108–118.
36. *Ванкат Ф.* // Препаративная жидкостная хроматография; [под ред. Б. Бидлингеймера] М., 1990. – С. 155–176.
37. *Zhang Y. Wu D.-R., Wang-Iverson D.B., Tymiak A.A.* // Drug Discovery Today. – 2005. – Vol.10. – № 8. – С. 571–577.
38. *Welch Ch.J., Fleitz F., Antia F., Yehl P., Waters R., Ikemoto N., Armstrong J.D., Mathre D.J.* // Organic Process Res. Develop. – 2004. – Vol. 8. – P. 186–191.
39. *Wang Z., Jonca M., Lambros T., Ferguson S., Goodnow R.* // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 45. – P. 720–729.
40. *Nagamatsu S., Murazumi K., Makino S.* // J. Chromatogr. A. – 1999. – Vol. 832. – P. 55–65.
41. *Hamende M., Cavoy E.* // Abstracts of the Symposium on Chirality: Impact on Drug Design and Development. – Braine-L'Alleud (Belgium), 1999.
42. *Amanullah M., Grossmann C., Mazzotti M., Morari M., Morbidelli M.* // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1165. – P. 100–108.
43. *Abel S., Erdem G., Amanullah M., Morari M., Mazzotti M., Morbidelli M.* // J. Chromatogr. A. – 2005. – Vol. 1092. P. 2–16.
44. *Zhang X., Towle M.H., Felice C.E., Flament J.H., Goetzinger W.K.* // J. Comb. Chem. – 2006. – Vol. 8. – P. 705–714.
45. *Yan T.Q., Orihuela C.* // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1156. – P. 220–227.
46. *Götmär G., Albareda N.R., Fornstedt T.* // Anal. Chem. – 2002. – Vol. 74. – P. 2950–2959.
47. *Fornstedt T., Zhong G., Bensetiti Z., Guiochon G.* // Anal. Chem. – 1996. – Vol. 68. – P. 2370–2378.
48. *Jandera P., Škavrada M., Klemmova K., Bačkovska V., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. – 2001. – Vol. 917. – P. 123–133.
49. *Petrusevska K., Kuznetsov M.A., Gedicke K., Meshko V., Staroverov S.M., Seidel-Morgenstern A.* // J. Sep. Sci. – 2006. – Vol. 29. – P. 1447 – 1457.
50. *Lindholm J., Fornstedt T.* // J. Chromatogr. A. – 2005. – Vol. 1095. – P. 50–59.
51. *Charton F., Bailly M., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. – 2004. – Vol. 687. – P. 13–31.
52. *Khatabi S., Cherrak D.E., Fischer J., Jandera P., Guiochon G.* // J. Chromatogr. A. – 2000. – Vol. 877. – P. 95–107.