

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В АНАЛИЗЕ И ПОЛУЧЕНИИ ВЫСОКОЧИСТЫХ ВЕЩЕСТВ

¹А. С. Самохин, ¹И. А. Ревельский*, ¹Д. А. Чепелянский,
²О. О. Паренаго, ²О. И. Покровский, ²Ф. Д. Лепешкин,
²К. Б. Устинович, ¹А. И. Ревельский

¹*Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия*

²*Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова РАН, Москва, Россия*

*revelsky@environment.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 16.03.2011 г.

В обзоре рассмотрены основы метода сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ) и его применение для решения различных задач. Проведено сопоставление методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и СФХ. При обсуждении областей применения основной акцент сделан на возможности использования метода СФХ при анализе фармацевтических субстанций на примеси, биологически важных веществ и на использовании препаративной СФХ для получения высокочистых веществ. При рассмотрении детекторов, применяемых в СФХ, особое внимание уделено масс-спектрометрическому детектору.

Ключевые слова: сверхкритическая флюидная хроматография, фармацевтические препараты, препаративная СФХ, СФХ/МС.

1. ВВЕДЕНИЕ

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) — вид элюентной хроматографии, в которой основным компонентом подвижной фазы (ПФ) являются сверхкритические флюиды (СКФ) либо сжатые газы. Впервые сверхкритический флюид в качестве подвижной фазы был использован в хроматографическом разделении в работе Клеспера в 1962 году [1]. Поначалу новая техника была с энтузиазмом принята специалистами, было опубликовано значительное число работ по исследованию применимости СФХ для решения самых разнообразных задач. Накапливались знания о приборных особенностях метода, о применимости различных веществ в сверхкритическом (СК) состоянии в качестве подвижной фазы. Наибольшую популярность в качестве элюентов приобрели такие вещества как CO₂, ряд алканов, SF₆, Xe, NH₃, N₂O — вещества, в стандартных условиях являющиеся газами. В препаративной работе это обстоятельство чрезвычайно упрощало выделение очищенного продукта из раствора после разделения, поскольку в отличие от традиционных жидких хроматографических растворителей отделение подвижной фазы в таком случае можно провести простой декомпрессией. Первоначально едва ли не основным перспективным преимуществом СФХ перед родственными техниками виделась возможность управления плотностью и, соответственно, растворяющей способностью флюида путем контроля давления. В 1968 г.

в «Science» была опубликована работа, авторы которой предположили, что по мере повышения плотности растворяющая способность СК-СО₂ варьируется от близкой к гексану до близкой к изопропанолу [2]. Возникло стремление использовать эту его особенность для имитации градиентного элюирования в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с вариацией состава подвижной фазы. То, что в ВЭЖХ достигается за счет одновременной работы двух насосов с постепенным изменением процентного соотношения компонентов смеси в ходе элюирования, казалось, можно будет реализовать одним лишь программированием давления. Эти надежды не оправдались, так как довольно скоро стало ясно, что предположение о такой зависимости растворяющей способности СК-СО₂ от плотности было неверным, и ни при каких значениях плотности он не сравним с изопропанолом по растворяющей способности. В связи с этим интерес к СФХ был в значительной мере нивелирован и эта область пережила некоторый спад.

Но затем, в 80—90-е годы XX века американское Управление по контролю качества продуктов и лекарств (Food and Drug Administration — FDA), а также контрольные органы других стран ввели требования к энантиомерной чистоте фармацевтической продукции, так как подавляющее большинство новых синтетических фармпрепаратов хиральны и биологическая активность их энантиомеров зачастую кардинально различается. Фармпроизводителей обязали проводить испытания активности каждого энантиомера всех тестируемых соединений в отдельности, таким образом, возникла необходимость проводить множество препаративных разделений смесей энантиомеров. Разделение рацематов — в целом более сложная хроматографическая задача, чем ахиральные разделения, как ввиду исключительной близости многих химических свойств энантиомеров одного соединения, так и вследствие невозможности создания сорбентов, каждый активный центр которых будет обладать оптической активностью. Для достижения высоких коэффициентов разделения в хиральной хроматографии часто приходится использовать экстенсивные методы: последовательное соединение нескольких колонок, технику SMB (Simulated Moving Bed — прием, суть которого заключается в многократном прохождении смесью разделяемых веществ одной и той же последовательности колонок до достижения нужной степени разделения) и т. п. Эффективность этих методик прямо пропорциональна времени хроматографирования и сопряжена с расходом больших количеств растворителей. К тому же, как правило, хиральные сорбенты в несколько раз дороже ахиральных. Все это приводит к тому, что проведение большого числа препаративных разделений — очень дорогостоящая и времязатратная работа. В поисках сокращения издержек фармпроизводители обратили свое внимание на препаративную СФХ. Вязкость сверхкритических флюидов и сжатых газов намного меньше, чем у жидкостей, что позволяет применять скорости потока в 2—3 раза выше таковых в ВЭЖХ. Эффективность разделения при одинаковых скоростях потока элюента и характеристиках сорбента в СФХ чаще всего выше, чем в ВЭЖХ, в силу ряда факторов: более высокие коэффициенты диффузии аналитов в СКФ, более низкая вязкость, более низкое жидкое трение и пр. Эти факторы в комплексе приводят к тому, что при достижении одинаковой или лучшей степени разделения в СФХ в среднем удается провести элюирование смеси веществ в 4—5 раз быстрее, чем в ВЭЖХ. К тому моменту уже было ясно, что наиболее популярным флюидом, используемым в хроматографии, становится СК-СО₂ ввиду удачного сочетания его растворяющей способности, пожаробезопасности, чистоты, возможности много-

кратного использования с помощью простых рециркуляционных систем и дешевой. Последние два свойства особо привлекали внимание фарминдустрии, поскольку расходы на высокочистые органические растворители с учетом их последующей утилизации — весьма серьезный экономический фактор при организации работ по очистке синтетических субстанций. Сочетание всех этих свойств привело к возобновлению интенсивных изысканий в области сверхкритической флюидной хроматографии. Начав с препаративного разделения энантиомеров, исследователи постепенно расширяли сферы применения этой техники, поскольку ее преимущества так же хорошо работали и в иных приложениях. Долгое время серьезным фактором, сдерживающим расширение поля применимости СФХ, была низкая полярность CO_2 . Однако в последние 5—7 лет, во-первых, появилось множество сорбентов и колонок, разработанных специально для СФХ, а во-вторых, было наработано большое число приемов динамической модификации — введения в подвижную фазу небольших количеств определенных химических веществ, которые меняют характер всех трех парных взаимодействий в хроматографической системе: сорбент — элюент, сорбент — аналит и элюент — аналит. Роль динамических модификаторов (ДМ) столь многогранна, что в каждом конкретном случае проявляется особо, но в общем ДМ используют для подавления электростатической диссоциации, для экранирования остаточных силанольных групп сорбентов, для модификации поверхности сорбента с целью придания ранее не присущих ему свойств, для изменения растворяющей способности элюента, для обратимого химического изменения самого аналита и многого другого. Благодаря этому стало возможным использование техник ион-парной, ионообменной, гидрофильной (HILIC) хроматографии, что значительно расширяет количество соединений, анализ которых может быть проведен методом СФХ. Тем самым круг веществ, разделяемых с помощью СФХ, был существенно расширен в сторону более полярных соединений.

Благодаря появлению надежных высококачественных аналитических приборов сверхкритическая флюидная хроматография теперь активно проникает и в исследовательскую практику в качестве быстрого хроматографического метода, применяемого вместо или вместе с ВЭЖХ. Метод бурно развивается, постепенно становясь столь же общепринятым инструментом работы, как газовая и жидкостная хроматография. Ниже мы рассмотрим основные технические и методические аспекты СФХ, а также дадим краткий обзор работ по применению этого метода для решения различных химических и технологических задач. За более полной информацией по конкретным областям сверхкритической флюидной хроматографии отсылаем читателей к обзорам [3—5].

2. АППАРАТУРА

Схема прибора для аналитической СФХ приведена на рис. 1. Большинство составных частей приборов, используемых в СФХ и ВЭЖХ с набивными колонками, одинаково.

Наиболее часто в СФХ в качестве подвижной фазы используют CO_2 в сверхкритическом флюидном состоянии (СК- CO_2); это связано, в основном, с низкими значениями критических температуры и давления (T_c и P_c соответственно). Сам СК- CO_2 обладает низкой полярностью, поэтому для элюирования многих полярных соединений, в частности фармацевтических веществ, к нему добавляют модификатор (метанол, этанол и др.).

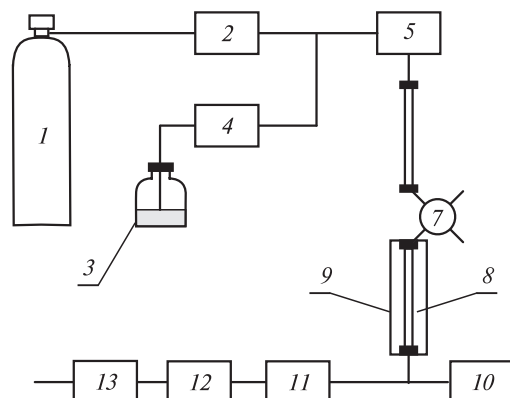


Рис. 1. Схема прибора для аналитической сверхкритической флюидной хроматографии: 1 — баллон с CO_2 ; 2 — насос; 3 — источник вещества-модификатора подвижной фазы; 4 — насос; 5 — демпфер; 6 — смеситель; 7 — кран ввода пробы; 8 — колонка; 9 — термостат; 10 — ПИД; 11 — УФ-детектор; 12 — датчик выходного давления; 13 — электронно-управляемый регулятор давления

Два насоса обеспечивают необходимое давление углекислого газа и определенную концентрацию вещества-модификатора в подвижной фазе. Насос для CO_2 соединен с баллоном с углекислым газом. Вязкость чистого углекислого газа составляет 1/20 от вязкости чистого метанола (наиболее часто используемого модификатора в СФХ).

Современные приборы для СФХ позволяют работать как в изократических условиях, т. е. с сохранением величин всех параметров процесса неизменными в ходе элюирования, так и в градиентном режиме, т. е. с вариацией одного или нескольких рабочих параметров — состава подвижной фазы, давления, температуры — непосредственно по ходу эксперимента. В сверхкритической флюидной хроматографии с насадочными колонками в настоящий момент чаще всего применяются градиентные методики с изменением состава подвижной фазы, поскольку это позволяет варьировать в широких пределах ее полярность и растворяющую способность в ходе элюирования. При программировании состава элюента изменяют концентрацию модификатора в подвижной фазе. При этом вязкость подвижной фазы (а также давление на входе в колонку) возрастает с увеличением концентрации модификатора.

Особенностью СФХ является использование в качестве подвижной фазы сверхкритического флюида, который при понижении давления теряет свои специфические свойства, становясь обычным разреженным газом. По этой причине в СФХ, в отличие от жидкостной хроматографии, подвижная фаза должна находиться под давлением на всем протяжении хроматографического тракта, чтобы не позволить сжато му флюиду потерять необходимую плотность. Первоначально для этого использовались рестрикторы — пассивные регуляторы давления, представляющие собой узкие пластиковые или металлические капилляры малого внутреннего диаметра. Преимущество такого подхода заключалось в простоте перестройки стандартных приборов для газовой хроматографии (ГХ) или ВЭЖХ под СФХ. В связи с этим многие исследователи изготавливали собственные модели рестрикторов, что приводило к различному качеству контроля давления и в некоторой степени

к невозможности воспроизведения одних и тех же результатов на разных приборах. Неоднократно проводились сравнения достоинств и недостатков различных типов рестрикторов, применяемых в сверхкритической флюидной хроматографии [6—8]. Однако этот прием не позволяет осуществлять одновременный независимый контроль давления и скорости потока флюида в системе, поскольку для этого необходимо иметь возможность управления диаметром выходного отверстия регулятора давления. В связи с тем, что оба названных параметра влияют на ход разделения веществ сложным образом, их контроль выгоднее осуществлять независимо. По мере развития СФХ, особенно с использованием насадочных колонок, практически все исследователи и производители оборудования отказались от рестрикторов в пользу автоматических регуляторов давления. Управление скоростью потока стало осуществляться с помощью насосов с охлаждаемыми головками, иногда снабжаемых расходомерами с обратной связью для большей точности контроля состава подвижной фазы. Рестрикторы же продолжают использоваться в качестве пассивных сплиттеров — расщепителей потока при применении масс-спектрометрических (МС) детекторов, на которые направляется лишь малая часть элюата.

2.1. Детекторы

В СФХ может применяться большинство детекторов, используемых в ВЭЖХ и ГХ. Среди них детектор по светорассеянию, азотный хемилюминесцентный детектор, МС-детектор, пламенно-ионизационный детектор (ПИД), ультрафиолетовый (УФ) детектор, инфракрасный детектор с преобразованием Фурье, электронозахватный детектор и ряд других. Однако наибольшее распространение получили УФ-детектор, ПИД и МС-детектор. Возможность применения УФ-детектора объясняется тем, что СК-СО₂ (наиболее часто используемый в качестве подвижной фазы) не поглощает в УФ-диапазоне вплоть до 190 нм. Применение ПИД обусловлено тем, что при использовании таких подвижных фаз, как сверхкритические СО₂, NH₃, N₂O, фоновый сигнал ПИД невелик. Использование органических модификаторов ограничивает область применения ПИД [9—10]. В зависимости от типа используемого детектора рестриктор располагается перед детектором (например, в случае ПИД) или после (например, в случае УФ-детектора). Вне зависимости от используемого метода детектирования необходим точный контроль давления и потока.

Сверхкритическая флюидная хроматография — масс-спектрометрия (СФХ/МС). В конце 80-х годов XX в. СФХ становится популярным методом анализа, начинается повсеместное использование кварцевых капиллярных колонок с привитой неподвижной фазой. Относительно низкая скорость потока элюента позволила направлять подвижную фазу непосредственно в источник ионов масс-спектрометра и проводить электронную или химическую ионизацию.

Экспериментальные трудности, связанные с использованием капиллярной СФХ, необходимость наличия большого числа неподвижных фаз (особенно в случае хирального разделения) привело к возрождению СФХ с набивными колонками. При использовании метода электронной ионизации для соединения набивных колонок СФХ и МС было необходимо проводить деление потока (чтобы понизить давление в источнике ионов), что приводило к потере чувствительности.

Использование интерфейса с транспортной лентой позволяло разграничить процесс разделения методом СФХ и процесс масс-спектрального детектирования. Осаждение анализита на ленту позволяло изменять скорость потока и состав

подвижной фазы без потерь в эффективности работы всей системы в допустимых пределах [11].

В настоящее время в СФХ/МС наиболее часто применяют методы ионизации при атмосферном давлении, используемые в ВЭЖХ/МС: ионизацию электрораспылением, фотоионизацию при атмосферном давлении и химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД) [12].

СФХ/ЯМР-спектроскопия. Как уже было отмечено, в СФХ наиболее часто в качестве подвижной фазы используют СК-СО₂, молекулы которого не содержат атомов водорода, что позволяет использовать для детектирования метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах ¹H. Метод СФХ/ЯМР можно использовать для on-line идентификации анализируемых веществ. Из ограничений метода следует отметить низкую чувствительность ЯМР по сравнению с другими методами детектирования [13]. Метод СФХ/ЯМР был применен для разделения и идентификации углеводов, фталатов [14], акрилатов с использованием в качестве модификатора дейтерированного метанола [15], *цис-транс*-изомеров витамина А в форме ацетата [16].

2.2. Колонки

По типу используемых колонок СФХ имеет две разновидности: капиллярная СФХ и СФХ с набивными колонками. В варианте капиллярной СФХ используют колонки длиной от 1 до 60 м, диаметром от 0,03 до 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы от 0,10 до 0,65 мкм. При проведении СФХ-разделения на насадочных колонках используют колонки длиной от 0,1 до 0,5 м, диаметром от 0,8 до 5 мм в аналитическом варианте и от 7 до 50 мм в препаративном. Размер используемых частиц сорбентов варьируется от 1,7 до 10 мкм. Малый перепад давления по колонке ввиду низкой вязкости подвижной фазы в СФХ позволяет осуществлять стекинг (последовательное соединение) большого числа колонок с целью экстенсивного увеличения числа теоретических тарелок [17], а также техники типа SMB (Simulated Moving Bed) — организацию циклического движения элюента по контуру из нескольких колонок до достижения необходимой степени разделения [18, 19].

Также получили распространение набивные капиллярные колонки длиной 0,2—2,0 м, внутренним диаметром 0,1—0,5 мм, заполненные частицами сорбента размером до 20 мкм. Такие колонки иногда называют микронасадочными.

Применение СФХ с набивными колонками предполагает использование сверхкритического СО₂, чаще всего с добавками одного или двух модификаторов. Подавляющее большинство работ в СФХ выполняется на нормально-фазовых колонках. В настоящее время лидером по частоте использования для нехиральных разделений является силикагель с привитыми 2-этилпиридиновыми группами (2ЭП). Часто используются диольные, цианопропильная (—СН₂СН₂СН), аминная (NH₂) и прочие нормально-фазовые модификации силикагеля [20]. В последние несколько лет целый ряд производителей начал выпуск специализированных колонок для СФХ, как по типу привитых к силикагелю фаз, так и по способам упаковки сорбента в колонке. Также до сих пор значительное количество разделений выполняется на чистом силикагеле, часто с использованием разных способов динамической модификации (органические и сульфокислоты, аминные основания, перфторированные спирты, ионы серебра и прочее). Ввиду дешевизны силикагеля по сравнению с сорбентами с привитыми фазами его необратимое модифицирование не столь опасно. Разделение в обращенно-фазовом режиме СФХ

встречается реже; для его реализации используют традиционные алкильные фазы, хотя в последнее время предпочтение чаще отдают сорбентам с ароматическими привитыми группами, например, фенилгексильной или пентафторфенильной [20].

Широкое распространение получили также силикагели с такими функциональными группами, как нитрильная, amino- и диольная. Использование сорбентов с диольной группой позволяет получить наилучшую селективность для кислот и спиртов. Сорбенты с аминогруппой обеспечивают наилучшую селективность при разделении аминов. Практика показывает, что в ряде случаев, например, при разделении пептидов, использование этилпиридиновой фазы позволяет сократить количество аминного динамического модификатора. Неопровержимой теории, объясняющей такое поведение, на настоящий момент нет. Некоторые исследователи полагают, что ионообменный механизм на этой фазе реализуется путем протонирования привитых пиридиновых групп кислотным модификатором вместо адсорбции аминных оснований из подвижной фазы с их последующим протонированием [21]. Таким образом, эта колонка может в определенных условиях выступать как слабый анионообменник. Это предположение подтверждается среди прочего тем, что протонированная этилпиридиновая фаза сильно удерживает, например, арилсульфонаты, но достаточно плохо — аммониевые соли [22].

Актуально применение метода СФХ для разделения энантиомеров, особенно в области фармацевтики. Иногда разделение энантиомеров проводят при температуре ниже критической и давлении выше критического [23]. Несмотря на то, что физически при таких условиях подвижная фаза, содержащая сжатый диоксид углерода, находится в жидком состоянии, поведение используемых в этом методе смесей веществ как подвижной хроматографической фазы не меняется драматически при переходе через критическую точку [24]. Это позволяет проводить нужные разделения и в субкритических условиях.

Колонки с хиральными неподвижными фазами имеют существенное ограничение, связанное с низкой ахиральной селективностью. Для отделения интересующего энантиомера от других компонентов, присутствующих в образце, зачастую необходимо совместное использование хиральной и ахиральной неподвижных фаз [25, 26].

2.3. Неподвижные фазы

Для хиральных разделений в СФХ применяются те же сорбенты, что и в ВЭЖХ. Их разнообразие достаточно велико, но подавляющее большинство часто используемых относится к следующим классам:

- полисахариды;
- сорбенты щеточного типа (т. н. фазы Пиркла);
- фазы включения: циклодекстрины, макроциклические гликопротеиды и т. п.;
- макроциклические антибиотики;
- политартрамиды.

Наибольшей популярностью пользуются полисахаридные сорбенты — производные амилозы и целлюлозы, сорбированные либо химически пришитые к поверхности силикагеля. По некоторым оценкам, до 80 % всех хиральных СФХ-разделений выполняется на этих сорбентах. Целлюлоза имеет более жесткую вторичную структуру, не подверженную конформационным изменениям. Амилоза — более конформационно лабильный полимер, имеющий спиральную вторич-

ную структуру, которая может изменяться под действием различных факторов, прежде всего природы заместителей и растворителей. Производители таких сорбентов, как правило, указывают в названии тип используемого полимера (например, Cellucoat, Chiralcel и т. п. для целлюлозы и Amuscoat, Chiralpak и пр. для амилозы), а также вид заместителя, который обозначается двухбуквенным кодом. На рис. 2 приведены наиболее популярные из применяемых заместителей в полисахаридных сорбентах и соответствующие коды. Заместители меняют полярность сорбционного слоя, конформацию полимера и, следовательно, доступность активных центров, обеспечивают различные механизмы удерживания аналитов на сорбенте и т. д. Механизмы энантиомерного разделения на полисахаридных колонках,

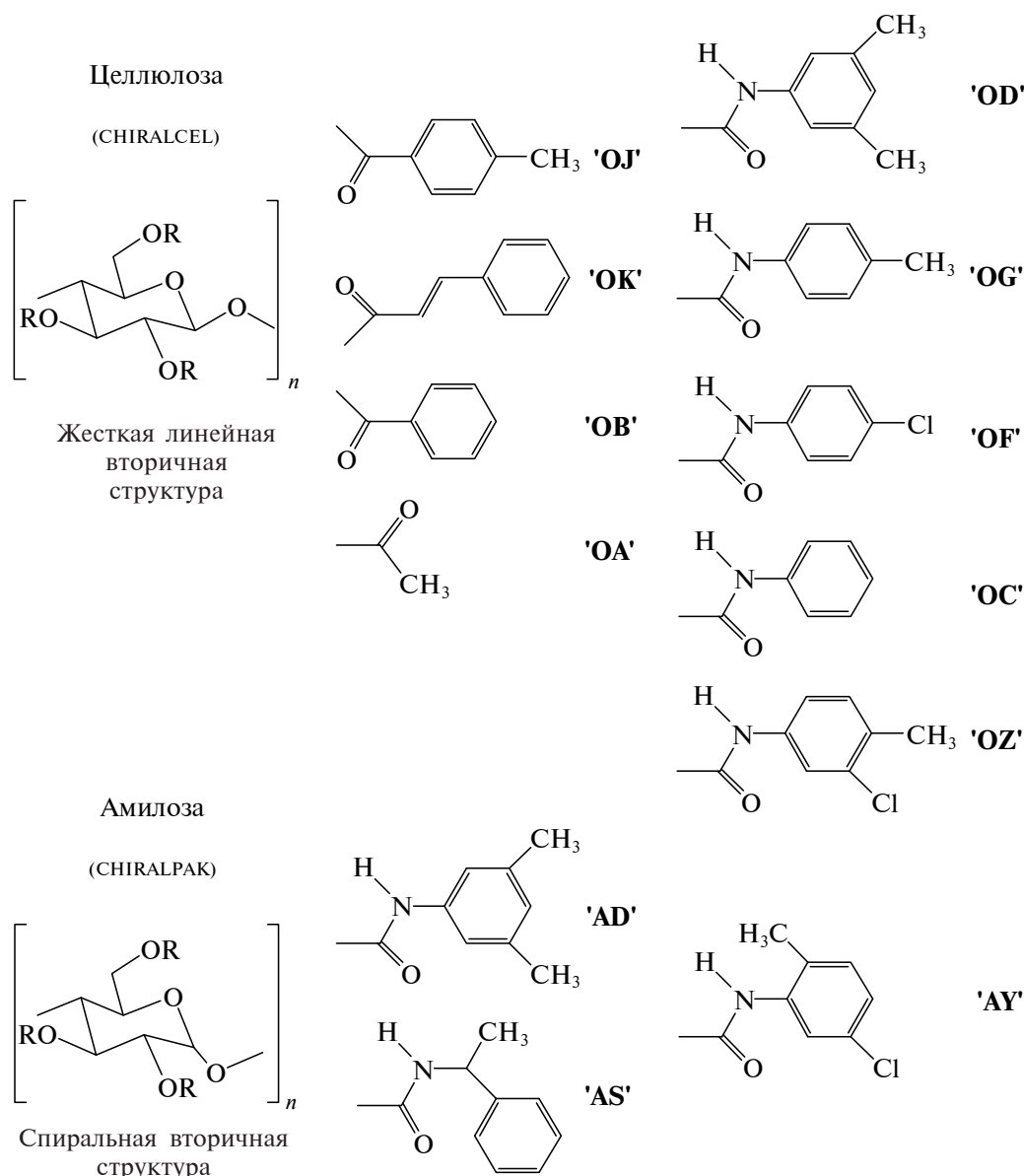


Рис. 2. Хиральные полисахаридные сорбенты: структура и заместители

несмотря на их популярность, остаются плохо изученными. Удерживание в их случае определяется огромным множеством типов взаимодействий — водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия, стекинг-взаимодействия, образование комплексов включения и ряд иных. На это накладывается упоминавшаяся конформационная подвижность (в случае амилозы), которая приводит к тому, что при использовании разных концентраций различных сорбителей хроматографист имеет дело с разными сорбентами.

Долгое время большинство полисахаридных сорбентов выполнялось в виде частиц силикагеля, покрытого полимером, без химической сшивки. Такие сорбенты легко подвергаются деструкции под действием полярных апротонных растворителей, например, этилацетата, ацетона, ДМСО. В последнее время это ограничение частично снято, так как в серийном производстве появились так называемые иммобилизованные полисахаридные фазы, в которых полимер ковалентно прикреплен к поверхностным силанольным группам силикагеля. Выбор сорбителей при работе с этими сорбентами существенно шире.

Сорбенты щеточного типа (фазы Пиркла) представляют собой силикагели с привитыми оптически активными малыми молекулами, обычно производными различных аминокислот. Это стабильные фазы, не разрушающиеся растворителями. Одна и та же фаза Пиркла, как правило, доступна в продаже в виде обоих энантиомеров, поэтому в препаративной работе можно намеренно инвертировать порядок выхода энантиомеров аналита просто за счет смены фазы. Это бывает необходимо при недостаточном разделении или при намеренном перегрузе колонки с целью уменьшения времени препаративной очистки, чтобы при накоплении целевой пик выходил с колонки первым и собирался без примесей второго изомера. Для сорбентов щеточного типа характерно большое влияние π — π взаимодействий, поэтому аналиты, не содержащие ароматических групп, как правило, плохо делятся на них. В названиях торговых марок этих сорбентов конкретный заместитель обычно обозначают четырехзначным числовым кодом.

Макроциклические фазы, в которых разделение происходит в основном за счет образования комплексов включения (циклодекстрины, макроциклические гликопротеины), работают по принципу резьбового соединения. Один из энантиомеров обладает такой пространственной конфигурацией, что способен легко «ввинтиться» в циклический полимер, второму это не позволяют сделать стерические затруднения. Циклодекстрины иногда применяются в СФХ не в качестве неподвижной фазы, а в роли хирального компонента подвижной фазы. Их добавляют в элюент и проводят разделение на изначально нехиральном сорбенте, который подвергается динамическому модифицированию либо непосредственно в процессе хроматографии, либо в ходе предварительной подготовки [27]. Циклодекстрины сорбируются на поверхности носителя и выполняют функцию оптически активных центров неподвижной фазы. Часто должным образом обработанные фазы сохраняют хиральную активность и после удаления циклодекстринов из подвижной фазы. Такая организация динамической модификации более предпочтительна, так как присутствие активных веществ в элюенте, способных образовывать лабильные комплексы с аналитом, усложняет оптимизацию условий разделения [27].

Макроциклические антибиотики используют в качестве хиральных сорбентов как в капиллярных, так и в насадочных колонках. Наиболее популярными являются сорбенты на основе антибиотиков ванкомицина (обозначаемого литерой V в названии), тейкопланина (Т), агликона тейкопланина (TAG) и ристоцетина ®.

Как и в случае с полисахаридами, белковые неподвижные фазы, будучи сложными химическими объектами, взаимодействуют с подвижной фазой и аналитами по множеству механизмов одновременно, что затрудняет предсказание эффективности разделения нового хирального объекта на том или ином сорбенте и вынуждает хроматографиста иметь полный комплект фаз данного типа и проводить их полный скрининг при подборе методики.

Политартрамиды — замещенные производные полимеров диамида винной кислоты, ковалентно закрепленные на поверхности силикагеля. Энантиоселективность этих сорбентов определяется способностью образовывать множественные водородные связи и вступать в π — π взаимодействия. Последний фактор часто оказывается решающим при разделении ароматических хиральных соединений. Как и в других случаях, конформация полимера винной кислоты и, как следствие, стерическая доступность хиральных центров определяется используемыми заместителями. Широкое распространение получили политартрамидные сорбенты с двумя заместителями при гидроксигруппах винной кислоты: третбутилбензоил (ТВВ) и метадиметилбензоил (DMB).

Такое богатство выбора хиральных сорбентов, с одной стороны, дает основания полагать, что в подавляющем большинстве случаев при приложении достаточных усилий удастся найти подходящую систему сорбент — элюент для сколь угодно эффективного разделения рацемата. Но с другой стороны, оно создает серьезные затруднения для пользователя, вынужденного перебирать сотни сочетаний колонок, сорастворителей и динамических модификаторов в поисках оптимальных условий. На настоящий момент не существует сколько-нибудь надежных способов предсказания энантиоселективности конкретного сочетания сорбент—элюент по отношению к конкретному аналиту даже на качественном уровне. Производители СФХ-оборудования, учитывая этот фактор, создают приборы, специально предназначенные для облегчения и ускорения скрининга хиральных колонок и сорастворителей. Неоднократно предпринимались попытки систематизировать имеющуюся информацию о применимости тех или иных хиральных сорбентов в СФХ. Так, в работе [1] проведено исследование условий разделения энантиомеров соединений, принадлежащих к различным классам, с использованием хиральных неподвижных фаз (полисахаридов и макроциклических антибиотиков). Исследовали следующие неподвижные фазы: полисахаридные Chiralcel OD, Chiralpak AD, антибиотические Chirobiotic V, Chirobiotic T, фазы щеточного типа семейства Chirex 30xx. В качестве модельных соединений использовали β -блокаторы, β -агонисты, бензодиазепины, некоторые лекарственные средства, барбитураты, аминокислоты. Было показано, что наилучшая неподвижная фаза — Chiralpak AD, на которой удалось разделить на энантиомеры 70 % исследуемых соединений. На Chiralcel OD удалось разделить 66 %, на Chirobiotic T — 50 %, Chirobiotic V — 48 %. Для сравнения, на колонках щеточного типа Chirex 3022 и Chirex 3005 удалось разделить энантиомеры всего 34 % и 20 % соединений соответственно. Одновременное использование двух различных неподвижных фаз (Chiralpak AD и Chiralcel OD) позволило разделить на энантиомеры 95 % исследуемых соединений.

Ниже также будет приведено достаточное количество примеров хиральных СФХ-разделений при решении в основном фармацевтических задач. За более подробным описанием этой сферы сверхкритической флюидной хроматографии отсылаем читателей к обзорам [28, 29].

В таблице 1 приведены названия сорбентов, встречающихся в данном обзоре, и их типы.

Таблица 1

Используемые в тексте названия сорбентов

Название	Тип колонки	Хиральность	Тип фазы	Заместитель
Chiralcel OJ	Насадочная	Да	Полисахарид	OJ
Chiralcel OB	Насадочная	Да	Полисахарид	OB
Chiralcel OD	Насадочная	Да	Полисахарид	OD
Chiralcel OD-H	Насадочная	Да	Полисахарид	OD
Chiralpak AD	Насадочная	Да	Полисахарид	AD
Chiralpak AD-H	Насадочная	Да	Полисахарид	AD
Chiralpak AS	Насадочная	Да	Полисахарид	AS
Daicel AD	Насадочная	Да	Полисахарид	AD
Chirex 3022	Насадочная	Да	Пиркл	Нафтилэтиламин-карбамид индолин-2-карбоновой кислоты
Chirex 3005	Насадочная	Да	Пиркл	Нафтилглицинамид 3,5-динитробензойной кислоты
Chirobiotic TAG	Насадочная	Да	Антибиотик	Агликон тейкопланина
Chirobiotic V	Насадочная	Да	Антибиотик	Ванкомицин
Chirobiotic R	Насадочная	Да	Антибиотик	Ристоцетин
Chirobiotic T	Насадочная	Да	Антибиотик	Тейкоплагин
Kromasil CHI-TVB	Насадочная	Да	Политартрамид	Третбутилбензолил
SE-54	Капиллярная	Нет	Фенилметил-полисилоксан	—
Carbowax-20M	Капиллярная	Нет	Полиэтиленгликоль	—
Spherisorb-ODS2	Капиллярная	Нет	Привитой силикагель	—
SB-суанопропил-50	Капиллярная	Нет	Привитой силикагель	Цианопропил
Carcelpack C18	Капиллярная	Нет	Привитой силикагель	C ₁₈

3. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА

В качестве подвижной фазы используют сверхкритические NH_3 , N_2O , *n*-пентан, полностью и частично фторированные и хлорированные углеводороды. Но, как уже было отмечено, наиболее часто в качестве подвижной фазы в СФХ используют СК- CO_2 . Это можно объяснить рядом его особенностей:

- относительно низкими значениями критических температуры и давления CO_2 (критические температура и давление, а также плотность ряда флюидов, используемых в качестве подвижной фазы, приведены в таблице 2);
- низкой вязкостью ($9,3 \cdot 10^{-3}$ пз при 20°C), что позволяет проводить разделение при больших скоростях потока;
- легкостью осуществления декомпрессии;
- доступностью элюента с высокой степенью чистоты (99,995 %);
- низкой стоимостью;
- CO_2 не токсичен, не имеет запаха.

Зависимости высоты, эквивалентной высоте теоретической тарелки, от линейной скорости (кривая Ван-Деемтера) для ВЭЖХ и СФХ приведены на рис. 3. Из него видно, что кривая Ван-Деемтера в случае СФХ достигает минимума при меньших значениях *H* (по сравнению с ВЭЖХ) и более плавно изменяется в окрестностях минимума. Все это приводит к тому, что при одной и той же линейной скорости потока величина *H* в случае СФХ меньше. В то же время величина *H* в случае СФХ, равная минимальному значению *H* в случае ВЭЖХ, достигается при линейной скорости в несколько раз большей. Оптимальная скорость потока в случае СФХ в 2 — 3 раза больше, чем в случае ВЭЖХ.

На удерживание и селективность разделения анализируемых веществ в СФХ влияет ряд факторов, среди которых:

- давление;
- температура;
- скорость потока;
- природа неподвижной фазы;
- природа подвижной фазы;
- природа и концентрация модификатора и добавок.

Таблица 2

Критические температура, давление и плотность ряда веществ,
применяемых в качестве подвижной фазы в СФХ

Флюид	$T_c, ^\circ\text{C}$	$P_c, \text{МПа}$	Критическая плотность, г/см^3
CO_2	31,3	7,39	0,468
N_2O	36,5	7,27	0,457
NH_3	132,5	11,40	0,235
<i>n</i> -бутан	152,0	3,80	0,228
<i>n</i> -пентан	196,6	3,37	0,232
CCl_2F_2	111,8	4,12	0,558
CHF_3	25,9	4,75	0,526

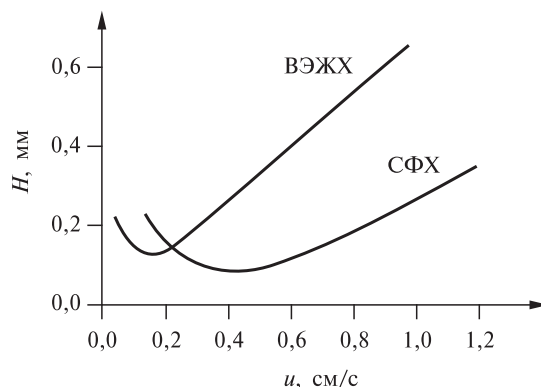


Рис. 3. Кривая Ван-Деемтера для СФХ и ВЭЖХ:

H — высота, эквивалентная теоретической тарелке, мм; u — линейная скорость, см/с

СК-СО₂ неполярен. В нем растворимы многие соединения с единственной полярной функциональной группой. Полифункциональные соединения обладают меньшей растворимостью, что накладывает ряд ограничений при использовании СК-СО₂ (невозможность или длительность разделения, сильное размывание веществ по колонке). Использование небольшого количества полярного органического растворителя в качестве модификатора позволяет преодолеть указанные ограничения.

Обычно в качестве модификатора используют метанол. В литературе встречаются статьи, в которых авторы используют в качестве модификатора метиламин, триэтиламин, воду, 2-пропанол, муравьиную кислоту, бутанол, ацетон и другие соединения.

Увеличение концентрации модификатора обычно приводит к снижению времени удерживания, однако при этом снижается и эффективность разделения [30]. В случае хиральной СФХ (по сравнению с ахиральной) изменение концентрации модификатора сильнее влияет на удерживание, форму пика и энантиоселективность. Особенно ярко это проявляется в случае использования наиболее популярных хиральных фаз на основе производных амилозы и целлюлозы, а также белковых сорбентов. Спираль полимера набухает соразтворителем и меняет конформацию, делая более или менее доступными хиральные центры в зависимости от типа и концентрации соразтворителя. В случае полисахаридных фаз этот фактор более значим для амилозы в силу геометрического строения спирали этого полимера. Так, неоднократно описаны случаи инверсии порядка выхода энантиомеров в СФХ при изменении типа и концентрации соразтворителя [31, 32].

4. ПРЕПАРАТИВНАЯ СФХ

По величине разделяемой пробы можно подразделить СФХ на аналитическую СФХ (разделение от микрограммов до миллиграммов), полупрепаративную СФХ (разделение от миллиграммов до десятков граммов), пилотные установки препаративной СФХ (разделение от сотен граммов до сотен килограммов), промышленную препаративную СФХ (разделение от сотен килограммов до тонн) [33]. Скорость потока подвижной фазы в приборах для аналитической СФХ составляет менее 20 мл/мин, для полупрепаративной СФХ — от 20 до 200 мл/мин. Обычно

полупрепаративную СФХ выполняют на набивных колонках с внутренним диаметром от 1 до 5 см и размером частиц 5 мкм.

Одна из наиболее трудоемких стадий производства фармацевтического препарата связана с очисткой действующего вещества. Схемы синтеза становятся все более и более сложными, и необходимы эффективные методы для быстрого выделения целевых соединений. Например, с целью экономии времени выгоднее провести синтез рацемической смеси и затем осуществить хроматографическое разделение энантиомеров, чем разработать способ энантиоселективного синтеза. В настоящее время для препаративного разделения в основном используют метод ВЭЖХ.

В случае метода СФХ существует ограничение на объем вводимой жидкой пробы, связанное с ее ограниченной растворимостью в СК флюиде. Ввод жидкой пробы осуществляют в поток модификатора или в поток модифицированного СК-СО₂. Ввод пробы в поток модифицированной подвижной фазы может приводить к размыванию пика выделяемого вещества, связанному с растворимостью жидкой фазы в СК флюиде. Ввод в поток модификатора снимает проблему ограниченной растворимости пробы, однако при низкой концентрации модификатора во флюиде этот подход увеличивает время, требуемое для ввода пробы, что также снижает эффективность разделения. По этим причинам предпочтительно использовать концентрированные растворы или проводить предварительное растворение образца в сверхкритическом флюиде.

Общая схема прибора для препаративной СФХ представлена на рис. 4. После неразрушающего детектирования очищенные фракции последовательно собираются в специальные ловушки, в которых происходит отделение веществ от элюента. После проведения очистки элюент можно снова использовать для разделения, при этом в схему включается процедура рецикла. Могут быть использованы on-line или off-line варианты рецикла. При этом время цикла определяется как время между двумя последовательными вводами. При использовании рецикла затраты на СО₂ значительно снижаются.

Для достижения высокой производительности необходимо проведение разделения больших количеств веществ. В этом случае хроматографические пики компонентов на выходе из колонки зачастую разрешены между собой не полностью. В связи с этим сбор фракций осуществляют, полагаясь лишь на время с момента ввода, что требует хорошей воспроизводимости формы хроматограммы (что может быть достигнуто только при строгом контроле температуры, давления и скорости потока подвижной фазы) [30].

Процедура сбора фракций представляет собой один из наиболее важных и сложных этапов очистки соединений методом СФХ. Теоретически переход флюида

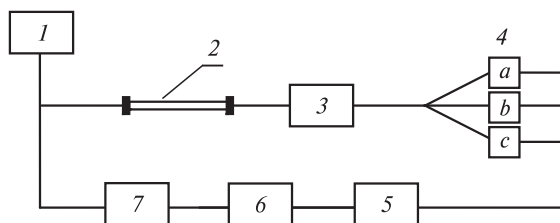


Рис. 4. Схема прибора для препаративной СФХ:

1 — ввод пробы; 2 — колонка; 3 — детектор; 4 — ловушки; 5 — очистка элюента; 6 — насос; 7 — регулятор температуры

в газообразное состояние должен приводить к отделению газообразной фазы (подвижная фаза — элюент) от жидкой или твердой фазы (образец). Однако при быстром переходе в газообразное состояние подвижная фаза уносит с собой часть образца [30]. В результате образования аэрозоля от 30 до 70 % целевого вещества может быть потеряно. Образование аэрозолей являлось одной из наиболее значимых проблем, длительное время препятствовавших массовому использованию полупрепаративной СФХ. Чтобы повысить степень извлечения целевого вещества из элюента, при сборе фракций необходимо избегать образования аэрозолей. В настоящее время для подавления их образования применяют специальные приемы.

Один из подходов к решению данной проблемы — использование охлаждаемых ловушек высокого давления. В таких охлаждаемых ловушках происходит улавливание одновременно как аналита, так и подвижной фазы. После этого давление постепенно уменьшают до атмосферного. Такой подход обеспечивает количественное извлечение твердых аналитов, а степень извлечения жидких составляет порядка 85 %.

Другой подход заключается в использовании ловушек низкого давления. В этом случае проводят адсорбцию компонентов на твердом сорбенте, что предполагает проведение последующей off-line десорбции очищенной фракции. Степень извлечения может достигать 90 %. Вместо сорбента можно использовать ловушки, заполненные органическим растворителем (степень извлечения в данном случае обычно не превышает 85 %). Использование для сбора фракций этанола, охлажденного сухим льдом, позволяет увеличить степень извлечения целевого вещества до 93 % [34].

Один из наиболее эффективных способов сбора фракций — отделение элюента путем центрифугирования в циклонном сепараторе. Эти крупногабаритные устройства обеспечивают управляемое испарение флюида. Давление внутри циклонного сепаратора устанавливается настолько низким (50 — 60 бар), чтобы происходило расслоение флюида на две фазы. Основная часть циклонного сепаратора — цилиндр большого диаметра, расположенный вертикально. Проба подается из регулятора давления в цилиндр по трубке. Цилиндр используется как камера расширения. Более тяжелые нелетучие компоненты попадают на боковую поверхность и «оседают» по направлению ко дну. Давление внутри цилиндра составляет 60 бар, поэтому наблюдается незначительное (в 10 — 20 раз) расширение, что позволяет минимизировать образование аэрозоля. Циклонные сепараторы могут эффективно использоваться в качестве устройства для сбора фракций в СФХ. Однако они непригодны для разделения большого числа различных образцов за короткое время. Степень извлечения может достигать 95 — 99 %. Для каждой фракции требуется отдельный циклонный сепаратор [35].

Сепаратор Бергера — относительно новое устройство, которое в значительной степени отличается от циклонных сепараторов. Оно позволяет проводить практически полное извлечение целевых соединений, исключая образование аэрозолей. Последнее достигается благодаря постепенному снижению давления. Модификатор и аналиты собираются на дне ловушки, а CO₂ переходит в газовую фазу и постепенно удаляется. Для успешной работы устройства должен быть осуществлен подвод относительно большого количества тепла для предотвращения охлаждения, связанного с расширением флюида, однако без достижения температуры, которая может привести к разложению термонестабильных веществ [35].

Еще одна проблема препаративной СФХ заключается в том, что клапан или рестриктор, устанавливаемый на выходе из колонки, легко забивается в связи с

Таблица 3

Сравнение методов обращенно-фазовой ВЭЖХ и СФХ при получении 100 г чистого энантиомера [35]

Обращенно-фазовая ВЭЖХ	СФХ
• 4 месяца (8-часовой рабочий день)	• 22 часа (3 рабочих дня)
• > 32000 долл. для покупки растворителей	• < 600 долл. для покупки растворителей
• суммарный объем фракций водно-ацетонитрильной смеси составил 1200 л	• суммарный объем фракций 10 — 20 л метанола

сильным понижением температуры (обусловленным адиабатическим расширением при переходе флюида в газообразное состояние).

В работе [33] авторы использовали лабораторную полупрепаративную и пилотную СФХ для отделения пиперонилбутоксидов от примесей, для отделения *транс*-изомера фитола от *цис*-изомера и от примесей и для отделения гвайфенезина от примесей. Авторам удалось выделить до 80 — 90 % целевого вещества с чистотой более 99 %. Было показано, что результаты, полученные на установке для лабораторной полупрепаративной СФХ, могут быть напрямую экстраполированы на пилотную установку. Выполненный авторами расчет производительности препаративной СФХ показал, что стоимость 1 кг очищенного вещества (при очистке 1 т вещества в год) может быть снижена в 1,5 раза по сравнению с наиболее распространенной препаративной ВЭЖХ.

Автор [35] приводит пример использования СФХ и ВЭЖХ для выделения 100 г чистого энантиомера (таблица 3). В случае обращенно-фазовой ВЭЖХ наблюдалась весьма низкая растворимость вещества (< 5 мг/мл), время удерживания составляло более 70 мин при ширине пиков обоих энантиомеров около 11 мин. В случае СФХ растворимость была более 100 мг/мл, а ширина пиков составляла 2 мин.

В работе [36] авторы использовали препаративную СФХ для разделения смеси (1 : 1) фенантрена и флуорена. Авторы использовали ловушки, заполненные жидким CO₂. После окончания разделения ловушки замораживали в жидком азоте и соединяли с атмосферой, при этом происходило медленное испарение подвижной фазы, обеспечивающее количественный сбор фракций.

Метод микропрепаративной СФХ был использован в работе [37] для фракционирования стероидных гормонов. Микропрепаративная СФХ выполнена для 4 — 9 мг вещества (скорость потока элюента составляла 4 мл/мин).

В работе [38] проведено фракционирование смеси поликарбоновых кислот (чистота собранных фракций доходила до 100 %). Сбор фракций осуществлялся с помощью ловушек, содержащих несколько миллилитров метанола, охлаждаемого сухим льдом.

5. СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕТОДОВ СФХ И ВЭЖХ

Метод СФХ требует применения более сложного (и, как следствие, более дорогого) оборудования по сравнению с ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы используют сверхкритический флюид, для получения которого требуется использование насосов высокого давления, аналогичных жидкостным, но снабженных системами охлаж-

дения головок поршней. Работа же в градиентном режиме предполагает использование двух таких насосов. Требуется специальное устройство, обеспечивающее высокое давление в системе (электронно-управляемый регулятор давления), которое отсутствует в ВЭЖХ. Кроме того, необходимо применение специальных ячеек детектора, устойчивых к высокому давлению. В случае ВЭЖХ можно осуществлять непосредственный сбор фракций, не требующий специальной аппаратуры. В свою очередь, в препаративной СФХ сбор фракций представляет особую сложность.

В работе [39] проведено сравнение возможностей методов СФХ/МС и ВЭЖХ/МС при анализе большой группы лекарственных веществ. 75 и 79 % исследуемых соединений были элюированы при использовании СФХ и ВЭЖХ соответственно. Количество соединений, определяемых только методом СФХ/МС, составило около 4 %; методом ВЭЖХ/МС — 8 % (в том числе фосфаты, фосфонаты и бифосфонаты). Из преимуществ СФХ/МС было отмечено меньшее загрязнение источника ионов ХИАД и меньшая ширина хроматографических пиков.

Можно выделить следующие преимущества СФХ по сравнению с ВЭЖХ:

- более низкая вязкость подвижной фазы в случае СФХ позволяет достигать более высоких скоростей потоков, что приводит к более быстрому разделению (разделение в 3—5 раз быстрее по сравнению с ВЭЖХ);

- скорость диффузии в СК флюидах является промежуточной между газами и жидкостями, поэтому размывание пиков в СФХ меньше, чем в ВЭЖХ;

- CO_2 безопасен для окружающей среды;

- возможность осуществления ВЭЖХ на оборудовании для СФХ (но не наоборот).

При сравнении препаративной СФХ и ВЭЖХ можно выделить дополнительные преимущества СФХ:

- в отличие от ВЭЖХ не требуется использование больших объемов органических растворителей и проведение их отгонки;

- CO_2 чище любого используемого в препаративной ВЭЖХ растворителя (при удалении растворителя содержащиеся в нем примеси концентрируются в выделенном веществе, загрязняя его);

- экономические преимущества наиболее заметны при работе с относительно большими количествами веществ;

- отсутствие необходимости удалять большое количество органических растворителей;

- более низкая цена CO_2 по сравнению с органическими растворителями;

- CO_2 после выделения (детектирования) целевого вещества может быть повторно использован;

- более высокая скорость потока определяет большую производительность СФХ;

- низкая вязкость сверхкритического флюида позволяет использовать одинаковый размер частиц как в аналитической, так и в препаративной СФХ и получать более узкие фракции (в препаративной ВЭЖХ необходимо использовать частицы большего размера, чтобы уменьшить давление).

6. ПРИМЕНЕНИЕ СФХ

6.1. Препаративная СФХ

В работе [40] рассмотрена возможность применения препаративной хиральной СФХ при получении новых лекарственных препаратов. Полупрепаративное СФХ разделение было проведено на колонках Chiralcel OJ и Chiralpak AD (250 × 20 мм).

Применение полупрепаративной СФХ обеспечивало быстрое выделение граммowych количеств чистого энантиомера для проведения дальнейших исследований.

В работе [41] было выполнено полупрепаративное разделение энантиомеров противоязвенного препарата омепразол на колонке Chiralpak AD (250 × 10 мм, размер частиц 10 мкм). Оптимизация разделения включала подбор модификатора (этанол и 2-пропанол), объема вводимой пробы и количества разделяемых веществ. Оптимальные условия хроматографического эксперимента обеспечивали разделение энантиомеров до базовой линии. Авторам удалось выделить энантиомеры чистотой выше 99,9 % (степень извлечения составила более 70 %).

Препаративное СФХ разделение четырех стереоизомеров β-метилфенилаланина на колонке Chiralpak AD-H (250 × 20 мм, размер частиц 5 мкм) проведено в работе [42]. Карбоксильная группа в β-метилфенилаланине была защищена метилированием. В качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, содержащий 15 % модификатора (50 : 50 MeOH/EtOH). Авторы провели очистку 3,4 г вещества за 6 часов (степень извлечения составила более 90 %).

В работе [43] авторы синтезировали рацемический нутлин. Разделение энантиомеров было проведено на колонке Chiralcel OD. Производительность системы составила 5 г смеси за 75 мин (при степени извлечения выше 92 %). Расчетная производительность составила 48 г каждого энантиомера в день, что при меньших экономических затратах превышало производительность ВЭЖХ в 3 раза.

Возможности метода препаративной СФХ для фракционирования СК флюидного экстракта розмарина продемонстрированы в работе [44]. Сбор фракций проводили при помощи циклонного сепаратора. Авторам путем оптимизации условий хроматографического разделения удалось собрать две фракции, в одной из которых главным образом содержались вещества, обладающие антиоксидантной и противомикробной активностью, а в другой — эфирные масла. Дальнейший анализ собранных фракций был проведен методами ВЭЖХ и ГХ. Кроме того, был проведен анализ на антиоксидантную и микробиологическую активность.

В работе [45] предложен способ препаративного СФХ разделения четырех полиметоксифлавонов, выделенных из апельсиновой кожуры. Препаративная СФХ была выполнена на колонке Daicel AD (250 × 30 мм, размер частиц сорбента 5 мкм).

Авторы работы [46] применили метод СФХ с рециклом подвижной фазы для разделения энантиомеров трех соединений, используемых при синтезе фармацевтических субстанций. В работе было проведено сравнение возможностей методов СФХ и ВЭЖХ. Препаративная СФХ была выполнена на колонке Chiralcel OD-H (250 × 30 мм, размер частиц 5 мкм).

Полупрепаративное разделение энантиомеров сульфоксида альбендазола проведено в работе [47]. Разделение было выполнено на колонке Chiralpak AD (250 × 10 мм). Авторы исследовали влияние объема вводимой пробы на степень очистки энантиомеров и на производительность системы. В случае энантиомера, элюирующегося первым, удалось добиться чистоты 99,9 % при степени извлечения 85 %. В случае второго энантиомера удалось добиться лишь чистоты 95 % при степени извлечения 59 %, что объясняется наложением «хвоста» первого пика.

В работе [48] метод полупрепаративной СФХ с масс-спектрометрическим детектированием (ионизация методом электрораспыления) был применен для очистки фармацевтических субстанций. Подвижная фаза представляла собой СК-СО₂, модифицированный метанолом.

Обзор работ по методу препаративной СФХ представлен в работе [49], где отмечены ее преимущества и ограничения, приведены примеры использования.

Среди ограничений метода авторы отмечают низкую растворимость полярных соединений в немодифицированном СК-СО₂ и, как следствие, необходимость использования органических модификаторов.

6.2. СФХ фармацевтических субстанций

В работе [50] метод СФХ использовали для разделения ибупрофена, хлорзоксазона и ацетаминофена. Авторы исследовали влияние давления, температуры и концентрации модификатора на времена удерживания исследуемых веществ. При увеличении температуры и давления заметное изменение времени удерживания (порядка нескольких минут) наблюдалось только для ацетаминофена. Оптимальные условия разделения: 7,8 МПа, 35 °С, при градиентном изменении концентрации модификатора (метанола) от 9,1 % до 14,3 % за 4 мин.

На примере 66 лекарственных препаратов авторы работы [51] рассмотрели возможность использования аналитической и препаративной СФХ. Разделение осуществляли на стандартных колонках для ВЭЖХ (силикагель с такими функциональными группами, как нитрильная, amino- и диольная, а также на C₁₈). При использовании в качестве подвижной фазы СК-СО₂, модифицированного метанолом, удалось элюировать большинство рассматриваемых соединений, за исключением сильных кислот и оснований (которые вообще не элюировались или размывались на колонке). Использование кислотных и/или основных добавок позволило преодолеть данное ограничение. В случае препаративной СФХ чистота собранной фракции достигала 99 % при эффективности сбора 90—95 %.

Сопоставление возможностей методов СФХ и ВЭЖХ было проведено в работе [52] на примере стереоизомеров ряда противогрибковых фармацевтических препаратов. Разделение было выполнено на колонке Chiralpak AD и Chiralcel OD. Авторы отмечают, что во многих случаях необходимая степень разделения не могла быть достигнута с помощью метода ВЭЖХ. Кроме того, времена удерживания в случае ВЭЖХ были более чем в 2 раза больше по сравнению с методом СФХ.

В работе [53] также проведено сопоставление методов СФХ и ВЭЖХ (при использовании в качестве модельного соединения цикланделата). Разделение проводили на различных неподвижных фазах (C₁₈, C₈, силикагель с нитрильными и фенильными группами). Авторы отмечают, что СФХ обеспечивает такую же чувствительность и воспроизводимость, как и ВЭЖХ, а разделение достигается за более короткое время.

СФХ разделение энантимеров бифоназола рассмотрено в работе [54]. Авторам удалось добиться коэффициента разделения энантимеров, равного 5, для всех используемых в работе модификаторов (этанол, 2-пропанол и ацетонитрил).

В работе [55] было проведено хиральное разделение стереоизомеров четырех противогрибковых препаратов на колонке Chiralpak AD. В качестве модификаторов подвижной фазы использовали метанол, этанол, 2-пропанол и ацетонитрил. В случае эконазола, миконазола и сулконазола время удерживания составило менее 10 мин, в случае итраконазола — около 80 мин. Разделение всех четырех стереоизомеров итраконазола было достигнуто лишь при использовании в качестве модификатора смеси этанола и 2-пропанола.

Разделение метопролола и родственных соединений методом СФХ проведено в работе [56]. Разделение проводили на колонках с силикагелем с аминопиррильными и этилпиридилными группами, используя в качестве подвижной фазы СК-СО₂, модифицированный метанолом. Авторы провели оптимизацию условий разделения исследуемых соединений.

Разделение метопролола и родственных аминоспиртов было осуществлено методом ион-парной СФХ на колонке с силикагелем с диольными группами [57]. В работе показана возможность управления удерживанием метопролола и родственных соединений путем добавления сильной кислоты (трифторуксусной или этансульфоновой кислоты) и триэтиламина в модифицированный метанолом СК-СО₂.

В работе [58] проведен анализ клозапина, ондансетрона, толбутамида и примидона методом СФХ/МС/МС (здесь и далее обозначение «МС/МС» означает использование tandemной масс-спектрометрии в качестве метода детектирования). Ионизацию осуществляли методом ХИАД. Авторы исследовали влияние скорости потока, состава подвижной фазы и температуры распылителя на эффективность ионизации при работе в режиме регистрации положительных ионов.

Определение цитарабина в плазме крови мышей методом СФХ/МС/МС проведено в работе [59]. Условия хроматографического разделения обеспечивали отделение цитарабина от эндогенных соединений, содержащихся в плазме. Элюирование осуществляли в изократическом режиме, в качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, модифицированный метанолом с добавками ацетата аммония. Ионизацию осуществляли методом ХИАД. Авторами было обнаружено, что скорость потока и состав подвижной фазы существенно влияют на эффективность ионизации. Результаты, полученные методом СФХ/МС/МС, были подтверждены методом ВЭЖХ/МС/МС.

В работе [60] метод СФХ/МС/МС использовали для определения энантиомеров варфарина в плазме крови. Ионизацию осуществляли методом ХИАД. Авторы отмечают преимущество СФХ/МС/МС по сравнению с ВЭЖХ/МС/МС.

СФХ/МС/МС определение энантиомеров пропранолола и пиндолола в плазме крови мышей проведено в работе [61]. Ионизацию проводили методом ХИАД. Авторы рассмотрели влияние скорости потока, состава подвижной фазы и температуры распылителя на эффективность ионизации модельных веществ. Разделение проводили на колонке Chiralcel OD-H. Результаты исследования были применены для изучения фармакокинетики.

В работе [62] проведено исследование возможности разделения энантиомеров противоязвенных лекарственных средств (омепразола, лансопразола, рабепразола и пантопразола) на колонке Chiralpak AD методами СФХ и ВЭЖХ. Было обнаружено, что методом ВЭЖХ могут быть разделены энантиомеры только двух веществ. В то же время метод СФХ позволил провести более эффективное и селективное разделение энантиомеров всех исследуемых соединений (время анализа в случае СФХ было в среднем на 10 мин меньше).

В работе [63] предложен подход, позволяющий проводить подбор оптимальных условий разделения энантиомеров фармацевтических веществ. Процедура оптимизации заключалась в выборе неподвижной фазы (Chiralpak AD и AS, Chiralcel OD и OJ) органического модификатора (метанол и 2-пропанол) и динамических модификаторов.

Разделение энантиомеров напроксена методом изократической СФХ проведено в работе [64]. Авторы использовали колонку Kromasil CHI-TBV. Оптимизацию условий хроматографирования проводили путем варьирования температуры, давления и концентрации органического модификатора (2-пропанол).

В работе [65] авторы показали возможность прямого ввода водного раствора изосорбида-5-мононитрата в СФХ хроматограф. В качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, модифицированный 2-пропанолом (20 %). Разделение про-

водили на силикагеле с диольными группами. Относительное стандартное отклонение ($n = 8$) высоты хроматографического пика составило около 2 %.

Отделение бромсульфона от примесей и продуктов разложения проведено в работе [66]. Авторами было обнаружено, что при анализе методом обращенно-фазовой ВЭЖХ бромсульфон подвергается разложению в колонке. В свою очередь метод СФХ позволил избежать разложения целевого компонента. Хроматографическое разделение бромсульфона и семи содержащихся в нем примесей было выполнено за несколько минут. Оптимизация условий хроматографирования включала выбор неподвижной фазы (силикагель и силикагель с такими функциональными группами, как нитрильная и фенильная), органического модификатора (ацетонитрил, смесь дихлорметана и ацетонитрила, метанол и 2-пропанол), температуры и давления.

В работе [67] авторы использовали метод СФХ/МС для разделения энантиомеров большого числа фармацевтических препаратов. Ионизацию осуществляли методом электрораспыления. В работе использовали ряд неподвижных хиральных фаз (Chiralpak AD, Chiralcel OD и OJ) и варьировали условия разделения (температура, давление).

Разделение энантиомеров сульфоксида альбендазола проведено в работе [68]. Авторы использовали две полисахаридные неподвижные фазы (Chiralpak AD и Chiralcel OD) и ряд модификаторов СК-СО₂ (метанол, этанол, 2-пропанол и ацетонитрил). Наилучшие результаты на колонке Chiralpak AD были получены при работе с 2-пропанолом, на колонке Chiralcel OD — при работе с метанолом. Использование ацетонитрила не позволило элюировать энантиомеры из колонки.

В работе [69] применен метод СФХ для одновременного анализа клеvidипина и родственных соединений. В работе использовали модифицированный метанолом СК-СО₂. При проведении хроматографирования в градиентном режиме авторам удалось отделить целевой компонент от большинства соединений со сходной химической структурой. Для получения узких пиков использовали добавку лимонной кислоты.

Метод СФХ с УФ-детектированием был использован в работе [70] для анализа толнафтата и содержащихся в нем примесей. Авторами отмечено, что при использовании немодифицированного СК-СО₂ можно элюировать толнафтат, однако не наблюдается полного разделения пиков примесей. Соединения были разделены на колонке C₁₈ с использованием метанола в качестве модификатора.

В работе [71] авторы использовали метод СФХ для определения сульфадоксина в плазме крови. Экстракцию из плазмы крови проводили дихлорметаном (степень извлечения составила 95 %). Разделение веществ осуществляли на колонке C₁₈, в качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, модифицированный метанолом.

Анализ сульфаниламидных препаратов методом СФХ/МС проведен в работе [72]. Ионизацию осуществляли методом ХИАД. Масс-спектры всех исследуемых соединений содержали ион [M+H]⁺. Повышение напряжения коронного разряда приводило к большей фрагментации, что было использовано при идентификации соединений. Оптимизированные авторами условия анализа были использованы для определения сульфаниламидов в молоке.

В работе [73] провели сравнение возможностей методов СФХ, обращенно-фазовой ВЭЖХ, нормально-фазовой ВЭЖХ на примере энантиоселективного разделения ряда лекарственных препаратов кислотной и основной природы. В случае СФХ разделение проводили на колонке с силикагелем, покрытым ванкомицином.

Разделение стереоизомеров кетоконазола и итраконазола методами СФХ и ВЭЖХ проведено в работе [74]. В случае метода СФХ исследовано влияние давления, температуры, природы и концентрации органического модификатора на разделение. Разделение проводили на колонках Chiralcel OD и Chiralpak AS. В работе показаны преимущества метода СФХ по сравнению с ВЭЖХ для разделения исследуемых противогрибковых лекарственных средств.

В работе [75] проведено разделение энантиомеров ряда диоксолановых соединений (кетоконазола и родственных соединений) методом СФХ. В работе использовали два вида полисахаридных неподвижных фаз (Chiralpak AD и Chiralcel OD). Было исследовано влияние различных органических модификаторов и давления на параметры хроматографического разделения. Использование в качестве модификаторов спиртов более предпочтительно по сравнению с ацетонитрилом.

В работе [76] рассмотрена возможность использования метода СФХ для разделения энантиомеров ибупрофена. Было исследовано 11 различных неподвижных фаз. Авторы изучили влияние на результаты анализа модификатора (2-пропанол, этанол и этилацетат), температуры, давления и плотности СК флюида. Наилучшее разделение было достигнуто при использовании неподвижной фазы Kromasil CNH-TBV.

В работе [77] был применен метод СФХ для анализа четырех миорелаксантов (хлорзоксазона, метокарбамола, тизанидина и баклофена). В качестве внутреннего стандарта использовали гвайфенезин. Была проведена оптимизация температуры, давления и концентрации органического модификатора. Для элюирования использовали СК-СО₂, модифицированный метанолом, содержащим 2 % уксусной кислоты. Без использования добавки уксусной кислоты авторы не смогли элюировать тизанидин и баклофен из колонки; при добавлении кислоты были получены симметричные пики.

Одновременное определение ряда антиконвульсивных средств (фенобарбитона, фенитоина, нитразепама, клоназепама, карбамазепина и примидона) проведено в работе [78]. Для разделения использовали колонку C₁₈. В качестве внутреннего стандарта был выбран ибупрофен. Авторы исследовали влияние давления, температуры, концентрации модификатора (метанола) и скорости потока СК-СО₂ на удерживание и селективность. Авторы отмечают, что использование немодифицированного СК-СО₂ не позволило провести элюирование веществ из колонки. После оптимизации условий разделения время анализа не превышало 8 мин.

В работе [79] использован метод СФХ для определения метопролола и родственных соединений. Разделение проводили на силикагеле, содержащем диольные функциональные группы. В качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, модифицированный метанолом, содержащим добавки уксусной кислоты и триэтиламина. При сравнении с ВЭЖХ метод СФХ показал более высокую селективность. Время анализа составило менее 12 мин.

В работе [80] методы СК флюидной экстракции и СФХ были объединены *on-line* с целью осуществления быстрого извлечения и разделения α -, β -, γ -, δ -токоферолов. В качестве подвижной фазы авторы использовали СК-СО₂. Разделение проводили на микронасадочных колонках. Авторы рассмотрели ряд неподвижных фаз — SE-54 (5 % фенил, 95 % метилсилоксан), Carbowax 20M (полиэтиленгликоль), которые в ходе подготовки колонок перед проведением разделений наносились на основу из силикагеля Spherisorb ODS-2 с химически привитыми группами C₁₈. Было показано, что геометрические размеры используемых колонок, размер частиц сорбента и количество наносимой неподвижной фазы оказывают

существенное влияние на селективность и эффективность разделения. В случае фазы Carbowax 20M наблюдался оптимум концентрации сорбированной неподвижной фазы на носителе около 10 %. При дальнейшем увеличении его содержания эффективность разделения токоферолов начинала падать вследствие избыточного роста сопротивления массопереносу аналита между подвижной и неподвижной фазами при выбранной скорости потока [80].

Исследование механизма разделения оптических изомеров *цис*- и *транс*-дилтиазама проведено в работе [81]. В качестве неподвижной фазы использовали сорбент на основе целлюлозы. Было подробно изучено влияние температуры на разделение энантиомеров. Установлены различия в механизме разделения энантиомеров в случае *цис*- и *транс*-дилтиазама.

В работе [82] проведено разделение салбутамола и шести родственных соединений методом СФХ. Авторы исследовали влияние температуры, давления и концентрации полярных добавок (*n*-пропиламина, диметиламина и *n*-бутиламина) на удерживание анализируемых соединений. Разделение осуществляли на силикагеле и силикагеле с такими функциональными группами, как нитрильная и диольная. Наилучшие результаты были получены на силикагеле с диольными группами при работе в градиентном режиме изменения концентрации модификатора (метанол, содержащий 0,5 % *n*-пропиламина). Время анализа составило менее 14 мин.

Паклитаксел и пять родственных соединений были проанализированы методом СФХ [83]. Разделение проводили на колонках C₁₈, C₈, а также на силикагеле, содержащем фенильные, нитрильные и диольные группы. В качестве подвижной фазы использовали чистый и модифицированный метанолом СК-СО₂. Оптимизированные на примере шести соединений условия разделения были применены для отделения паклитаксела от 16 примесей и продуктов разложения. Время анализа в случае СФХ было в два раза меньше по сравнению с методом ВЭЖХ.

В работе [84] проведено определение лекарственного средства, в молекуле которого содержится фрагмент дигидропиридина. Ввод пробы осуществляли в виде эмульсии. Оптимизацию условий хроматографирования проводили, варьируя скорость потока подвижной фазы, температуру, давление и концентрацию органического модификатора (метанол и 2-пропанол) в СК-СО₂. Наибольшее влияние на степень разделения оказывала скорость потока подвижной фазы и концентрация полярного модификатора.

В работе [85] использован метод СФХ для разделения энантиомеров при поиске новых лекарственных средств. Разделение проводили на неподвижных фазах полисахаридного типа Chiralpak AD, Chiralpak AS, Chiralcel OD и Chiralcel OJ.

Разделение энантиомеров нескольких сульфоксидов (относящихся к классу замещенных бензимидазолов) рассмотрено в работе [86]. Для разделения использовали неподвижную фазу Chiralpak AD, а в качестве подвижной фазы — СК-СО₂, модифицированный метанолом, этанолом и 2-пропанолом. Авторам удалось добиться коэффициента разделения хроматографических пиков больше 2 при времени анализа меньше 10 мин. В случае использования 2-пропанола в качестве модификатора наблюдали обратный порядок выхода энантиомеров омепразола (по сравнению с подвижной фазой, модифицированной метанолом и этанолом).

В работе [87] применен метод СФХ/МС (ионизация методом ХИАД) для регистрации состава реакционной смеси, полученной в результате проведения трехстадийного стереоселективного синтеза. Объединение колонок с хиральной (Chiralcel OD-H или Chiralcel AD-H) и ахиральной неподвижными фазами (Phenomenex LUNA C₁₈) позволило улучшить ограниченную ахиральную селективность коло-

нок с хиральными неподвижными фазами. Авторами показана возможность разделения как энантиомеров, так и диастереомеров.

СФХ разделение энантиомеров 1-фенил-1-пропанола осуществлено в работе [88]. В качестве подвижной фазы использовали смесь СК-СО₂ и метанола. Разделение было выполнено на колонке Chiralcel OD. Исследование проводилось в условиях нелинейной изотермы адсорбции. Рассмотрено влияние состава подвижной фазы и давления на адсорбцию.

В работе [89] проведено разделение энантиомеров 24 соединений, родственных дигидрофурукумарину. Исследованы три различные хиральные неподвижные фазы на основе макроциклических гликопептидов. Авторы использовали изократическое элюирование при температуре 31 °С и давлении 100 бар. В качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, концентрацию модификатора (метанол) варьировали в диапазоне от 2 до 25 %. Авторы отмечают, что одно из наиболее значимых преимуществ СФХ — возможность проведения быстрого разделения (большинство разделений было проведено менее чем за 10 мин). Исследование показало, что наилучшей энантиоселективностью обладает колонка Chirobiotic T, на которой удалось разделить энантиомеры 21 соединения. На колонках Chirobiotic TAG и Chirobiotic R удалось разделить энантиомеры 16 и 15 соединений соответственно.

Разделение энантиомеров тиазолбензилсульфонамида на колонке Chiralpak AD методом СФХ проведено в работе [90]. Авторами исследовано влияние концентрации органического модификатора и температуры на разделение.

В работе [91] исследована взаимосвязь между структурой родственных соединений ряда фенилпропанолов и условиями разделения. Разделение проводили на колонках Chiralcel OD и Chiralcel OB с твердым носителем на основе целлюлозы. Исследовано влияние температуры, давления и концентрации органического модификатора на разделение.

6.3. СФХ биологически важных веществ

Влияние различных параметров на разделение модельной смеси эстрогенов исследовано в работе [92]. Авторы варьировали скорость подвижной фазы, тип и концентрацию органического модификатора (метанол, этанол, 2-пропанол, ацетонитрил) и используемой неподвижной фазы. Авторы рассмотрели возможность последовательного соединения нескольких колонок с разными сорбентами (силикагель с пропилнитрильными или диольными группами). Было показано, что оптимальным для разделения всех девяти компонентов анализируемой смеси является сочетание цианопропильного и диольного сорбентов в соотношении 50 : 50. Последовательность сочленения колонок не оказывала воздействия на результат. Увеличение скорости изменения концентрации соразтворителя, с одной стороны, позволяло добиться резкого сокращения суммарного времени элюирования, но с другой — приводило к заметному ухудшению разделения. Компромиссным решением оказался градиент по содержанию метанола со скоростью изменения 2 % в минуту.

В работе [93] проведен анализ 15 метаболитов эстрогенов методом СФХ/МС/МС. В работе осуществляли градиентное элюирование, изменяя концентрацию модификатора (метанол) в СК-СО₂ от 0 до 30 %. Разделение анализируемых веществ проводили на колонке с силикагелем с пропилнитрильными группами (150 × 2,1 мм, размер частиц 5 мкм). Используемые условия хроматографического анализа обеспечивали разделение аналитов менее чем за 15 мин. Ионизацию осуществляли

методом ХИАД. Использование СФХ позволило сократить время анализа в 7 раз по сравнению с ВЭЖХ.

Фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин были разделены методом СФХ с детектором по светорассеянию и масс-спектрометрическим детектором (ХИАД) [94]. Исследовали четыре различных неподвижных фазы (силикагель с диольными, пропилнитрильными, 2-этилпиридильными и 4-этилпиридильными группами).

В работе [95] проведен анализ простагландинов методом капиллярной СФХ. Простагландины определяли в виде производных, проводя предварительно реакцию с диметилтиофосфинхлоридом. Такой прием, заключающийся в обратимом присоединении некоего реагента к анализам, применяют с целью улучшения их хроматографического поведения в сочетании с последующим расщеплением при необходимости образованных аддуктов после проведения разделения. Регистрацию анализов осуществляли с помощью термоионного детектора, обладающего высокой чувствительностью и селективностью по отношению к фосфорсодержащим соединениям. Разделение проводили на колонке SB-суанорпорул-50 (10 м × 0,05 мм × 0,15 мкм). В качестве подвижной фазы использовали СК-N₂O.

6.4. СФХ-МС

В работе [96] проводили анализ экстракта из тимьяна (*Thymus vulgaris L.*) методом СФХ/МС. Разделение осуществляли на капиллярной колонке SB-Methyl-100 (10 м × 50 мкм × 0,25 мкм). Электронную ионизацию проводили при энергии электронов 70 эВ. Для идентификации соединений использовали библиотеку масс-спектров. Высокая интенсивность пика со значением $m/z = 44$ (молекулярный ион CO₂) ограничивала нижнюю границу регистрируемого диапазона масс.

Исследование примесей в препарате от малярии (примахин) методом СФХ и СФХ/МС проведено в [97]. Разделение проводили на колонке с силикагелем с этилпиридильными группами (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм) в градиентном режиме, изменяя концентрацию модификатора (этанол, содержащий 0,4 % диэтиламина) от 5 % до 25 %. Использовали УФ-детектор и МС-детектор (ионизация методом электрораспыления).

Анализ β-агонистов методом СФХ проведен в работе [98]. Разделение осуществляли на силикагеле, содержащем нитрильные группы (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали СК-CO₂, модифицированный метанолом (20 %). В качестве динамических добавок использовали триэтиламин и трифторуксусную кислоту. Показано, что наилучшее разделение достигается при одновременном использовании обеих добавок. Регистрацию осуществляли с помощью УФ-детектора и МС-детектора (ХИАД).

В работе [99] исследовали полярные примеси, содержащиеся в машинной смазке. При анализе объектов, содержащих большое число разнообразных примесей, полное разделение компонентов осуществить невозможно, поэтому задача не может быть решена с использованием ПИД или УФ-детектора. Поэтому в работе детектирование проводили методом МС (ХИАД). Разделение было выполнено на Carcell Pak C₁₈ (250 × 4,6 мм, размер частиц 5 мкм). Авторы отмечали влияние различных модификаторов (MeOH, CH₂Cl₂, ацетонитрил) и добавок на вид масс-спектра.

Оптимизация способа сочетания СФХ/МС проведена в работе [100]. Авторы использовали модельную смесь, содержащую соединения, обладающие различным сродством к протону (нитробензол, азобензол, 1-нафтилизотиоцианат, 1-нафтали-

нонитрил, дифениламин и фторфенилсульфон). Ионизацию осуществляли методом ХИАД. Авторами проведено исследование влияния внутреннего диаметра и длины соединительной линии и входного капилляра на форму пика и время удерживания исследуемых соединений. Показано, что изменение размеров соединительной линии, так же как и ее температуры, не позволяет значительно уменьшить ширину хроматографических пиков при ионизации методом ХИАД. В свою очередь внутренний диаметр входного капилляра оказывает значительное влияние на профиль хроматографического пика. Было показано, что оптимальный диаметр капилляра составляет 75 мкм.

В работе [101] авторы проводили анализ андростенона методом СФХ/МС в свином жире без предварительной очистки. Показано, что метод ХИАД не приводит к значительной фрагментации ионов. Наиболее интенсивный ион в масс-спектре — ион $[M + H]^+$, помимо которого могут присутствовать ионы $[M + H - H_2O]^+$ и $[M + 33]^+$ (последний предположительно является кластерным ионом аналита и метанола).

6.5. Другие области применения

В работе [102] рассмотрена возможность использования данных, полученных с помощью СФХ, в методе имитированной дистилляции (используемом в нефтеперерабатывающей промышленности). Метод капиллярной СФХ рассматривается авторами как альтернатива ГХ и применяется для разделения тяжелых углеводов (с числом атомов углерода в молекуле до 126).

Авторы работы [103] использовали метод СФХ с микронасадочными колонками для разделения метиловых эфиров жирных кислот. Для регистрации использовали УФ-детектор при длине волны 206 нм.

Возможность применения СФХ для группового разделения нефтяных фракций и анализа методом имитированной дистилляции рассмотрена в работе [104]. По сравнению с ГХ, СФХ позволяет расширить число анализируемых углеводов вплоть до C_{140} . Метод СФХ позволяет проводить быстрое разделение ароматических и неароматических фракций. Одновременное использование УФ-детектора и ПИД расширяет возможности метода СФХ.

В работе [105] авторы использовали метод полупрепаративной СФХ для фракционирования экстракта, полученного из масла полыни. В работе был исследован ряд неподвижных фаз, но наилучшее разделение наблюдалось при использовании колонки с силикагелем с этилпиридилными группами (250×10 мм, диаметр частиц 5 мкм). Было собрано 3 фракции, и после соответствующей пробоподготовки они были проанализированы методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

Сверхкритический экстракт из розмарина был проанализирован в работе [106] методом СФХ с микронасадочными колонками (неподвижная фаза SE-54 или Carbowax 20M). Разделение полярных соединений было проведено при использовании немодифицированного СК- CO_2 .

В работе [107] проведено определение полифенолов в сверхкритическом экстракте из винограда методом СФХ. Авторы использовали модифицированный метанолом (1 %) СК- CO_2 с добавками лимонной кислоты в качестве подвижной фазы.

Авторы работы [108] использовали методы капиллярного электрофореза и СФХ для определения метаболитов стирола (фенилглиоксиловой и миндальной кислоты) в моче. Авторы не проводили очистку образцов мочи и осуществляли прямой ввод мочи, разбавленной в 10 раз ацетонитрилом. В случае СФХ в качестве

неподвижной фазы использовали силикагель, содержащий диольные группы, а в качестве подвижной фазы использовали СК-СО₂, модифицированный смесью этанола, воды и метансульфоновой кислоты (97,5 : 2,4 : 0,1). Результаты количественного определения, полученные с помощью указанных методов, хорошо согласуются между собой.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время наиболее часто применяют метод СФХ с набивными колонками, используя в качестве подвижной фазы СК-СО₂ с добавками модификаторов. В качестве модификатора в основном применяют спирты. Ахиральное разделение осуществляют при использовании колонок с сорбентами, применяемыми как в нормально-фазовой, так и в обращенно-фазовой ВЭЖХ. При проведении хиральных разделений большинство авторов отдает предпочтение сорбентам на основе полисахаридов.

Современный вариант СФХ обладает рядом преимуществ по сравнению с наиболее часто используемым методом ВЭЖХ. Среди них возможность осуществления более быстрого разделения, снижение количеств используемых органических растворителей, высокая чистота СО₂ (по сравнению с наиболее чистыми органическими растворителями) и безопасность диоксида углерода для окружающей среды. Эти преимущества особенно ценны в случае препаративной СФХ, которая по своей производительности и экономической эффективности существенно превосходит препаративную ВЭЖХ. Препаративная СФХ позволяет получать более чистые вещества по сравнению с ВЭЖХ за счет исключения воды из элюента и минимизации содержания органического растворителя.

Необходимо отметить перспективность использования в аналитической СФХ микронасадочных колонок, которым уделяется мало внимания. При их использовании возможно значительное увеличение эффективности разделения по сравнению с набивными колонками и проведение СФХ/МС с электронной и химической ионизацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A.* J. Org. Chem. 1962. Vol. 27. P. 700.
2. *Giddings J.C., Myers M.N., McLaren L., Keller R.A.* Science. 1968. Vol. 162. P. 67.
3. *Chester T.L., Pinkston J.D.* Anal. Chem. 2004. Vol. 76. P. 4606.
4. *Henry M.C., Yonker C.R.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 3909.
5. *Taylor L.T.* Anal. Chem. 2008. Vol. 80. P. 4285.
6. *Bally R.W., Cramers C.A.* J. High Resol. Chromatogr. 1986. Vol. 9. P. 626.
7. *Köhler J., Rose A., Schomburg G.* J. High Resol. Chromatogr. 1988. Vol. 11. P. 191.
8. *Smith R.D., Fulton J.L., Petersen R.C., Kopriva A.J., Wright B.W.* Anal. Chem. 1986. Vol. 58. P. 2057.
9. *Berger T.* J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 3.
10. *Taylor L.T.* J. Supercrit. Fluids. 2009. Vol. 47. P. 566.
11. *Combs M., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T.* J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 85.
12. *Arpino P., Haas P.* J. Chromatogr. A. 1995. Vol. 703. P. 479.
13. *Albert K.* J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 65.
14. *Albert K., Braumann U., Tseng L., Nicholson G., Bayer E., Spraul M., Hofmann M., Dowle C., Chippendale M.* Anal. Chem. 1994. Vol. 66. P. 3042.
15. *Albert K., Braumann U., Streck R., Spraul M., Ecker R.* Fresenius J. Anal. Chem. 1995. Vol. 352. P. 521.

16. Braumann U., Handel H., Strohschein S., Spraul M., Krack G., Ecker R., Albert K. J. *Chromatogr. A*. 1997. Vol. 761. P. 336.
17. Berger T., Wilson W.H. *Anal. Chem.* 1993. Vol. 65. P. 1451.
18. Denet F., Hauck W., Nicoud R.M., Di Giovanni O., Mazzotti M., Jaubert J.N., Morbidelli M. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001. Vol. 40. P. 4603.
19. Zhang Y., Dai J., Wang-Iverson D.B., Tymiak A.A. *Chirality*. 2007. Vol. 19. P. 683.
20. Lesellier E. *J. Sep. Sci.* 2008. Vol. 31. P. 1238.
21. Patel M.A., Riley F., Wang J., Lovdahl M., Taylor L.T. *J. Chromatogr. A*. 2011. Vol. 1218. P. 2593.
22. Zheng J., Taylor L.T., Pinkston J.D., Mangels M.L. *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1082. P. 220.
23. Phinney K.W., Stringham R.W. In: *Chiral separation techniques: a practical approach*. 3rd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. P. 135.
24. Parcher J.F., Chester T.L. In: *ACS Symposium Series*. Vol. 748. Washington, 1999. P. 1.
25. Terfloth G. *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 906. P. 301.
26. Phinney K.W., Sander L.C., Wise S.A. *Anal. Chem.* 1998. Vol. 70. P. 2331.
27. Salvador A., Herbretau B., Dreux M. *Chromatographia*. 2000. Vol. 53. P. 207.
28. Mangelings D., Vander Heyden Y.J. *J. Sep. Sci.* 2008. Vol. 31. P. 1252.
29. White C. *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1074. P. 163.
30. Medvedovici A., Sandra P., Toribio L., David F. *J. Chromatogr. A*. 1997. Vol. 785. P. 159.
31. Karlsson A., Nyström A. *Chromatographia*. 2000. Vol. 53. P. 135.
32. Gyllenhaal O., Stefansson M. *Chirality*. 2005. Vol. 17. P. 257.
33. Jusforgues P., Shaimi M., Barth D. In: *Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns*. New York: M. Dekker, 1998. P. 403.
34. Whatley J. *J. Chromatogr. A*. 1995. Vol. 697. P. 251.
35. Berger T. In: *Supercritical fluid technology for drug product development*. New York: M. Dekker, 2004. P. 497.
36. Bartle K., Bevan C., Clifford A., Jafar S., Malak N., Verrall M. *J. Chromatogr. A*. 1995. Vol. 697. P. 579.
37. Hanson M. *Chromatographia*. 1995. Vol. 40. P. 139.
38. Heaton D., Bartle K., Myers P., Clifford A. *J. Chromatogr. A*. 1996. Vol. 753. P. 306.
39. Pinkston J.D., Wen D., Morand K.L., Tirey D.A., Stanton D.T. *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78. P. 7467.
40. Leonard W.R., Henderson D.W., Miller R.A., Spencer G.A., Sudah O.S., Biba M., Welch C.J. *Chirality*. 2007. Vol. 19. P. 693.
41. Toribio L., Alonso C., del Nozal M., Bernal J., Martin M. *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1137. P. 30.
42. Nogle L., Mann C., Wattsyr W., Zhang Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. Vol. 40. P. 901.
43. Wang Z., Jonca M., Lambros T., Ferguson S., Goodnow R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. Vol. 45. P. 720.
44. Ramirez P., Garcia-Risco M., Santoyo S., Senorans F., Ibanez E., Reglero G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006. Vol. 41. P. 1606.
45. Li S., Lambros T., Wang Z., Goodnow R., Ho C. *J. Chromatogr. B*. 2007. Vol. 846. P. 291.
46. Yan T.Q., Orihuela C. *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1156. P. 220—227.
47. Toribio L., del Nozal M., Bernal J.L., Nieto E.M. *J. Chromatogr. A*. 2003. Vol. 1011. P. 155.
48. Wang T., Barber M., Hardt I., Kassel D.B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001. Vol. 15. P. 2067—2075.
49. Jusforgues P., Shaimi M. *Analysis*. 1998. Vol. 26. P. 55.
50. Bari V., Dhorda U.J., Sundaresan M. *Talanta*. 1997. Vol. 45. P. 297.
51. Berger T., Fogleman K., Staats T., Bente P., Crockett I., Farrell W., Osonubi M. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2000. Vol. 43. P. 87.
52. Bernal J.L., Toribio L., del Nozal M.J., Nieto E.M., Montequi M.I. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2002. Vol. 54. P. 245.
53. Bhoir I.C., Raman B., Sundaresan M., Bhagwat A.M. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998. Vol. 361. P. 86.
54. Toribio L., del Nozal M.J., Bernal J.L., Alonso C., Jiménez J.J. *J. Sep. Sci.* 2006. Vol. 29. P. 1373.
55. Toribio L., del Nozal M., Bernal J., Alonso C., Jiménez J.J. *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1144. P. 255.
56. Lundgren J., Salomonsson J., Gyllenhaal O., Johansson E. *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1154. P. 360.
57. Gyllenhaal O., Edstrom L., Persson B. *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1134. P. 305.

58. Hsieh Y., Favreau L., Schwerdt J., Cheng K.C. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. Vol. 40. P. 799.
59. Hsieh Y., Li F., Duncan C.J.G. Anal. Chem. 2007. Vol. 79. P. 3856.
60. Coe R., Rathe J., Lee J. J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. Vol. 42. P. 573.
61. Chen J., Hsieh Y., Cook J., Morrison R., Korfmacher W.A. Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 1212.
62. Toribio L., del Nozal M., Bernal J., Alonso C., Jiménez J.J. J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1091. P. 118.
63. Maftouh M., Granierloyaux C., Chavana E., Marini J., Pradines A., Heyden Y., Picard C. J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1088. P. 67.
64. Yang Y., Su B., Yan Q., Ren Q. J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. Vol. 39. P. 815.
65. Gyllenhaal O., Hulthe J. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. Vol. 29. P. 381.
66. Xu J., Thompson R., Li B., Ge Z. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2002. Vol. 25. P. 1007.
67. Garzotti M., Hamdan M. J. Chromatogr. B. 2002. Vol. 770. P. 53.
68. Del Nozal M.J., Toribio L., Bernal J.L., Nieto E.M., Jiménez J.J. J. Biochem. Biophys. Methods. 2002. Vol. 54. P. 339.
69. Gyllenhaal O., Karlsson A., Vessman J. J. Chromatogr. A. 1999. Vol. 862. P. 95.
70. Patil S.T., Bhoir I.C., Bhagwat A.M., Sundaresan M. Fresenius J. Anal. Chem. 2000. Vol. 367. P. 91.
71. Bhoir S.I., Bhoir I.C., Bhagwat A.M., Sundaresan M. J. Chromatogr. B. 2001. Vol. 757. P. 39.
72. Dost K., Jones D.C., Davidson G. The Analyst. 2000. Vol. 125. P. 1243.
73. Svensson L.A., Dönnecke J., Karlsson K.E., Karlsson A., Vessman J. Chirality. 2000. Vol. 12. P. 606.
74. Thienpont A., Gal J., Aeschlimann C., Félix G. Analisis. 1999. Vol. 27. P. 713.
75. Toribio L., Bernal J., del Nozal M., Jiménez J.J., Nieto E. J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 921. P. 305.
76. Johannsen M. J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 937. P. 135.
77. Bhoir I.C., Raman B., Sundaresan M., Bhagwat A.M. Analytical Letters. 1998. Vol. 31. P. 1533.
78. Bhoir I., Patil S.T., Sundaresan M. Talanta. 1999. Vol. 48. P. 1179.
79. Gyllenhaal O., Vessman J. J. Chromatogr. A. 1999. Vol. 839. P. 141.
80. Ibañez E., Palacios J., Reglero G. J. Micro. Sep. 1999. Vol. 11. P. 605.
81. Yaku K., Aoe K., Nishimura N., Morishita F. J. Chromatogr. A. 1999. Vol. 848. P. 337.
82. Bernal J.L., del Nozal M.J., Rivera J.M., Serna M.L., Toribio L. Chromatographia. 1996. Vol. 42. P. 89.
83. Jagota N., Nair J., Frazer R., Klee M., Wang M. J. Chromatogr. A. 1996. Vol. 721. P. 315.
84. Karlsson L., Gyllenhaal O., Karlsson A., Gottfries J. J. Chromatogr. A. 1996. Vol. 749. P. 193.
85. Zhao Y., Woo G., Thomas S., Semin D., Sandra P. J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 1003. P. 157.
86. Toribio L., Alonso C., del Nozal M.J., Bernal J.L., Jiménez J.J. J. Sep. Sci. 2006. Vol. 29. P. 1363.
87. Alexander A.J., Staab A. Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 3835.
88. Ottiger S., Kluge J., Rajendran A., Mazzotti M. J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1162. P. 74.
89. Liu Y., Rozhkov R.V., Larock R.C., Xiao T.L., Armstrong D.W. Chromatographia. 2003. Vol. 58. P. 775.
90. Chen L., Thompson R.A., Johnson B.D., Wyvratt J.M. Chirality. 2002. Vol. 14. P. 393.
91. Smith R., Ma L. J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 179.
92. Roman J.M., Abbott E., Xu X., Fox S.D., Veenstra T.D., Issaq H.J. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2007. Vol. 30. P. 2037.
93. Xu X., Roman J.M., Veenstra T.D., Van Anda J., Ziegler R.G., Issaq H.J. Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 1553.
94. Yip H.S.H., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. Chromatographia. 2007. Vol. 65. P. 655.
95. David P.A., Novotny M.V. J. Micro. Sep. 1998. Vol. 10. P. 27.
96. Blum C., Kubeczka K., Becker K. J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 773. P. 377.
97. Brondz I., Ekeberg D., Bell D.S., Annino A.R., Hustad J.A., Svendsen R., Vlachos V., Oakley P., Langley G.J., Mohini T. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. Vol. 43. P. 937.
98. Jones D.C., Dost K., Davidson G., George M.W. The Analyst. 1999. Vol. 124. P. 827.
99. Lavison-Bompard G., Thiébaud D., Beziau J., Carraze B., Valette P., Duteurtre X., Tabet J. J. Chromatogr. A. 2009. Vol. 1216. P. 837.
100. Morgan D., Harbol K.L., Kitrinos N.P. J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 800. P. 39.
101. Tuomola M., Hakala M., Manninen P. J. Chromatogr. B. 1998. Vol. 719. P. 25.
102. Dulaurent A., Dahan L., Thiébaud D., Bertoncini F., Espinat D. Oil Gas Sci. Technol. 2007. Vol. 62. P. 33.

103. Pyo D. J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2007. Vol. 30. P. 3085.
104. Thiébaud D.R.P., Robert E.C. *Analisis.* 1999. Vol. 27. P. 681.
105. Coleman W.M., Dube M.F., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T. *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55. P. 3037.
106. Ramirez P., Fornari T., Senorans F., Ibanez E., Reglero G. *J. Supercrit. Fluids.* 2005. Vol. 35. P. 128.
107. Kamangerpour A., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T., McNair H.M., Chorida L. *Chromatographia.* 2002. Vol. 55. P. 417.
108. Simon P., Nicot T. *J. Chromatogr. B.* 1996. Vol. 679. P. 103.
-
-

SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATION TO ANALYSIS AND PRODUCTION OF HIGH PURITY COMPOUNDS

**¹A.S. Samokhin, ¹I.A. Revelsky, ¹D.A. Chepelyansky, ²O.O. Parenago,
²O.I. Pokrovsky, ²F.D. Lepeshkin, ²K.B. Ustinovich, ¹A.I. Revelsky**

¹*Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, Russia*

²*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

Principals of supercritical fluid chromatography (SFC) and its application in various fields are reviewed. SFC is compared to high-performance liquid chromatography (HPLC). Fields of SFC application are considered. Special attention is paid to the analysis of pharmaceuticals (and their impurities), biologically active compounds and to the utilization of preparative SFC in the production of high purity compounds. Different types of detection in SFC are discussed; special attention is paid to the utilization of mass-spectrometric detectors in SFC.

Key words: supercritical fluid chromatography, pharmaceuticals, preparative SFC, SFC/MS.
