

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ НА СЕЛЕКТИВНОСТЬ В СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ РАЗДЕЛЕНИИ ЭНАНТИОМЕРОВ САЛЬБУТАМОЛА

^{1,2}М. О. Костенко, ^{1,2}К. Б. Устинович, ^{1,2}О. И. Покровский*,
^{1,2}О. О. Паренаго, ³Н. Г. Базарнова, ^{1,2}В. В. Луни

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет,
Москва, Россия

³Алтайский государственный университет, химический факультет, Барнаул, Россия

*oleg.pokrovskiy@supercritical.ru

Поступила в редакцию 20.10.2017 г.

Три хиральных хроматографических сорбента на основе замещенных полисахаридов, целлюлозы и амилозы протестированы в разделении энантиомеров противоастматического препарата сальбутамола методом сверхкритической флюидной хроматографии. Наибольшую энантиоселективность показал сорбент на основе целлюлозы, модифицированной трис-3-хлор-4-метилфенилкарбаматными группами. Для него проведена оптимизация состава подвижной фазы по критериям максимизации селективности разделения и минимизации факторов асимметрии пиков. Для данного сорбента успешное разделение энантиомеров сальбутамола достигается при относительно небольшой доле соразтворителя (10–15 % об.) в подвижной фазе. Введение аминных модификаторов позволяет получать неискаженные хроматографические пики. Из трех испытанных аминных добавок изопропиламин обеспечивает наиболее симметричные пики и одновременно наибольшую энантиоселективность.

Ключевые слова: сальбутамол, энантиомеры, сверхкритическая флюидная хроматография, полисахаридные сорбенты.

ВВЕДЕНИЕ

Сальбутамол (рис. 1) является β_2 -адреностимулятором из ряда 1,2-аминоспиртов и используется в ингаляционной форме для лечения бронхиальной астмы. Он представляет собой хиральное соединение; нужной физиологической активностью обладает только его R-энантиомер [1].

Основные производители лекарственных средств на базе сальбутамола выпускают его в виде рацемата. Однако есть сведения о том, что при долгом постоянном ингаляционном приеме балластный S-энантиомер постепенно накапливается в бронхах, так как он характеризуется низкой скоростью всасывания, и вызывает ряд нежелательных побочных эффектов [2]. В этой связи у ряда фармпроизводителей появилось стремление наладить выпуск продукции на основе энантиомерно чистого сальбутамола [3]. Это намерение гармонично вписывается в общую

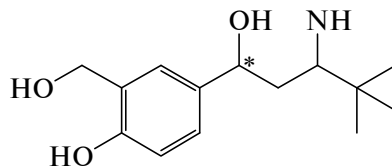


Рис. 1. Структурная формула салбутамола

парадигму развития современной фармации, направленную на разработку лекарств адресного действия с минимальными побочными эффектами.

Наиболее технологически эффективным способом производства энантимерно чистых низкомолекулярных синтетических соединений является стереоселективный синтез. Методики такого синтеза разработаны для многих популярных оптически активных фармобъектов, в том числе и для левосалбутамола [4]. Однако внедрение такой технологии в производство требует значительных капиталовложений и сопряжено с большими временными затратами. Как правило, оно осуществляется только после того, как подтверждается рыночная конкурентоспособность энантимерно чистого препарата по сравнению с аналогичным рацемическим. На стадиях доклинических и клинических испытаний, а также на первых этапах освоения рынка производство малых партий энантимерно чистого препарата целесообразнее осуществлять путем препаративного разделения рацемической смеси. Для решения этой задачи применяются методы препаративной хроматографии и селективной кристаллизации диастереомерных солей [5].

Из всех разновидностей препаративной хроматографии наибольшей популярностью в сфере разделения энантиомеров пользуется сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) [6], в которой в качестве основного компонента подвижной фазы (ПФ) используется суб- или сверхкритический диоксид углерода. Низкая вязкость и высокая диффузивность суб- и сверхкритических флюидов позволяет проводить хроматографические разделения при более высокой скорости потока ПФ по сравнению с традиционными жидкими растворителями, а также быстрее достигать равновесия между подвижной и неподвижной фазами при смене условий. Автоматическое испарение большей части ПФ при сбросе давления по окончании процесса существенно упрощает процедуру выделения целевой субстанции из раствора ПФ после хроматографического разделения. CO₂ намного дешевле органических растворителей, используемых в жидкостной хроматографии, что выгодно сказывается на стоимости разделений.

Оптимизация методики хроматографического разделения рацемической смеси — сложная и трудоемкая процедура. Несмотря на внушительный масштаб исследований в области механизмов разделения энантиомеров в хиральной хроматографии [7], не существует априорных путей выбора оптимального хирального сорбента под конкретную задачу. Основным способом подбора по-прежнему остается полный перебор всех возможных вариантов. Количество одних только коммерчески доступных хиральных сорбентов исчисляется многими десятками, при этом энантиоселективность каждого сорбента может зависеть от состава ПФ, типа и содержания используемых растворителей и динамических модификаторов. Это делает процедуру перебора весьма трудоемкой и времязатратной. В методе СФХ на это накладываются дополнительные сложности, связанные как с физическими особенностями сверхкритических (СК) флюидов, так и с химическими

особенностями СК-СО₂. Вследствие высокой изотермической сжимаемости флюидов перепад давления вдоль колонки создает перепад плотности, что сказывается на растворяющей способности. Это приводит к изменению показателей разделений, например, при изменении объемной скорости потока ПФ в СФХ или при переносе методик с сорбентов с суб-2-микронным зернением, используемых в аналитической хроматографии, на 5-микронные сорбенты, применяемые в препаративном разделении [8, 9]. СК-СО₂ способен вступать в химические взаимодействия с низшими спиртами [10], а также первичными и вторичными аминами [11]. Этим данный элюент отличается от насыщенных углеводородов, с которыми его часто сравнивают по элюирующей способности [12]. Спирты используются в СФХ в качестве полярных сорбентообразователей, увеличивающих элюирующую способность ПФ по отношению к полярным анализам. Амины выступают в качестве динамических модификаторов (ДМ), введение которых в состав ПФ позволяет управлять механизмами удерживания и разделения в СФХ за счет активации нужных и подавления нежелательных межмолекулярных взаимодействий. Взаимодействие этих компонентов ПФ с СК-СО₂ может приводить к образованию новых веществ, влияющих на энантиоселективность. Иногда даже малые изменения в составе ПФ в СФХ могут приводить к драматическим изменениям в селективности разделения [13].

Практической целью настоящей работы было создание лабораторной методики разделения энантиомеров салбутамола методом СФХ. Для увеличения биодоступности при ингаляционном приеме салбутамола используется в виде аммониевой соли, чаще всего сульфатной. Разделение аммониевых солей методом СФХ требует применения ДМ, при этом в зависимости от типа сорбента и типа соли наиболее успешное управление селективностью энантиомерного разделения может осуществляться разными ДМ: аминными [14], кислотными [15], солевыми [16] или комбинированными [17]. В случае аминных ДМ следует учитывать возможность влияния их взаимодействия с СК-СО₂ на механизм энантиораспознавания. Для последующего практического использования желательно, чтобы содержание ДМ в ПФ было минимально, чтобы снизить затраты на очистку целевой субстанции от остаточного растворителя после хроматографического выделения. Также желательно, чтобы влияние концентрации ДМ на энантиоселективность было невелико, так как в производственных условиях точный контроль содержания летучих аминных ДМ в ПФ может быть обременительным.

В работе исследовалось влияние содержания метанольного сорбентообразователя в подвижной фазе, типа и концентрации аминного ДМ в сорбентообразователе на энантиоселективность разделения энантиомеров салбутамола на выбранном полисахаридном хиральном сорбенте.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и материалы

Сульфат салбутамола («TPS Laboratories PVT», Индия) был предоставлен ЗАО «Алтайвитамины». В качестве подвижной фазы использовали СО₂ марки пищевой чистоты 99,5 % (соответствие ГОСТ 8050-85) производства «Линде Газ» (Балашиха, Россия). Метанол чистоты «ОСЧ для градиентной ВЭЖХ» производства «Химмед» (ТУ 2636-081-29483781-2015) использовали как сорбентообразователь.

***Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантиомеров салбутамола***

В качестве ДМ использовали изопропиламин (ИПА) и диэтиламин (ДЭА) производства «Merck Schuchardt OHG» (Hohenbrunn, Германия), триэтиламин (ТЭА) производства «Acros Organics» (Geel, Бельгия) и трифторуксусную кислоту (ТФУ) производства «Merck Schuchardt OHG» (Hohenbrunn, Германия); все вещества имели квалификацию «для синтеза» (чистота 99 %).

Использовались три хиральные хроматографические колонки производства «Waters Corp.» марки Trefoil:

- на базе амилоры с привитыми трис-3,5-диметилфенилкарбаматными группами (AMY1);
- на базе целлюлозы с привитыми трис-3,5-диметилфенилкарбаматными группами (CEL1);
- на базе целлюлозы с привитыми трис-3-хлор-4-метилфенилкарбаматными группами (CEL2).

AMY1 и CEL2 имеют хлорсодержащие заместители. Это относительно новый подкласс полисахаридных сорбентов для хиральной хроматографии, часто обеспечивающий более высокую энантиоселективность по сравнению со ставшими классическими полисахаридными сорбентами с метилфенилкарбаматными группами [18].

СФХ

Все хроматографические опыты были выполнены с использованием аналитического сверхкритического флюидного хроматографа Acquity UPC² производства компании «Waters Corp.». Управление прибором, а также определение хроматографических параметров хроматограмм, времен удерживания и коэффициентов асимметрии вели с использованием программного обеспечения Empower 3 производства «Waters Corp.». Если не указано иное, элюирование вели при выходном давлении 120 бар, температуре колоночного термостата 35 °С, скорости потока 1 мл/мин. Объемные значения скорости потока ПФ указываются для входящего в насос жидкого СО₂ (+13 °С, 55 бар). Детектирование осуществляли с помощью оптического диодно-матричного детектора в интервале длин волн от 190 до 400 нм. Пробы представляли собой растворы сульфата салбутамола в метаноле. В большинстве опытов концентрация салбутамола в растворе была равной 1 мг/мл, в опытах, проводившихся в изократических условиях с объемной долей метанола в ПФ 10 % — 3 мг/мл. Каждый ввод пробы выполняли минимум трижды, времена удерживания усредняли по трем сходящимся опытам.

Влияние ДМ изучали при концентрациях метанола в ПФ 10 и 15 % об. (для ТФУ — только 10 % об.). ДМ добавляли к ПФ в виде раствора в метаноле с концентрацией 0,05; 0,1; 0,5; 1 и 2 % об.

Время удерживания определяли по вершине хроматографического пика. За мертвое время (время выхода неудерживаемого компонента, t_0) принимали время первого возмущения базовой линии, обычно связываемого с выходом растворителя образца. Все хроматографические параметры рассчитывали по стандартным формулам. Коэффициенты удерживания вычисляли как

$$k = (t_r - t_0)/t_0,$$

где k — коэффициент удерживания; t_r — время удерживания вещества; t_0 — мертвое время.

Коэффициент селективности разделения двух энантиомеров (α) рассчитывали как отношение коэффициента удерживания более удерживаемого энантиомера к коэффициенту удерживания менее удерживаемого. Коэффициент асимметрии пика (A_s) рассчитывали как отношение ширин правого и левого фронтов пика, измеренных у основания пика. Ширина фронта пика измерялась от максимума пика до точки перехода фронта в базовую линию.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Скрининг колонок

На предварительном этапе был проведен экспрессный скрининг трех полисахаридных хиральных сорбентов. Скрининг вели в изократическом режиме с использованием 10 % метанола как соразтворителя. Из трех испытанных колонок только одна, CEL2, обнаружила приемлемую селективность в отношении энантиомеров салбутамола. CEL1 обеспечила лишь неполное разделение, АМУ1 дала нулевую селективность. На рис. 2 приведены типичные хроматограммы, зарегистрировавшиеся в ходе скрининга.

Дальнейшая оптимизация методики разделения велась с использованием колонки CEL2.

Содержание метанола

Состав ПФ является вторым по значимости после типа сорбента фактором, определяющим удерживание, селективность разделения и форму хроматографических пиков. На рис. 3 приведены хроматограммы салбутамола на CEL2, регистрируемые при различных содержаниях метанола в ПФ.

С ростом содержания метанола в ПФ монотонно падают времена удерживания, уменьшаются селективность разделения и коэффициенты асимметрии пиков. Для всех значений характерно четко регистрируемое разделение энантиомеров и сильное уширение задних фронтов пиков (так называемый тейлинг). В таблице 1 приведены численные значения параметров разделения.

При содержании метанола в ПФ 8 % об. величины коэффициентов удерживания очень велики. Кроме того, асимметрия пиков в этих условиях настолько высока, что пики практически сливаются с базовой линией. Их обнаружение при этом становится затруднительным. С ростом содержания метанола времена удерживания резко уменьшаются: значение k_2 падает с 124 до 7 при увеличении концентрации метанола с 8 до 20 % об. Асимметрия пиков также уменьшается, хотя даже при 20 % коэффициенты асимметрии все равно имеют значения выше 1,2. Для аналитической методики приемлемыми обычно считаются значения A_s в пределах 0,9—1,1. В препаративной хроматографии более высокие значения A_s могут быть допустимы, однако наблюдаемые в данном случае формы пиков не подходят для масштабирования на препаративные объемы с учетом неизбежных искажений пиков при работе вне области адсорбции Генри. Необходимо применять какой-нибудь способ динамической модификации хроматографической системы для подавления тейлинга. При содержании метанола 20 % об. пики начинают частично перекрываться, поэтому более высокие его концентрации не использовались.

Введение ДМ в ПФ может приводить к изменению и коэффициентов удерживания, и коэффициентов селективности. Для каждого ДМ оптимальное содержание определялось индивидуально.

**Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантимеров салбутамола**

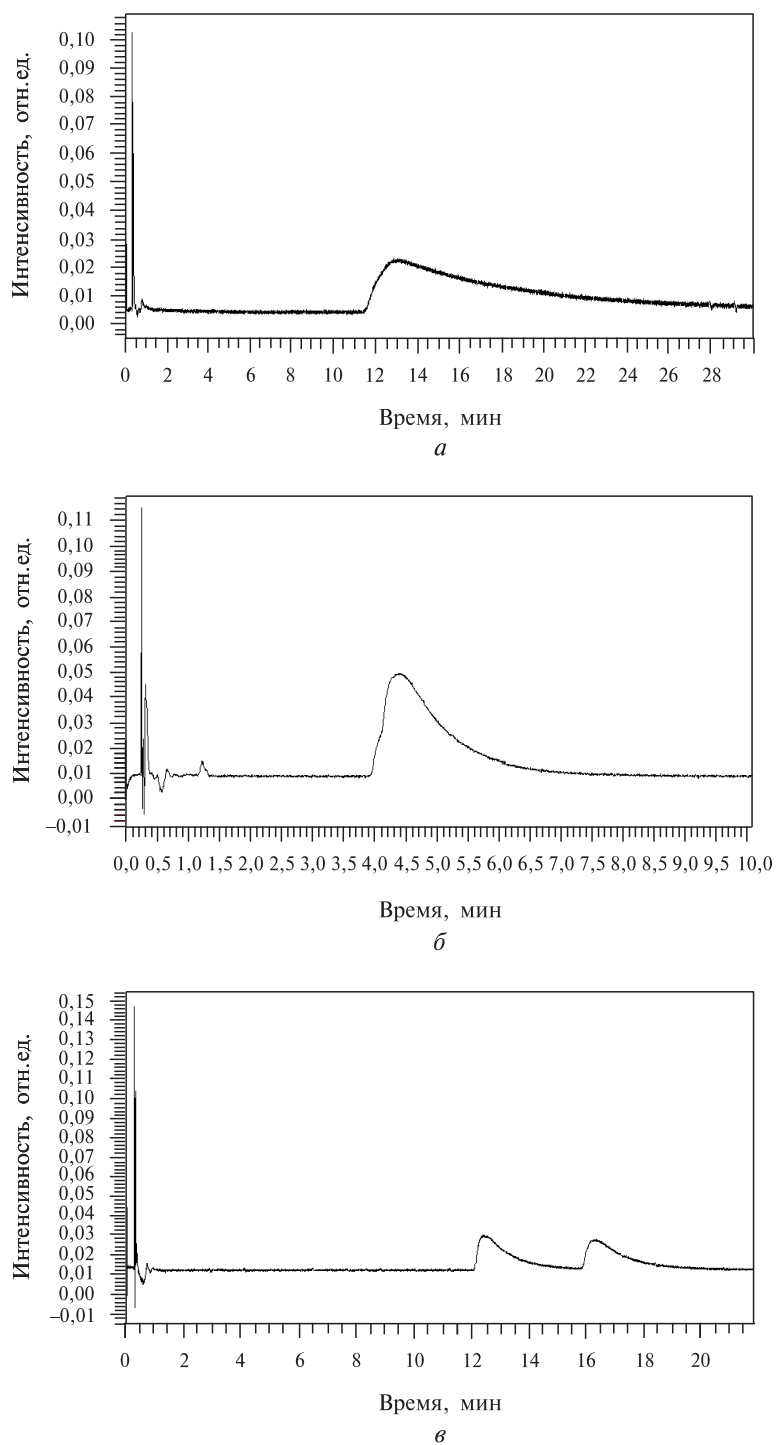


Рис. 2. Скрининг колонок:

a — АМУ1; *б* — СЕЛ1; *в* — СЕЛ2. Условия: 35 °С; 120 бар; расход ПФ (10% метанола в СО₂) 1 мл/мин; длина волны детектора 225 нм

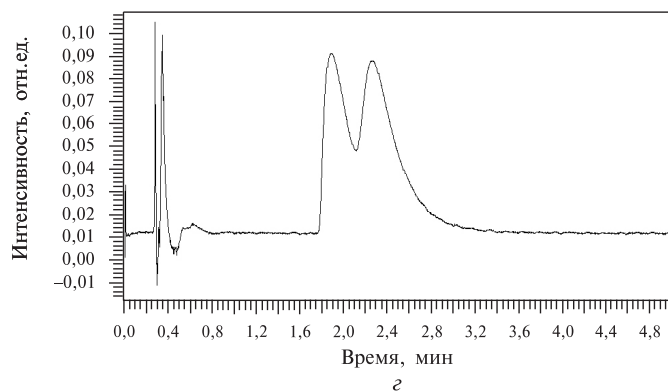
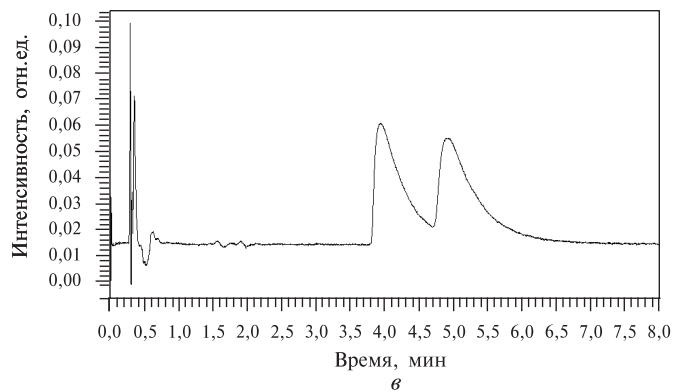
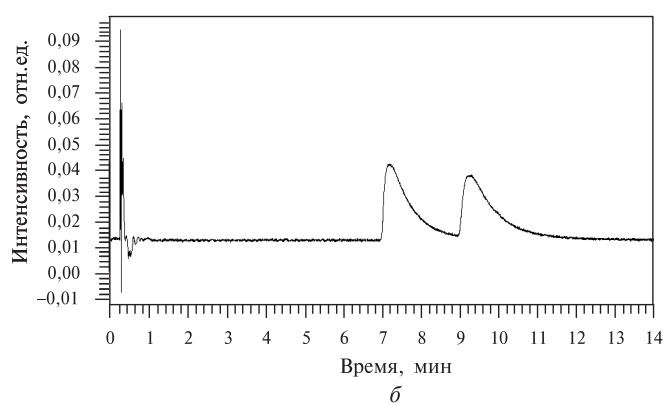
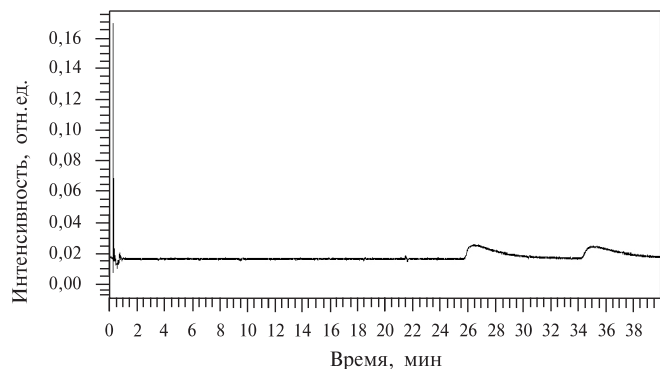


Рис. 3. Влияние содержания метанола (% об.) в ПФ на удерживание и селективность разделения энантиомеров салбутамола на CEL2:
a — 8%; *б* — 12%; *в* — 15%;
г — 20%; остальные параметры — см. подпись к рис. 2

Влияние состава подвижной фазы на селективность в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантиомеров салбутамола

Таблица 1

Зависимости коэффициентов удерживания, селективности и асимметрии пиков от доли метанола в ПФ

Содержание метанола в ПФ, об. %	t_0 , мин	t_r 1*, мин	t_r 2**, мин	k_1	k_2	α
8	0,278	26,2	34,7	93,2	124,1	1,33
10	0,277	12,4	16,3	43,8	57,9	1,32
12	0,276	7,2	9,3	25,3	32,7	1,30
15	0,279	3,9	4,9	13,0	16,6	1,27
20	0,279	1,9	2,2	5,7	7,1	1,24

* 1 — энантиомер салбутамола, элюирующийся первым;

** 2 — энантиомер салбутамола, элюирующийся вторым.

Динамическая модификация

Три аминных и один кислотный модификатор были испытаны для подавления тейлинга. Сводные результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Модификация с помощью ТФУ не позволила повысить симметричность пиков. Наоборот, введение этого вещества приводило к появлению дополнительных искажений их формы. В некоторых опытах с ТФУ даже наблюдалось расщепление пиков энантиомеров салбутамола (см. рис. 4а). Использование ТФУ и других кислотных модификаторов в дальнейшей работе, а также в будущей препаративной методике представляется нецелесообразным.

Вместе с тем, обращает на себя внимание тот факт, что использование ТФУ приводило к очень резкому, почти четырехкратному сокращению времен удерживания (ср. таблицы 1 и 2), и при этом коэффициент энантиоселективности возрастал с 1,33 без ДМ до 1,57 при концентрации ТФУ 0,05 % об.

Все три аминных модификатора успешно подавляют тейлинг пиков салбутамола на сорбенте CEL2. Наиболее эффективное подавление осуществляется

Таблица 2

Влияние типа и концентрации ДМ на форму пиков и селективность разделения. Доля метанола в ПФ 10 об. %

ДМ	Концентрация в метаноле, % об.	t_0 , мин	t_r 1, мин	t_r 2, мин	k_1	k_2	α	$As1$	$As2$
ТФУ	0,05	0,276	3,41	5,18	11,34	17,75	1,57	5,58	3,59
	0,1	0,276	3,37	5,13	11,21	17,58	1,57	4,78	3,26
ИПА	0,05	0,277	11,72	15,38	41,25	54,46	1,32	1,74	1,67
	0,1	0,276	11,53	15,03	40,78	53,45	1,31	1,57	1,49
	0,5	0,275	9,90	12,35	35,01	43,90	1,25	1,21	1,24
	1	0,278	8,73	10,40	30,44	36,47	1,20	1,14	1,20
	2	0,278	5,80	6,44	19,87	22,15	1,12	н.о.*	н.о.

* Невозможно определить ввиду частичного перекрытия пиков.

Окончание таблицы 2

ДМ	Концентрация в метаноле, % об.	t_0 , мин	t_r 1, мин	t_r 2, мин	k_1	k_2	α	A_s1	A_s2
ДЭА	0,05	0,276	12,26	15,93	43,36	56,63	1,31	2,16	1,82
	0,1	0,278	12,12	15,70	42,61	55,48	1,30	1,82	1,68
	0,5	0,277	10,93	13,43	38,40	47,42	1,24	1,34	1,38
	1	0,278	10,02	11,71	35,09	41,18	1,17	1,21	1,26
	2	0,281	8,63	9,41	29,67	32,45	1,09	н.о.	н.о.
ТЭА	0,05	0,282	12,29	15,95	42,56	55,55	1,31	2,47	2,04
	0,1	0,278	12,20	15,72	42,95	55,61	1,30	2,21	1,99
	0,5	0,279	10,98	13,44	38,35	47,16	1,23	1,47	1,41
	1	0,279	10,01	11,66	34,87	40,77	1,17	1,42	1,22
	2	0,279	8,92	9,69	30,94	33,68	1,09	н.о.	н.о.

Таблица 3

**Влияние типа и концентрации ДМ на форму пиков и селективность разделения.
Доля метанола в ПФ 15%**

ДМ	Концентрация в метаноле, об. %	t_0 , мин.	t_r 1, мин	t_r 2, мин	k_1	k_2	α	A_s1	A_s2
ИПА	0,05	0,285	3,53	4,45	11,36	14,59	1,28	1,34	1,34
	0,1	0,283	3,43	4,34	11,15	14,35	1,29	1,25	1,23
	0,5	0,285	3,02	3,71	9,62	12,04	1,25	1,10	1,13
	1	0,283	2,74	3,25	8,68	10,50	1,21	1,13	1,07
	2	0,288	2,27	2,58	6,87	7,95	1,16	н.о.	н.о.
ДЭА	0,05	0,281	3,67	4,63	12,06	15,46	1,28	1,62	1,47
	0,1	0,281	3,58	4,49	11,74	14,96	1,27	1,43	1,37
	0,5	0,274	3,33	4,06	11,17	13,85	1,24	1,20	1,20
	1	0,277	3,13	3,65	10,29	12,18	1,18	1,17	1,10
	2	0,281	2,85	3,14	9,12	10,14	1,11	н.о.	н.о.
ТЭА	0,05	0,292	3,43	4,32	10,75	13,76	1,28	1,78	1,55
	0,1	0,293	3,39	4,24	10,56	13,46	1,27	1,69	1,50
	0,5	0,278	3,35	4,06	11,05	13,60	1,23	1,27	1,19
	1	0,282	3,06	3,53	9,87	11,54	1,17	н.о.	н.о.
	2	0,282	2,86	3,14	9,17	10,14	1,11	н.о.	н.о.

с использованием ИПА. Уже при концентрации 0,5 % об. (15 % об. метанола в ПФ) этот ДМ позволяет получать коэффициенты асимметрии на уровне ~1,1 (рис. 4б), что достаточно как для аналитического, так и для препаративного разделения. При этом все еще сохраняется высокая энантиоселективность ($\alpha = 1,25$), достаточная для препаративного разделения. Эффективность ДЭА в нивелировке

**Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантимеров салбутамола**

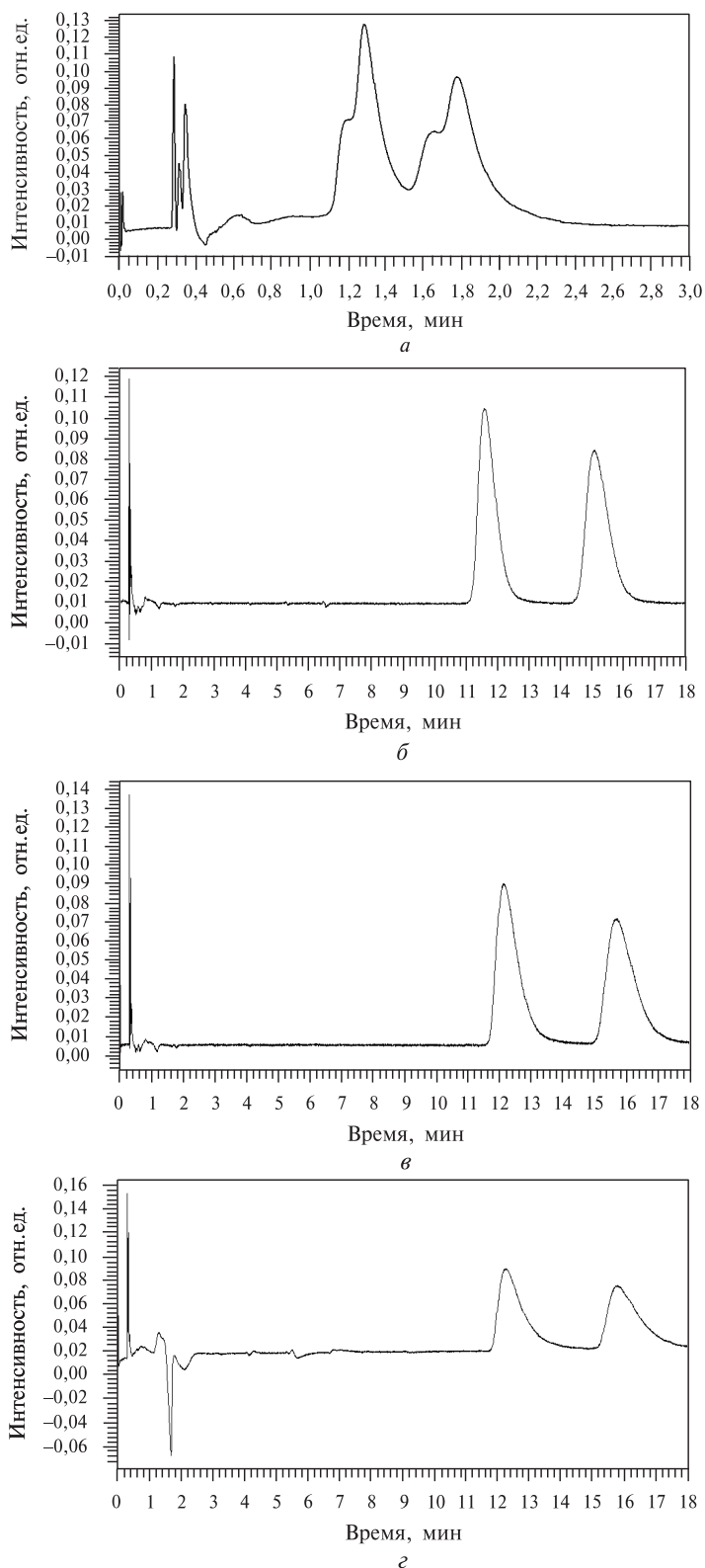


Рис. 4. Влияние ДМ на формы пиков энантимеров салбутамола: *а* — ТФУ, *б* — ИПА, *в* — ДЭА, *г* — ТЭА; 10 % об. метанола в ПФ, концентрация ДМ в метаноле 0,1 % об.; условия: см. подпись к рис. 2

Таблица 4

Физические характеристики ДМ

ДМ	M_r , г/моль	ρ , г/мл	V_m^{-1} , моль/мл*	$T_{\text{кип}}$, °С	pKa** [24]
ТФУ	114	1,489	0,0131	72	0,52
ИПА	59	0,688	0,0117	34	10,63
ДЭА	73	0,71	0,0097	56	10,84
ТЭА	101	0,728	0,0072	89	10,75

* V_m^{-1} — величина, обратная мольному объему, моль/мл.

** Приводятся значения константы диссоциации pKa для водной среды при 25 °С; для аминов даны pKa сопряженных ионов аммония R_3NH^+ ($R_3NH^+ + D \rightleftharpoons R_3N + H^+$).

тейлинга несколько ниже, он дает значения A_s , близкие к 1,1, только при концентрации в сорастворителе 1 % об. (таблица 3). Нивелирующий эффект ТЭА выражен еще слабее; пики, получаемые с этим ДМ, сохраняют явный тейлинг во всем изученном интервале концентраций.

Повышение концентрации ДМ в сорастворителе приводит к падению коэффициентов удерживания и селективности. Величины коэффициентов удерживания, а также факторов асимметрии при равных объемных долях ДМ зависят от типа амина.

Значения коэффициента селективности практически не зависят от типа ДМ в интервале их концентраций в метаноле 0,05—0,50 % об. При концентрациях 1 и 2 % об. ДЭА и ТЭА ведут себя идентично, а ИПА дает более высокие значения α . Это связано с меньшими значениями времен удерживания в случае ИПА при данных концентрациях ДМ в сорастворителе. Так, при концентрации ДМ в метаноле 2 % об. и доле сорастворителя в ПФ 15 % об. время удерживания элюирующегося вторым энантиомера салбутамола равно 2,5 мин для ИПА и 3,1 мин для ДЭА и ТЭА. При одинаковой временной разнице в элюировании двух энантиомеров меньшие времена удерживания дадут более высокие значения α .

В качестве ДМ, обеспечивающего коррекцию формы пиков салбутамола, решено использовать ИПА. Помимо вышеназванных преимуществ в симметрии пиков и селективности этот модификатор дает наименьший вклад в уровень шума базовой линии на использованных длинах волн, что увеличивает чувствительность детектирования, а также имеет наименьшую среди испытанных ДМ температуру кипения (таблица 4), что облегчает процедуру постхроматографической очистки целевой субстанции от примесей ДМ.

Таким образом, разделение энантиомеров салбутамола на сорбенте на основе целлюлозы с трис-(3-хлор-4-метилфенилкарбаматными функциональными группами) в СФХ целесообразно осуществлять при доле сорастворителя в ПФ от 10 до 15 % об. и концентрации ИПА в сорастворителе от 0,1 до 0,5 % об.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на более чем полувековую историю СФХ (первая публикация вышла в 1962 г.), в отношении механизмов удерживания и разделения этот метод остается менее изученным, чем большинство разновидностей жидкостной хроматографии. Высокой изотермической сжимаемостью флюида обусловлена высокая чувствительность ПФ к малейшим изменениям условий. Речь идет не только о

**Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантиомеров салбутамола**

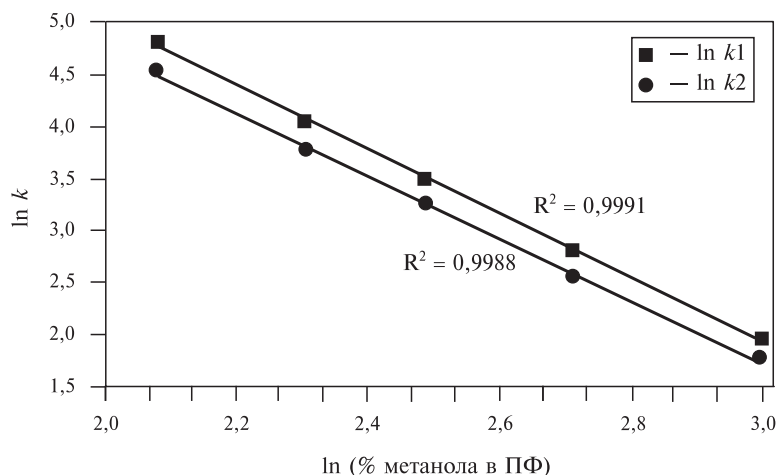


Рис. 5. Зависимости коэффициентов удерживания от процента метанола в составе ПФ

давлении и температуре. Профиль плотности флюида в хроматографическом тракте зависит также от скорости потока, зернения сорбента, геометрических параметров колонки, длины трубок. Это делает СФХ трудной для фундаментального изучения. В случае использования сорастворителей и ДМ ситуация усложняется упоминавшейся во введении химической неинертностью ПФ. Возможно, вследствие этих причин тематика исследования механизмов удерживания в СФХ в ряде отношений по-прежнему остается на стадии накопления экспериментальных данных и выработки эмпирических правил и не выходит на уровень обобщающего описания механизмов. Некоторые аспекты влияния давления на селективность разделения энантиомеров салбутамола в СФХ кратко обсуждались нами ранее [19]. Ниже приведены комментарии по тем аспектам влияния состава подвижной фазы, которые не только представляют утилитарный интерес, но также затрагивают некоторые фундаментальные проблемы СФХ.

Зависимости коэффициентов удерживания от доли метанола в билогарифмических координатах близки к линейным (рис. 5). Обычно считается, что линеаризация зависимостей k от содержания сильного растворителя в билогарифмических координатах свидетельствует о том, что хроматография протекает в адсорбционном, а не в распределительном режиме, т.е. что удерживание сорбатов преимущественно осуществляется за счет непосредственного контакта с сорбентом, а не за счет распределения между ПФ и неподвижным жидким слоем, адсорбированным на колонке. При превалировании распределительного механизма удерживания должна была бы наблюдаться линеаризация в координатах « $\ln k \div$ концентрация сорастворителя». Дискуссия о том, какой из этих двух базовых механизмов чаще всего реализуется в СФХ, идет на протяжении нескольких десятилетий. С одной стороны, неоднократно было показано [13, 20—23], что при использовании силикагелевых сорбентов и спиртовых сорастворителей даже при очень малых их содержаниях (1—2 % в случае метанола) в ПФ на колонке образуется полимолекулярный адсорбционный слой, обогащенный сорастворителем и ДМ, который выступает в качестве неподвижной жидкой фазы. В таких условиях для аналитов, не способных конкурировать со спиртами за адсорбционные центры, предположительно должен реализовываться распределительный механизм удерживания.

С другой стороны, сам факт успешного осуществления разделения энантиомеров в СФХ говорит о том, что вклад адсорбционного механизма в удерживание даже при значительном содержании метанола в ПФ остается существенным. Разделение энантиомеров возможно только в случае прямого контакта сорбатов с хиральными адсорбционными центрами сорбента. Приведенные на рис. 5 зависимости свидетельствуют в пользу того, что адсорбционный механизм удерживания в описываемой системе не просто присутствует, но является основным.

Одно из возможных объяснений различного влияния разных аминов на удерживание и форму пиков салбутамола при равенстве объемных долей ДМ в сорбенте может быть связано с разницей в мольных концентрациях аминов. При равных объемных долях аминов в сорбенте их мольные концентрации несколько различаются за счет разницы в молекулярной массе и плотности (см. таблицу 4).

Для рассмотрения этого предположения мы построили зависимости основных хроматографических параметров от объемных и мольных концентраций ДМ для всех трех аминов. Наиболее показательными оказались зависимости коэффициентов асимметрии пиков (A_s), поскольку они менее подвержены влиянию трудноуправляемых факторов, таких как флуктуации в значениях мертвых времен. На рис. 6 приведены зависимости коэффициента асимметрии первого пика от концентрации аминов при доле метанола в ПФ 10 %. Для всех остальных коэффициентов асимметрии наблюдались аналогичные тенденции.

Зависимости « $\lg A_s \div \lg C$ » (где C — концентрация, выраженная в объемной доле ДМ в сорбенте) (рис. 6а) явно различаются для трех аминов. Пересчет в мольные концентрации (обозначена на рис. 6б как C^*) приводит к некоторому сглаживанию данных, что можно воспринимать как свидетельство в пользу нашего предположения. Однако полного нивелирования различий между разными ДМ при этом все равно не наблюдается. В частности, от просматриваемой общей зависимости существенно отклоняются некоторые данные для ИПА в области низких концентраций. Поскольку первичные, вторичные и третичные амины различаются по основности, возникает соблазн приписать наблюдаемое различие в химической активности аминов. Механизм подавления тейлинга аминными ДМ сложен и до конца не изучен [25]. Принято считать, что наиболее существенное изменение хроматографической системы, производимое аминными ДМ и приводящее к подавлению тейлинга, — это экранирование силанольных групп за счет сильного кислотно-основного взаимодействия аминов с ними. Различия в способности аминов вступать в кислотно-основные взаимодействия были учтены путем введения приведенной концентрации:

$$C^{**} = C^* \cdot 10^{-pK_a},$$

где pK_a — константа диссоциации сопряженного иона аммония. В таком выражении концентрации множитель 10^{-pK_a} можно рассматривать как определенный аналог коэффициента активности в растворе. Зависимость $\lg A_s$ от $\lg C^{**}$ приведена на рис. 6в. В таких координатах различия между тремя аминами нивелируются практически полностью, что, по нашему мнению, свидетельствует об определяющей роли кислотно-основных взаимодействий в подавлении тейлинга аминами. Разумеется, значения pK_a , измеренные для водной среды, никоим образом не могут служить истинной характеристикой основности аминов в среде СК- CO_2 — метанол. В случае необходимости обеспечения количественной точности характеристики кислотно-основных взаимодействий с участием аминов в таком раство-

**Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантимеров салбутамола**

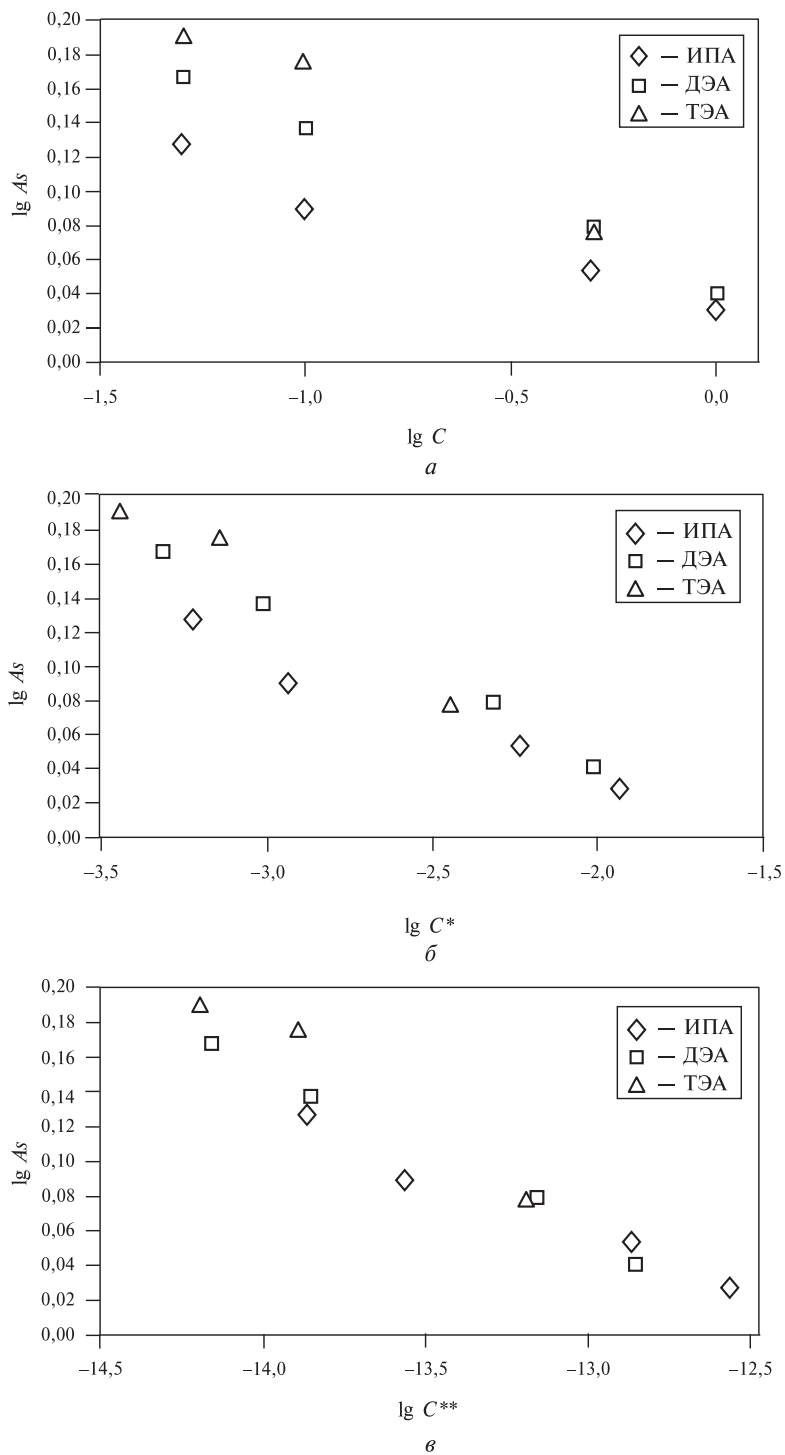


Рис. 6. Зависимости коэффициента асимметрии первого пика от концентраций аминов, выраженных в различных единицах:

a — объемная концентрация аминов в метаноле (*C*), *б* — мольная концентрация аминов в метаноле (*C**), *в* — мольная концентрация, умноженная на 10^{-pK_a} (*C***)

рителе, их необходимо отдельно исследовать и описывать. Зависимость от условного параметра C^{**} приводится здесь исключительно как качественная иллюстрация осмысленности учета кислотно-основных взаимодействий в ПФ при анализе механизмов удерживания в СФХ.

При обсуждении характера влияния типа аминного ДМ на удерживание необходимо учитывать возможное наличие флуктуаций в значениях кажущегося мертвого времени. Метод определения мертвого времени по первому возмущению базовой линии привлекает простотой реализации, но характеризуется большими погрешностями, как систематическими, так и случайными. Флуктуации мертвого времени могут приводить к изменениям коэффициентов удерживания, неколлинеарным изменениям времен удерживания и не соответствующим каким-либо реальным термодинамическим характеристикам процесса. Яркий пример такого эффекта можно видеть для ТЭА при переходе от 0,1 до 0,5 % об. (доля метанола в ПФ 15 % об.) (таблица 3). При снижении времени удерживания наблюдается формальный рост коэффициента удерживания за счет уменьшения мертвого времени. Это уменьшение составляет всего 0,3 секунды, но поскольку мертвое время мало, то этого изменения хватает, чтобы вызвать формальное увеличение коэффициента удерживания. Никаким реальным сорбционным явлениям такие формальные изменения значений хроматографических параметров не соответствуют.

БЛАГОДАРНОСТИ

Экспериментальная работа по разделению энантиомеров салбутамола выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, проект № 03.G25.31.0273. Анализ влияния состава ПФ на параметры разделения выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 14-33-00017-П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Penn R.B., Frielle T., McCullough J.R. et al. Clin. Rev. Allergy Immunol. 1996. Vol. 14. No. 1. P. 37.
2. Matera M.G., Calzetta L., Roglianni P. et al. Pulm. Pharmacol. Ther. 2011. Vol. 24. No. 2. P. 221.
3. Пат. США 7915451 (2011).
4. Пат. США 7049469 (2006).
5. Lorenz H., Seidel-Morgenstern A. Angew. Chem. Int. Ed. 2014. Vol. 53. P. 1218.
6. Speybrouck D., Lipka E. J.Chromatogr.A.2016.Vol.1467.P.33.
7. Chiral recognition in separation methods: mechanisms and applications / Ed. by A. Berthod. Heidelberg: Springer, 2010. 337 p.
8. Tarafder A., Hudalla Ch., Iraneta P., Fountain K.J. J. Chromatogr. A. 2014. Vol. 1362. P. 278.
9. Tarafder A., Hill J. J. Chromatogr. A. 2015. Vol. 1482. P. 65.
10. Oparin R.D., Krestyaninov M.A., Vorobyev E.A., Pokrovskiy O.I., Parenago O.O., Kiselev M.G. J. Mol. Liq. 2017. Vol. 239. P. 83.
11. Jessop P.G., Heldebrand D.J., Li X., Eckert Ch.A., Liotta Ch.L. Nature. 2005. Vol. 436. P. 1102.
12. Phillips J.H., Robey R.J. J.Chromatogr.1988.Vol.465.P.177.
13. Pokrovskiy O.I., Ustinovich K.B., Usovich O.I., Parenago O.O., Lunin V.V., Ovchinnikov D.V., Kosyakov D.S. J. Chromatogr. A. 2017. Vol. 1479. P. 177.
14. Ye Y.K., Lynam K.G., Stringham R.W. J. Chromatogr. A. 2004. Vol. 1041. P. 211.
15. Stringham R.W. J. Chromatogr. A. 2005. Vol. 1070. P. 163.
16. Taylor L.T. J. Chromatogr. A. 2012. Vol. 1250. P. 196.
17. Покровский О.И., Кайда А.С., Усович О.И., Паренаго О.О., Лунин В.В. Ж. физ. хим. 2017. Т. 91. № 11. С. 1999.
18. Wu D.-R., Yip Sh.H., Li P., Sun D., Mathur A. J.Chromatogr.A.2016.Vol.1432.P.122.

**Влияние состава подвижной фазы на селективность
в сверхкритической флюидной хроматографии при разделении энантиомеров салбутамола**

19. Покровский О.И., Костенко М.О., Лунин В.В. Изв. Акад. наук. Сер. Химия. 2017. № 11. С. 2190.
 20. Vajda P., Guiochon G. J. Chromatogr. A. 2013. Vol. 1305. P. 293.
 21. Glenne E., Öhlén K., Leek H., Klarqvist M., Samuelsson J., Fornstedt T. J. Chromatogr. A. 2016. Vol. 1442. P. 129.
 22. Strubinger J.R., Song H., Parcher J.F. Anal. Chem. 1991. Vol. 63. P. 104.
 23. Lochmuller C.H., Mink L.P. J. Chromatogr. 1989. Vol. 471. P. 357.
 24. CRC Handbook of Chemistry and Physics / Ed. by D.R. Lide. Internet Version 2005. CRC Press: Boca Raton, FL, 2005. <<http://www.hbcpnetbase.com>>.
 25. Berger T.A. J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 3.
-
-

**EFFECT OF MOBILE PHASE COMPOSITION ON SELECTIVITY
IN SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY IN SALBUTAMOL
ENANTIOMER SEPARATION**

**^{1,2}M. O. Kostenko, ^{1,2}K. B. Ustinovich, ^{1,2}O. I. Pokrovskiy,
^{1,2}O. O. Parenago, ³N. G. Bazarnova, ^{1,2}V. V. Lunin**

¹*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia*

²*Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow, Russia*

³*Altai State University, Chemical Department, Barnaul, Russia*

Three chiral chromatography stationary phases based on amylose and cellulose were tested for the supercritical fluid chromatography separation of antiasthmatic drug salbutamol enantiomers. A cellulose tris-3-chloro-4-methylphenylcarbamate stationary phase provided the highest selectivity for this separation. The optimization of mobile phase composition allowed us to maximize the selectivity coefficient and to minimize the peak asymmetry factors. A successful salbutamol enantiomer separation is achieved at moderate modifier fraction (10–15% vol.) in the mobile phase on this column. Amine additives are necessary to suppress peak tailing. Among three tested amines isopropylamine gives the most symmetrical peaks along with the highest enantioselectivity.

Key words: salbutamol, enantiomers, supercritical fluid chromatography, polysaccharide-based chiral stationary phases.
