

Препаративная ВЭЖХ и ЖХМС

Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и сочетание препаративной ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (ЖХМС) применяется на нескольких этапах разработки лекарственных препаратов.

Система для препаративной ВЭЖХ может использоваться для выделения целевых соединений с высокой степенью чистоты из жидких экстрактов, полученных в результате реакции синтеза или из природного вещества. Высокая степень чистоты выделяемых соединений обеспечивает возможность проведения их структурного анализа, который, в свою очередь, позволяет оценить и изучить различные функции таких соединений, гарантируя при этом большую надежность результатов.

Основная конфигурация системы для препаративной ЖХ (как и любой стандартной системы ЖХ) включает насосы для подачи растворителей, дозатор для ввода пробы, хроматографическую колонку и детектор. Также в препаративной системе дополнительно предусмотрен механизм сбора фракций (коллектор фракций), содержащих целевые соединения.

Ключ к успеху – эффективный отбор целевых соединений

В отличие от стандартных систем ЖХ, предназначенных для решения в основном аналитических задач, система для препаративной ЖХ используется в большей степени для так называемой «предварительной обработки» с целью выделения целевых соединений для их оценки и анализа, а также для последующей переработки. Таким образом, особую важность приобретают быстрота получения целевых соединений и высокая степень их чистоты. Для того чтобы максимально быстро приступить к проведению планируемого анализа и оценки после подготовительного процесса для достижения максимально возможной производительности, соответствующая система должна обеспечивать отделение определенного количества соединений и реализовывать



Рисунок 1: Система для препаративной ЖХ с автоматическим вводом образца и коллектором фракций

принцип детектирования, который позволил бы гарантировать отбор всех возможных целевых соединений с максимальной эффективностью.

Какой детектор является оптимальным?

Самые простые решения основаны на УФ детекторах (в идеале – с возможностью многоволнового детектирования или с диодной матрицей). Если целевые соединения или сопутствующие примеси

в растворе пробы не отличаются по своим оптическим свойствам, то для повышения эффективности очистки и, следовательно, повышения производительности в качестве дополнительных детекторов нужно применять детекторы с иным принципом работы, такие как детектор по светорассеиванию (ELSD) и масс-селективный детектор (МС).

Поскольку при использовании ELSD и МС-детекторов происходит необратимое разрушение пробы,

большая часть выходящего из хроматографической колонки элюата направляется в коллектор фракции, а оставшийся микрообъем поступает в ELSD или МС. Для этого применяется активный делитель потока. Кроме того, если объем подвижной фазы, который должен быть введен в детектор, очень мал, то для увеличения потока и поддержания стабильного детектирования при помощи ELSD или МС применяется отдельный подкачивающий насос.

Выбор оптимальной препаративной ВЭЖХ системы

Как только выполнен расчет объема фракции, необходимого для оценки и анализа целевых соединений и для их последующей обработки, и выбран детектор, наступает следующий этап, который предусматривает определение требуемого масштаба фракционирования. Для увеличения производительности также следует определить количество пробы, которое можно вводить за один раз (загрузка с учетом колонки). Когда известен максимальный объем вводимой пробы, можно рассчитать количество требуемых циклов фракционирования на основании желаемого количества целевой фракции. Полученные данные позволят выбрать оптимальную препаративную систему на основании времени (полного времени отбора целевой фракции) и цены (закупочной цены препаративной ВЭЖХ системы и препаративной хроматографической колонки, а также затрат на растворители). Такая оценка может быть эффективно выполнена при применении на первом этапе традиционной ВЭЖХ.

Если известна концентрация фракционируемого целевого соединения в пробе, то можно получить абсолютное значение вводимого объема фракционируемого целевого соединения на основании данной концентрации и объема вводимой пробы.

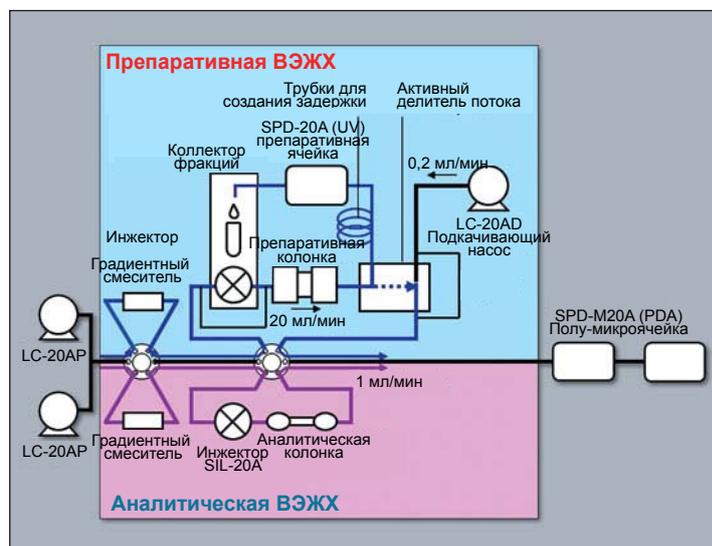


Рисунок 3: схема конфигурации препаративной ВЭЖХ системы с масс-селективным детектором

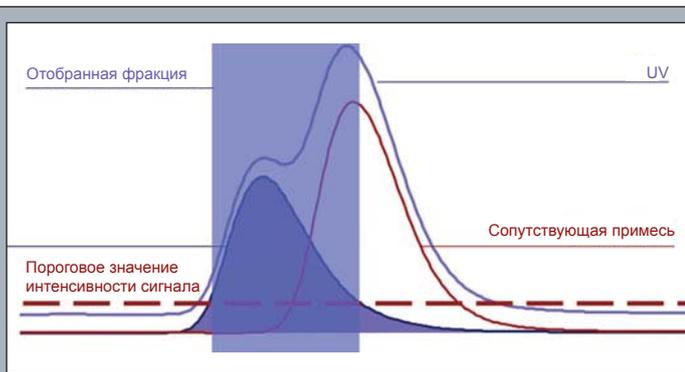


Рисунок 4: Фракция, инициируемая только МС

При использовании УФ-детектора для управления коллектором фракций изменение формы хроматографического пика свидетельствует о начале элюирования примеси, и детектор подает сигнал на смену емкости для сбора фракций. Таким образом, в предыдущей емкости содержится практически чистое целевое соединение, а последующей смесь целевого соединения и сопутствующей примеси.

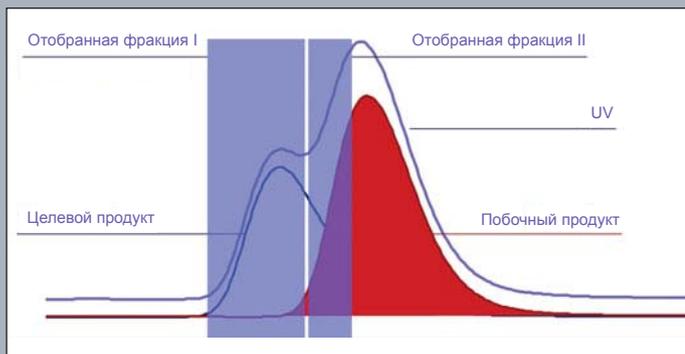


Рисунок 5: Фракция, инициируемая сочетанием УФ и МС сигнала

В случае использования только масс-селективного детектора настроенного на регистрацию единичного иона целевого соединения, отбор фракции инициируется при превышении порогового значения интенсивности сигнала данного иона, и при начале элюирования примеси смены емкости не происходит. В результате собранная фракция содержит как целевое соединение, так и примесь.

Таким образом, оптимальным представляется использование для управления коллектором фракций двух детекторов, при этом УФ-детектор управляет коллектором фракций, ориентируясь на форму хроматографического пика, а масс-селективный инициирует отбор соответствующей фракции по превышению заданной интенсивности порогового сигнала. Сочетание двух принципов управления коллектором фракций позволяет устранить проблему загрязнения целевого соединения другими соединениями имеющими близкое время элюирования и, таким образом, выделить целевое соединение даже из сложной смеси.

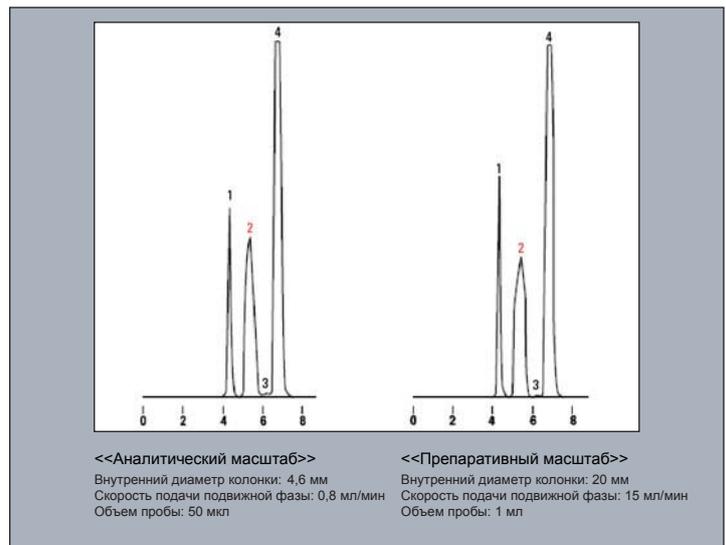


Рисунок 6: Пример увеличения масштаба

Коллектор фракций: для более эффективного использования препаративного ЖХ может быть подключен масс-селективный детектор. Комбинация сигналов от УФ и масс-детектора преобразуются по заданной программе в управляющие команды для коллектора фракций. Следующий пример (см. схему на стр.4) демонстрирует преимущество сочетания обоих сигналов.

Перенос условий анализа и разделения на препаративный масштаб

Этап, который следует за проверкой условий для колонки традиционных размеров, подразумевает переход от аналитического к препаративному масштабу. Для смягчения такого перехода препаративную колонку выбирают с тем же сорбентом, который применялся в аналитической колонке. При условии

тального материала требуется только увеличить скорость потока подвижной фазы и объем вводимой пробы в соответствии с отношением площадей поперечного сечения аналитической и препаративной колонки, чтобы получить почти такую же хроматографическую модель (см. таблицу 1).

На рисунке 6 показан пример, в котором увеличение масштаба произвели с тем же уплотнительным материалом. Здесь колонка с внутренним диаметром (ID) 4,6 мм, применяемая для аналитического масштаба, была заменена колонкой с ID 20 мм для препаративного масштаба. Поскольку площадь поперечного сечения у колонки с ID 20 мм приблизительно в 19 раз больше, чем у колонки с ID 4,6 мм, то скорость подачи растворителя была увеличена с 0,8 мл/мин до 15 мл/мин, при этом объем вводимой пробы был увеличен с 50 мкл до 1 мл..

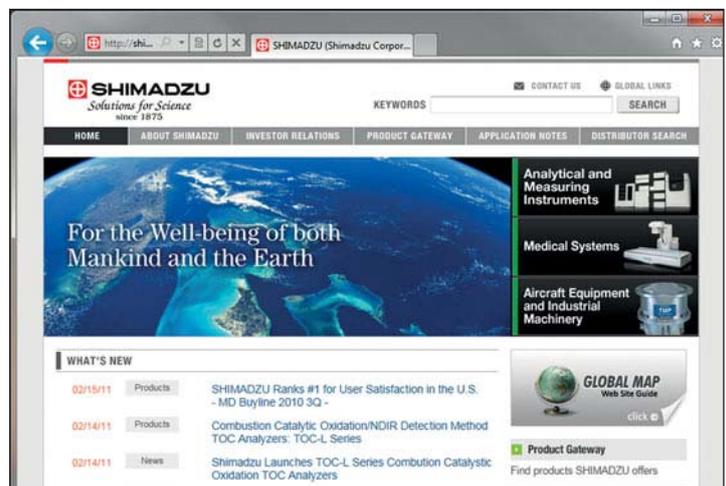


Рисунок 7: Интернет-сайт компании «Шимадзу» (Internet Explorer)

В результате были получены почти эквивалентные хроматограммы.

На данном этапе дальнейшая обработка фракционируемых соединений определяет следующие действия. Если не удалось достичь заданного уровня чистоты из-за недостаточного разделения, то следует пересмотреть объем вводимой пробы, длину колонки и др. То же относится и к условиям градиента.

Если при данном анализе в целях подтверждения чистоты необходимо обеспечить высокую чувствительность при использовании малого объема вводимой пробы, то для верификации следует применять аналитическую, а не препаративную системы.

Чтобы обеспечить быстрый анализ результатов, данные этапы повторной обработки используются наряду с простым программным обеспечением.

Программа Open Solution

Все более выраженной становится потребность в многофункциональном программном обеспечении, которое могло бы использоваться для создания определенных условий и проведения анализа на высоком уровне, опираясь на простые и интуитивно понятные методы. Однако что будет представлять из себя идеальная программа, которую легко мог бы использовать каждый сотрудник? С точки зрения повседневных операций важным представляется доступ к Интернету для общения по электронной почте и простого доступа к имеющейся в сети информации.

Если бы для анализа методами ЖХ и ЖХ/МС мог использоваться привычный несложный браузер Internet Explorer, то расходы на обучение, направленное на получение практического опыта работы с программами, могли бы быть снижены или вовсе отсутствовать. Кроме того, не было бы необходимости в лицензировании программного обеспечения для каждого ПК или пользователя, что привело бы к еще большему снижению общих затрат на операции, связанные с анализом.

Можно ли использовать браузер Internet Explorer для ЖХ и ЖХ/МС анализа?

В настоящее время запуск применяемых сейчас программ для ЖХ и ЖХ/МС в их нынешнем виде в Internet Explorer, может



Рисунок 8: Open Solution — как установить пробы для анализа

обеспечить небольшое преимущество, поскольку операции программ останутся в основном неизменными. В сущности, для эффективного использования Internet Explorer с целью управления анализом необходимо обеспечить соблюдение следующих критериев - возможность:

- (1) создания среды открытого доступа
- (2) просмотра необходимой информации в окне браузера Internet Explorer
- (3) вывода информации на печать, а также в электронной форме (формат PDF).

Примечание 1.

Как только данные проблемы будут решены, проведение анализа с применением браузера Internet Explorer станет реальностью. Кроме того, поскольку программа Open Solution запускается только на ПК, непосредственно подключенном к аналитическому прибору, то данная программа может также запускаться в автономном режиме; поэтому любое будущее конструирование лабораторной сети может быть завершено без растраты предшествующих капиталовложений.

Реальная среда открытого доступа

Как было указано выше, возможность создания среды открытого доступа в среде Internet Explorer является важным фактором. Термин «открытый доступ» обозначает доступ любого лица, в любом месте, в отношении любых данных и по любой причине, при условии выполнения заданного набора условий безопасности. Возможности значительно расширятся, если такая среда открытого доступа создается с применением стандарта Ethernet, поскольку это позволяет преодолеть ограничения, связанные с местоположением и географией, и совершать обмен информацией с любого ПК в сети. Все данные параметры

Колонка				
Внутренний диаметр (мм)	Площадь поперечного сечения (мм2)	Площадь поперечного сечения на основании «1» на площади поперечного сечения при ID 4,6 мм	Скорость потока при условии, что «1» – это скорость потока при ID 4,6 мм (мл/мин)	Объем введения при условии, что «10» – это объем введения при ID 4,6 мм (мкл)
4.60	17	1	1	10
20	314	19	19	190
50	1963	115	115	1150

Таблица 1: Зависимость между площадью поперечного сечения колонки и скоростью потока / видимым объемом (не вошло в технический отчет).

и определяют понятие среды открытого доступа. Open Solution представляет собой новое разработанное программное приложение, предназначенное для создания такой среды открытого доступа.

Open Solution – это программа, которая позволяет управлять высокоэффективным жидкостным хроматографом Prominence и ультра-высокоэффективным жидкостным хроматографом (Nexera и Prominence XR), а также масс-спектрометром LCMS-2020 – не через прямое действие на их управляющую программу, а через открытый доступ.

Для программы Open Solution используется Internet Explorer, вследствие чего отпадает необходимость установки специальных программ на каждый терминал ПК и потребность в их дополнительном лицензировании. Установив программу Open Solution на ПК, подключенный напрямую к аналитическому прибору, Вы получите возможность просматривать результаты анализа и выводить отчетов с любого ПК в сети.

Open Solution расширяет границы возможного

Исключение всех ненужных щелчков по кнопке мыши – желание всех сотрудников лабораторий. Лаборант считает,

и вполне обоснованно, что его работа состоит в проведении анализа, а не в управлении прибором. Выполнение сложных операций на ПК вызывает чувство неудовлетворенности, поскольку такие действия на самом деле снижают эффективность работы лаборанта.

Программа Open Solution расширяет пределы возможного, упрощая выполнение операций на ПК. Начиная от логина, который вводится для запуска анализа, процесс сводится к уровню, эквивалентному управлению простым лабораторным прибором, таким как измеритель кислотности или электронные весы. Операции на ПК представлены по принципу «Раз, два, три»: (Этап 1) Вход в систему/ (Этап 2) Указание номера ампулы и установка комплекта ампул / (Этап 3) Начало.

Все остальные действия можно доверить прибору. Анализ даже может быть завершен к моменту, когда лаборант вернется в кабинет.

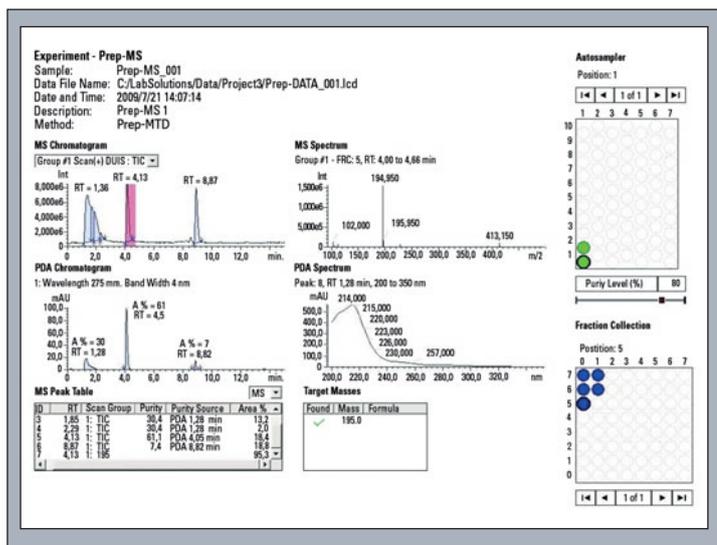


Рисунок 9: Окно «Результаты анализа» в программе Open Solution

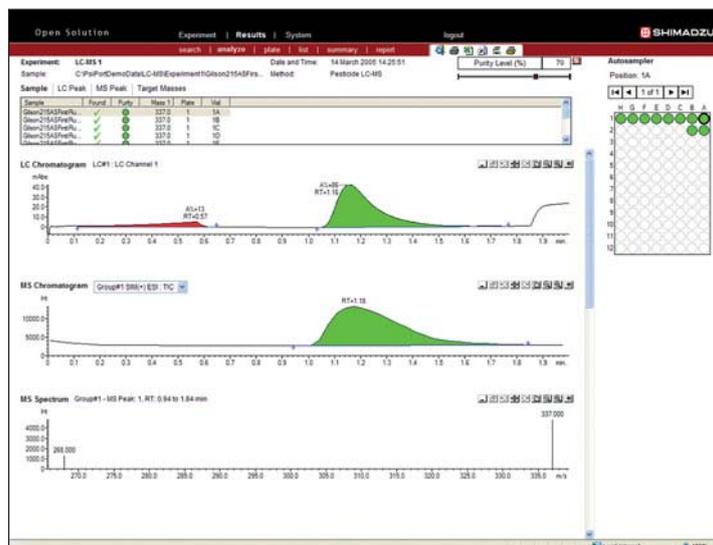


Рисунок 10: Анализ чистоты пиков

Помимо максимального упрощения операций, выполняемых на ПК, особую роль в повышении производительности анализа также играет простота проверки его результатов. Поскольку результаты анализа выводятся в окне браузера Internet Explorer, то при применении программы Open Solution выводимая на экран информация может быть сокращена до необходимого минимума, не прибегая при этом к проведению сложных операций.

Информация в данном окне организована в простом, доступном для понимания виде. Например, штатив для проб и расставленные ампулы представлены графически, поэтому для сопоставления проб (ампул) с результатами анализа хватает беглого взгляда. Конфигурация окон, несомненно, может меняться в зависимости от личных предпочтений (см. Рисунок 9 и 10).

Более того, при выводе результатов анализа на экран отображаемую в окне информацию можно распечатать или преобразовать в любую иную удобную форму.

Возможность проведения данных операций с любого ПК в сети, безусловно, является одним из важных преимуществ открытого доступа.

Простота поиска данных также играет не последнюю роль в повышении производительности анализа. Если в целях верификации применимости условий в текущем анализе требуются данные, полученные в результате предыдущего

анализа, их можно найти среди огромного количества аналитических данных. Время, затрачиваемое на поиск таких данных, компенсируется полученным ранее временным преимуществом.

Функция гиперссылок обеспечивает высокоскоростной доступ к результатам анализа

Как правило, в таких ситуациях используется функция поиска системы Windows, однако данный процесс может занимать большое количество времени в зависимости от структуры файла и других факторов. Программа Open Solution решает проблему таких ограничений за счет функции гиперссылок – данная функция обеспечивает высокоскоростной доступ к результатам анализа. Например, с целью информирования о завершении анализа создается и направляется сообщение по электронной почте, при этом в письме указывается URL для индикации места расположения сохраняемых результатов. Простое нажатие на гиперссылку URL позволяет отобразить результаты анализа в окне браузера Internet Explorer. Кроме того, нажатие на изображение ампулы на диаграмме штатива для проб переводит экран в режим отображения результатов анализа, полученных их данной пробы. Таким образом, можно быстро просмотреть результаты анализа, полученные для другой ампулы в том же штативе для проб. Программа Open Solution

поддерживает конфигурацию системы Prominence / Nexera, включая насосы, автоматические пробоотборники, термостат колонки и все датчики. Благодаря таким особенностям программа также поддерживает процесс измерения, одновременно используя несколько датчиков. Кроме того, в среде открытого доступа, создаваемой программой Open Solution, могут применяться множественные системы, а не одна система. В случае необходимости коллективного управления данными, поддерживается применение ПК сервера.

Программа Open Solution создает среду открытого доступа

Программа Open Solution способна эффективно выполнять требования, предъявляемые к среде открытого доступа для препаративной ЖХ/МС. Например, в случае ЖХ/МС масса целевого соединения может применяться для получения фракции, чистота которой превышает чистоту, которую способен обеспечить УФ детектор. При этом плавная синхронизация ЖХ/МС и коллектора фракций, предусмотренная в Open Solutions, гарантирует простую верификацию и надежный отбор фракции с очень высокой скоростью. Как было описано выше, система открытого доступа, включающая замкнутую сеть в лаборатории, соединенную с открытой сетью в отдельной среде офиса, способна обеспечить

значительные преимущества. Внедрение программы Open Solution обеспечивает возможность создания среды открытого доступа, использование которой в максимальной степени обеспечивает высокие результаты ЖХ и ЖХ/МС анализа, проводимого в аналитической лаборатории.

Примечание

Дополнительную информацию смотрите в технических отчетах № 29 (Open Solution: среда открытого доступа при помощи Web –браузера) и 31 (Основные методы препаративной жидкостной хроматографии и подходы к повышению эффективности (1)).