КРАТКИЙ ОБЗОР ПРИЛОЖЕНИЙ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (СФХ) МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (МС)

Rui Chen

Thar Instruments, Inc., USA

Поступила в редакцию 12.10.2007 г.

A BRIEF REVIEW ON THE APPLICATIONS OF SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY (SFC) MASS SPECTROMETRY (MS)

Rui Chen

Thar Instruments, Inc. USA

ВВЕДЕНИЕ

В последние десять лет наблюдались возрождение и последующий бурный рост сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ), особенно в химических и фармацевтических лабораториях. В СФХ в качестве подвижной фазы используется сверхкритический (СК) флюид, обычно CO_2, с добавками одного или более полярных органических растворителей, таких как спирты. СК состояние обычно поддерживается при помощи электронно-управляемого регулятора давления. Отличительным свойством СК флюида является слабое межмолекулярное взаимодействие, что приводит к низкой вязкости и высокому коэффициенту диффузии растворенных в нем веществ [1]. Низкая вязкость позволяет увеличивать расход подвижной фазы (что ускоряет анализ) и использовать колонки большей длины (т.е. обеспечивает более высокую эффективность). Поскольку коэффициент диффузии и оптимальные скорости потока подвижной фазы обычно выше, чем в традиционной жидкостной хроматографии (ЖХ), и более высокие скорости в СФХ достигаются без потери эффективности. Хотя сам CO_2 обладает низкой полярностью, добавление полярных органических растворителей, таких как спирты, сообщает подвижной фазе полярные свойства и растворяющую способность в отношении полярных органических веществ.

INTRODUCTION

The past decade has witnessed the resurgence and subsequent exponential growth of supercritical fluid chromatography (SFC), particularly in pharmaceutical and chemical laboratories. In SFC, a «supercritical» fluid, most commonly CO_2, in combination with one or more polar organic solvents, such as alcohols, are used as mobile phase. The supercritical condition is typically maintained via an electronically controlled pressure regulator. One distinctive attribute of supercritical fluid is the lack of intermolecular interactions, resulting in lower viscosity and high diffusivity of solutes in the fluid [1]. Lower viscosity allows the use of higher mobile-phase flow rate (i.e. faster analyses) and/or longer columns (i.e. higher efficiencies). Since diffusivity and optimal velocities are typically higher than those in traditional liquid chromatography (LC), the higher flow rates in SFC are often achieved without the loss of chromatographic efficiency. While CO_2 itself is relatively non-polar, the addition of polar organic solvents such as alcohols enables the mobile phase retain the polarity and solvating power of the polar organics.

Прогресс в технике детектирования СФХ внес свой вклад, по крайней мере частично, в ее возрождение и всевозрастающее признание научным хроматографическим сообществом. В дополнение к обычному газохроматографическому (ГХ) детектору, арсенал детектирования СФХ пополнился детекторами, используемыми в ЖХ, включая ультрафиолетовый (УФ) детектор, испарительный светорассеивающий детектор (ИСРД), азотный хемилюминесцентный детектор (АХД), детекторы заряженных аэрозолей (ДЗА) и использующий циркулярный дихроизм (ЦД), а также масс-спектрометр (МС). Философия фармацевтических разработок в области анализа неуклонно переходит от увеличения производительности и эффективности к получению высококачественных и информативных данных за наименьшие возможные промежутки времени [2]. По этой причине СФХ МС все чаще рассматривается как перспективное дополнение к преобладающему в промышленности методу ЖХ МС, в основном благодаря высокой скорости и уникальной селективности СФХ в совокупности с присущими МС универсальностью, чувствительностью и селективностью.

В данном кратком обзоре будут в основном рассмотрены приложения СФХ МС с насадочными колонками для иллюстрации гибкости и широкого диапазона применения этой мощной двойной технологии. Автор не претендует на полноту или глубокое обсуждение технической стороны вопроса. По этой причине приведено лишь ограниченное число выборочных ссылок в каждом разделе. Более подробную информацию по СФХ МС вы можете найти в других источниках [2—7].

СФХ МС ХИАД И СФХ МС ЭРИ

Разработки в области ионизации при атмосферном давлении (ИАД), включая химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД) и электрораспылительную ионизацию (ЭРИ), стимулировали беспрецедентный рост интереса к ЖХ МС. Несмотря на схожие методы реализации, обе техно-

Advances in detection in SFC have contributed, at least in part, to its resurgence and continuously increased acceptance by chromatographic society. From the original gas chromatographic (GC) detector, the detection in SFC has evolved to encompass more LC-type detectors, including ultra-violet (UV) detector, evaporative light scattering detector (ELSD), nitrogen chemiluminescence detector (NCD), circular dichroism (CD), charged aerosol detector (CAD), and mass spectrometer (MS). As the analytical philosophy in drug discovery gradually shifts from enhancing capacity and efficiency to generating high-quality and more informative data within a minimal time frame [2], SFC MS readily lends itself as an attractive complement to the industry-dominating LC MS, mainly due to the combination of the high speed and unique selectivity of SFC and the intrinsic universality, sensitivity, and specificity of MS.

This brief review will deal primarily with the applications of packed column SFC MS to showcase the versatility and broad applicability of this powerful hyphenated technology. It is not meant to be an exhaustive nor in-depth technical discussion. The citations from each application area are therefore highly selective and limited. Interested readers can find more comprehensive reviews on SFC MS elsewhere [2—7].

SFC APCI MS AND SFC ESI MS

The advents of atmospheric pressure ionization (API), including atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI), have stimulated the unprecedented popularity of LC MS. Albeit similar in implementation, the two ionization

логии ионизации отличаются, главным образом, способом образования ионов. В случае ХИАД ионы образуются в газовой фазе в области источника ионов МС, в то время как для ЭРИ ионы предварительно генерируются в растворе. Поскольку элюент СФХ быстро расширяется при выходе из капилляра, что способствует распылению анализируемого вещества, СФХ рассматривается как более перспективный источник для МС ИАД, чем ЖХ [7].

В общем случае ХИАД может быть приспособлена к относительно высоким значениям расхода (до 2 мл/мин) и лучше подходит для соединений с низкой и средней полярностью. По совпадению, СФХ имеет более высокий оптимальный расход, обычно в 3—5 раз больше, чем в случае ВЭЖХ, а также лучшее удерживание неполярных соединений (аналогичное обращенно-фазовой ВЭЖХ). По этим причинам ХИАД интуитивно воспринималась как лучший метод ионизации для СФХ МС, однако с появлением большого числа успешных приложений, использующих СФХ МС ЭРИ, это предположение во многом сошло на нет.

Анаклето с соавторами [8] использовали СФХ МС ХИАД для анализа полиароматических углеводородов со 100 % CO_2. Сйоберг и Маркидес [9] провели анализ стероидов, а Дост и Дейвидсон [10] — атропина с использованием СФХ МС ХИАД. Вентура с соавторами продолжили использовать СФХ МС ХИАД для высокоскоростного скрининга соединений в фармацевтике, дав весьма репрезентативный анализ применения СФХ МС в этой области [11]. Используя СФХ МС ХИАД при регистрации как положительных, так и отрицательных ионов, авторы показали значительные аналитические преимущества метода наряду с его большой скоростью. При стандартном высокопроизводительном анализе — до 500—1000 образцов в сутки — СФХ МС демонстрирует преимущества по сравнению с ЖХ МС не только за счет большей производительности, обусловленной меньшим временем анализа, но и за счет лучшего хроматографического разделения компонентов. Многие соединения, элюи-

techniques differ primarily in the manner in which the ions are formed. For APCI, ions are formed in the gas-phase at the source region of MS; whereas for ESI, ions are pre-formed in solution. Because SFC eluent rapidly expands when leaving the exit of capillary, thus assisting nebulization of analyte, it is speculated that SFC is actually more amenable to API MS source integration than LC [7].

APCI typically can accommodate relative high flow rate (up to 2 ml/min) and better suit for compounds with low to moderate polarity. Coincidently, SFC has higher optimal flow rate, typically 3~5 times higher than that in HPLC, and better retention on non-polar compounds (analogous to normal phase LC). APCI was therefore intuitively perceived as the choice of ionization for SFC MS; this notion, however, has gradually subsided with the emergence of ample successful applications generated by SFC ESI MS.

Anacleto et al. [8] employed SFC APCI MS for the analysis of PAHs with 100 % CO_2. Sjoberg and Markides [9] reported the SFC APCI MS analysis of steroids. Dost and Davidson [10] reported their analysis of atropine using SFC APCI MS. Ventura et al. extended their work in using SFC APCI MS for high-speed screening of pharmaceutically related compounds [11]. It is worthy to point out that this publication is representative of the SFC MS applications in pharmaceutical environment. Employing both positive- and negative-mode SFC APCI MS, the authors demonstrated the significant time saving and analytical advantages. For routine high-throughput analyses up to 500—1000 samples per 24-h period, SFC MS is shown advantageous over LC MS because it not only increases sample throughput due

руемые совместно при использовании ЖХ МС, хорошо разделяются в СФХ МС, благодаря чему увеличивается точность автоматизированного количественного анализа, основанного на УФ и ионном детектировании.

ЭРИ, с другой стороны, наиболее подходящий способ для ЖХ МС из-за возможности получения молекулярных ионов и ионизации соединений с большой молекулярной массой [12]. Сандун и соавторы [13] были одними из первых, кто использовал ЭРИ совместно с СФХ МС. При использовании источника ионов собственной конструкции они достигли пределов детектирования на уровне пикограммов. Пинкстон с соавторами [14] описывают разработку ЭРИ источника для СФХ МС с добавлением пневматики. Модифицированный источник обеспечивает возможность создания скоростей потока до 4 мл/мин, что позволяет работать с полным расходом из колонок с внутренним диаметром 4,6 мм и проводить быстрые анализы. Уровень фона масс-спектрометра и спектры анализируемых веществ аналогичны полученным при использовании ЖХ МС (ЭРИ). Это, на первый взгляд, тривиальное наблюдение значительно усилило позиции СФХ МС в качестве дополнения к ЖХ МС. СФХ, возможно, наилучший хроматографический метод для разделения хиральных соединений, и он сочетается с МС ЭРИ для анализа смесей хиральных соединений. Гарзотти и Хамдан [14] показали потенциальные возможности хирального анализа высокой производительности на примере различных типов выбранных молекул. Масс-спектрометрия оказалась незаменимым инструментом для однозначной интерпретации сигнала элюируемых компонентов, особенно в случае сложных смесей хиральных соединений.

МАСС-АНАЛИЗАТОРЫ

В настоящий момент в продаже имеются два типа систем СФХ МС, и оба производятся Thar Instruments, Inc. (Питтсбург, США). Пользователи могут выбрать между программными платформами Agilent Chemsta-

to shorter analysis times, but also because of enhanced chromatographic separation of the components. Many compounds that co-elute using LC MS are well separated by SFC MS, improving the accuracy of automated quantitative analysis based on UV and ion chromatograms.

ESI, on the other hand, is the predominant choice of ionization for LC MS, mainly due to its ability to generate intact molecular ions and ionize high molecular weight species [12]. Sadoun et al. [13] were among the first to report the use of an ESI interface for SFC MS. With their own source design, they were able to achieve a detection limit in the low-pg range. Pinkston et al. [14] described their effort in developing a pneumatically assisted ESI source for SFC MS. The modified source can accommodate flow rates up to 4 ml/min, accepting the entire effluent from 4.6 mm i.d. columns and allowing rapid analyses. The obtained mass spectrometric background signal and analyte spectra are similar to those obtained from typical LC ESI MS. This seemingly trivial observation greatly boosted the acceptance of SFC MS as a complement to LC MS. Arguably the best chromatographic tool for chiral separation, SFC was often found to couple to ESI MS for the analysis of chiral mixtures. Garzotti and Hamdan [14] have demonstrated the potential of high throughput chiral analyses on selected diverse molecules. The use of mass spectrometry was proven essential for an unambiguous assignment of the eluting components, particularly in the case of complex chiral mixtures.

MASS ANALYZERS

Currently, there are two types of commercially available SFC MS

tion и Waters Masslynx. В обеих системах один квадрупольный масс-анализатор (MSD или серии 6100 у Agilent; ZQ или 3100 у Waters Corp.) интегрирован в оборудование и программное обеспечение в качестве составной части системы СФХ МС. Однако использование различных типов массовых анализаторов совместно с СФХ не ограничено какими-то рамками, за исключением, возможно, практичности и цены. Морган с соавторами [16] описывают свои установки, в которых СФХ сочетается с ионной ловушкой (Finnigan) и двумя масс-спектрометрами с тройным квадруполем (VG и Finnigan). Ксу с соавторами [17] из Национального института рака сообщали об использовании СФХ МС с ионной ловушкой (Thermo Finnigan) и СФХ для разделения продуктов метаболизма 15 эстрогенов менее чем за 10 минут, что значительно быстрее 70 минут, необходимых для проведения аналогичного анализа методом ОФ ЖХ. Предел детектирования (ПД) и предел количественного определения были равны 0,5 и 5 ПКГ соответственно, что сопоставимо со значениями, полученными методом ОФ ЖХ. Газотти и соавторы [14, 18] совместили гибридный МС (квадрупольный и времяпролетный марки Q-TOF, Micromass) с СФХ, что позволило полностью использовать преимущества точного определения массы и высокой скорости сканирования Q-TOF МС для быстрой и однозначной идентификации пиков. Коэ с соавторами [19] описывают свои эксперименты по совмещению тройного квадрупольного МС (MDS Sciex) и СФХ для проведения быстрого биоанализа *R*/*S*-варфарина в плазме человека. Еще один значимый эксперимент был проведен Боланосом и соавторами [20]. Используя времяпролетный масс-анализатор (LCT, Waters Corp.) для сохранения хроматографической целостности сверхбыстрого СФХ разделения фармацевтических соединений, его группа показала преимущества детектирования методом высокоскоростной времяпролетной масс-спектрометрии (ВП МС) для сверхбыстрого качественного анализа при применении СФХ МС.

system, both from Thar Instruments, Inc. (Pittsburgh, PA, USA). Users can choose between Agilent Chemstation and Waters Masslynx software platforms. In both systems, a single quadrupole mass analyzer (MSD or 6100 series from Agilent, and ZQ or 3100 from Waters Corp.) was seamlessly integrated, in both software and hardware, as part of the SFC MS system. However, there is no limitation on the type of mass analyzers that can be coupled to SFC, other than practicality and capital expense. Morgan et al. [16] described their effort in coupling SFC to an ion trap (Finnigan) and two triple quadrupole (VG and Finnigan) MS. Xu et al. [17] from National Cancer Institute reported their use of SFC ion trap MS (Thermo Finnigan) in separating 15 estrogen metabolites in less than 10 min, significantly faster than the 70-min run using reverse phase LC (RPLC). The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.5 and 5 pg, respectively, comparable to those from RPLC. Garzotti et al. [14, 18] have coupled a hybrid (Q-TOF 2) MS (Micromass) to SFC to fully take advantages of the mass accuracy and high speed of the Q-TOF MS for fast and unambiguous peak identification. Coe at al. [19] reported their endeavor in coupling a triple quadrupole MS (MDS Sciex) to SFC for fast bioanalysis of *R*/*S*-warfarin in human plasma. Another noteworthy effort was described by Bolanos et al. [20]. Using a time-of-flight mass analyzer (LCT, Waters Corp.) to preserve the chromatographic integrity of ultra-fast SFC separations of pharmaceutical compounds, this group have demonstrated the advantages of high-speed time-of-flight-mass spectrometry (TOF MS) detection for ultrafast qualitative SFC MS applications.

ПРИМЕНЕНИЕ СФХ МС В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В течение долгого времени фармацевтическая промышленность оставалась главной силой, продвигающей развитие СФХ. Поэтому неудивительно, что сейчас большая часть практических приложений СФХ приходится именно не нее. Основным примером может служить консорциум, образованный Pfizer, La Jolla и Berger Instruments (Ньюарк, США, сейчас входит в Thar Instruments, Inc.), которые объединились для разработки и коммерческой реализации системы Berger AutoPrep SFC, включающей препаративный СФХ с УФ детектором, предназначенной для очистки стандартных («библиотечных») соединений.

СФХ МС стала мощным инструментом для качественного и количественного высокопроизводительного анализа на двух этапах разработки лекарственных препаратов: поиска и оптимизации веществ-прототипов («лидеров») [2].

СФХ МС часто используется совместно с другими методиками разделения, такими как ОФ ЖХ, ЖХ с нормальной фазой (НФ ЖХ) и капиллярный электрофорез. Она находит широкое применение при оценке степени чистоты, подтверждении структуры, мониторинге технологических процессов, определении структуры, исследовании продуктов разложения, масштабированной (препаративной) очистке, а также при выделении для последующей оценки биологической активности. Мультидисциплинарный подход, который часто называют ортогональным подходом, может быть использован для достижения максимальной селективности хроматографии и получения наиболее полных профилей разделения. Например, из-за того, что механизм разделения СФХ схож с механизмом разделения НФ ВЭЖХ, СФХ лучше подходит для отделения полярных примесей, чем ОФ ЖХ [2].

По причинам, которые еще предстоит выяснить, СФХ также лучше подходит для разделения соединений, близких по струк-

SFC MS APPLICATIONS IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Pharmaceutical industry has long been the driving force behind the development of SFC. And not surprisingly, it is also the largest demographical group of SFC practitioners today. A primary example is the consortium between Pfizer, La Jolla and Berger Instruments (Newark, DE, USA, now part of the Thar Instruments, Inc.) that lead to the successful development and commercialization of the Berger AutoPrep SFC, a UV-triggered preparative SFC aimed for library compound purification.

SFC MS has become a powerful tool for high throughput qualitative and quantitative analyses at two key stages of drug discovery: hit-to-lead and lead optimization [2]. Often used in parallel with other separation techniques, including RPLC, normal phase LC (NPLC) and capillary electrophoresis (CE), SFC MS were extensively employed in purity assessment, structure confirmation, in-process monitoring, structure elucidation, degradation profiling, scale-up purification and method transfer for bioassays. The multidisciplinary approach, often referred to as the orthogonal approach, can maximize the selectivity of chromatography and provide the most complete separation profiles. For example, due to its normal phase-like separation mechanism, SFC is found better suited for separating polar impurity than RPLC [2].

For reasons yet to be fully understood, SFC is also often better than LC in separating structurally related compounds, isomers and enantiomers. This is manifested by the high adoption rate of SFC in

туре, изомеров и энантиомеров. Это проявляется в высоких темпах роста применения СФХ для хирального разделения/очистки почти во всех крупных фармацевтических компаниях. Например, в недавней работе [21] Александер и Штааб из Bristol Myers Squibb показали применимость СФХ МС для профилирования изомерных продуктов в синтезе хиральных лекарственных препаратов. Предлагаемая методология полезна для анализа вещества с многими хиральными центрами, когда в сложной пробе присутствуют как энантиомеры, так и диастереоизомеры. Менее известной и не очень широко распространенной областью применения СФХ для разделения структурно близких веществ является определение метаболитов. В дополнение к уникальной селективности в отношении структурно близких метаболитов и нормально-фазовому механизму разделения, позволяющему удерживать полярные метаболиты, в СФХ МС наблюдаются меньшие помехи МС сигнала от биологических матриц. Этот эффект приписывается лучшему разделению фармацевтических соединений и биологических примесей, таких как фосфолипиды [22]. Другим примером может служить уже упоминавшаяся ранее публикация Национального института рака [17], в которой описано разделение и детектирование 15 структурно близких метаболитов эстрогена на низком уровне менее чем за 10 минут с применением МС СФХ ХИАД.

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СФХ МС АНАЛИЗ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Погоня за высокой производительностью остается одной из наиболее актуальных тем в анализе применительно к области фармацевтики. СФХ обладает великолепным потенциалом, чтобы стать наиболее подходящим методом для решения этой задачи, благодаря более высокой оптимальной скорости потока и короткому времени возвращения в состояние равновесия. Хоке и др. [23] из Procter and Gamble описывают применение СФХ МС / МС для производительного био-

chiral separation/purification in nearly all major pharmaceutical companies. For example, in a recent publication [21], Alexander and Staab from Bristol Myers Squibb, have demonstrated the applicability of SFC MS for the profiling of isomeric products in chiral drug synthesis. The proposed methodology is useful for the analysis of compounds possessing multiple chiral centers, when both enantiomers and diastereomers present in a complex sample. A lesser known or utilized application in separating structurally similar compounds by SFC is metabolite characterization. In addition to its unique selectivity to structurally related metabolites and normal phase mechanism to retain polar metabolites, typically less MS signal of the interference from biological matrices are observed in SFC MS. This is ascribed to the improved separation between pharmaceutical compound and biological interference such as phospholipids [22]. Aforementioned publication from National Cancer Institute [17] is another example, in which a less-than-10 min separation and low level detection of 15 structurally-similar estrogen metabolites by SFC APCI MS were reported.

HIGH THROUGHPUT ANALYSIS BY SFC MS IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

Pursuing high throughput has been one of the most consistent themes in analytical arena in pharmaceutical sectors. SFC holds great potential to become the perfect «fit» for such endeavor, owing to its higher optimal flow rate and short to none re-equilibration time. Hoke et al. [23] from Procter and Gamble

анализа. Используя колонку с внутренним диаметром 2,1×10 мм и расход 7,5 мл/мин, им удалось сократить время количественного определения целевого соединения в экстрактах плазмы до 10,2 мин для планшета с 96 ячейками, что составляет значительное ускорение по сравнению с существующими методами ЖХ МС/МС. В этой работе отмечена наивысшая достигнутая на сегодняшний день производительность СФХ с использованием МС. Боланос с соавторами [20] из Pfizer и La Jolla описывали свои работы по увеличению аналитической производительности путем использования высокоскоростного времяпролетного (ВП) МС в сочетании с СФХ. Четыре фармацевтических соединения были элюированы в течение 6 с с шириной у нулевой линии пика менее 2 с. Совместное использование СФХ и ВП МС обещает обеспечить максимальную плотность химической информации в единицу времени. Несмотря на то, что большинство работ по увеличению производительности направлены на реализацию быстродействующего анализа и автоматизированного переключения колонок/растворителей в СФХ системах, Жао и др. [24] сообщают о применении новой стратегии скрининга и создания подбиблиотек, основанной на СФХ МС, для ускорения разработки быстрых методов определения хиральных соединений. Используя преимущества высокой селективности и чувствительности МС, объединением данных для образцов в подбиблиотеки можно значительно увеличить общую производительность.

В недавней работе Пинкстона с соавторами [25] из Procter and Gamble был дан ответ на давний вопрос: может ли СФХ МС сравниться с ЖХ МС при анализе больших и разнообразных библиотек фармацевтических соединений? Анализ 2266 потенциальных фармацевтических соединений показал, что различие в проценте точных попаданий между ЖХ МС (79,4 %) и СФХ МС (75,0 %) пренебрежимо мало. Эти результаты однозначно показали возможность применения СФХ МС для высокопроизводительного скрининга больших и разнообразных библиотек потенциальных фармацевтических соединений.

have described SFC MS/MS applications in high throughput bioanalysis. By using a 2.1×10 mm i.d. column and a flow rate of 7.5 mL/min, they were able to reduce the time for target compound quantitation of DEX in plasma extracts to 10.2 min for a 96-well plate, a significant improvement over the existing LC MS/MS methods. This remains to be the highest throughput ever reported by using SFC MS. Bolanos et al. [20] from Pfizer, La Jolla described their effort in improving analytical throughput by using a high speed TOF MS coupled to SFC. Four pharmaceutical compounds were eluted within 6 s, with the base peak width of less than 2 s. The union of SFC with TOF MS is expected to provide the maximum density of chemical information per unit time. While most effort in improving throughput were directed into implementing fast analysis and automated column/solvent switching on SFC, a novel SFC MS based screening strategy, sample pooling, for rapid chiral method development is reported by Zhao et al. [24]. Taking advantages of the selectivity and sensitivity of MS, implementing sample pooling can substantially improve the overall throughput.

A recent publication by Pinkston et al. [25] from Procter and Gamble has answered a long sought-after question: can SFC MS measure up to LC MS for the analysis of large and diverse library of pharmaceutical compounds? Through the analyses of a total of 2266 pharmaceutical relevant compounds, it was concluded that the difference in the percentages of the hit between LC MS (79.4 %) and SFC MS (75.0 %) is negligible. The results unequivocally justified the use of SFC MS for high throughput screening of large and diverse libraries of drug-like molecules.

АНАЛИЗ АДМЕ МЕТОДОМ СФХ МС В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Еще одна область фармацевтики, в которой начинается использование МС СФХ, — это АДМЕ анализ. Хоке и соавторы [26] были одними из первых, кто использовал для таких исследований СФХ МС / МС. В первом их сообщении предел обнаружения на уровне 1 часть на триллион (ppt или 10^{-10} %), сопоставимый с ЖХ МС, был получен при анализе биологически активных соединений. В последующей своей работе [23] они успешно достигли наибольшей отмеченной на сегодняшний день производительности биоанализа с использованием СФХ МС / МС, а именно времени анализа 10 мин для планшета из 96 ячеек. Другая группа исследователей из Шеринг-Плау в течение последних двух лет опубликовала ряд работ [27—29], посвященных определению фармацевтических соединений в метаболически стабильных образцах. Кое и др. [19] также сообщали о быстром биоанализе *R*/*S*-варфарина в плазме человека, проведенном с помощью СФХ МС / МС. В целом, применение СФХ МС для АДМЕ анализа остается ограниченным. Большой потенциал, обусловленный чувствительностью и производительностью СФХ МС / МС, остается пока нереализованным.

ADME ANALYSES BY SFC MS IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY

An emerging application filed within pharmaceutical sectors for SFC MS is ADME analysis. Hoke et al. [26] were among the first to employ SFC MS/MS for such studies. A LC-comparable sensitivity of ppt level was reported for the bio-analytical quantification in their first report. In their subsequent study [23], they successfully achieved the highest throughput ever reported, 10 min per 96-well plate, in bio-analyses using SFC MS/MS. Another group in Schering-Plough [27—29] has published a series of publications in the past two years concerning with the determination of pharmaceutical compounds in metabolic stability samples. Coe et al. [19] has also reported their fast bioanalysis of *R*/*S*-warfarin in human plasma using SFC MS/MS. Overall, SFC MS applications in ADME analysis are still limited in scope. The great potential in both sensitivity and throughput SFC MS/MS can offer is yet to be harnessed.

АНАЛИЗ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ СФХ МС

Еще одной областью, где СФХ МС еще не продемонстрировала своей великолепной разрешающей способности, остается анализ белков и пептидов. Разделение пептидов имеет огромное значение с экономической, экологической и общечеловеческой точки зрения для фармацевтической и других областей промышленности. СФХ МС способна быстрее определять заданные биологические вещества (например, лекарства, основанные на белках) в физиологических жидкостях. Возможность использования колонок большей длины в СФХ может оказаться полезной для разделения этих сложных смесей.

PROTEIN/PEPTIDE ANALYSES BY SFC MS

Protein/peptide analysis by SFC MS is another filed to which SFC has yet to unleash its superior resolving power. Peptide separations are of great economic, human, and environmental importance in the pharmaceutical and other industries. SFC MS may allow faster determinations of targeted «biologics» (i.e., peptide-based pharmaceuticals) in physiological fluids. The long-column capabilities of SFC may be useful in resolving these complex mixtures. In addition, coupled with RPLC, the more normal phase

Также, при применении совместно с ОФ ЖХ, близкие к НФ ЖХ элюентные характеристики СФХ позволяют быстро получить второе ортогональное измерение в двумерных разделениях. Основным ограничением, однако, по-прежнему остается малая растворимость биологических молекул в органических растворителях, применение которых требуется для СФХ МС. Литература в этой области чрезвычайно ограничена. Боланос и соавторы [7] описывают анализ протеинов и пептидов с использованием СФХ МС ЭРИ, а также очистку грамицидина при помощи СФХ. Совместно с Маршаллом и др. [30] из Университета штата Флорида они также применили СФХ МС для облегчения обратного H-D-обмена в растворе для протеомических анализов. Тэйлор и соавторы [31] недавно со средним успехом пытались провести анализ полипептидов, содержащих до 40 звеньев, с использованием СФХ МС.

Приложения СФХ МС в различных областях слишком обширны для включения в этот краткий обзор. Остается лишь назвать некоторые из них, такие как пищевые добавки, натуральные продукты, полимеры/олигомеры, металлоорганические соединения, топлива и т.п. Подробный обзор этих приложений может быть найден в других источниках [2—7].

ПРЕПАРАТИВНАЯ СФХ С УПРАВЛЕНИЕМ ОТ МС

Последний раздел настоящего обзора посвящен препаративной СФХ, или более конкретно — препаративной СФХ МС. Многие считают препаративную СФХ наиболее перспективной областью применения СФХ для массового использования. Она одновременно является быстрой, экономически эффективной и экологичной. При глобальной оптимизации с использованием препаративной СФХ установки с общим расходом 400 мл/мин можно достичь производительности в 1 кг продукта на 1 кг адсорбента в день. Пониженное потребление растворителя и сбор фракций в относительно небольшом объеме позволяют существенно снизить стоимость эксплуатации. Однако большинство прило-

elution characteristics of SFC may provide a rapid, orthogonal second dimension in 2-D separations. The major limitation, though, is the low solubility of these biomolecules in organic solvent typically required for SFC MS. Literature on this subject is extremely scarce. Belanos et al. [7] described the analyses of both protein and peptides by SFC ESI MS, and the purification of gramicidin by SFC. In collaboration with Marshall et al. [30] from Florida State University, they also applied SFC MS to alleviate H/D back exchange in solution phase H/D exchange for proteomic analyses. Taylor et al. [31] recently attempted to analyze polypeptides up to 40-mers using SFC MS with moderate success.

There are too many other SFC MS applications in different fields to be listed in this concise review, including food additive, natural products, polymer/oligomer, organometallics, fuels etc. Detailed review on these subjects can be found elsewhere [2—7].

MS DIRECTED PREPARATIVE SFC

The last section of this review is dedicated to preparative SFC, or more appropriately, MS directed preparative SFC. Preparative SFC is deemed by many to hold the greatest promise to first attain the main-stream acceptance. It is fast, cost-effective, and «green». Under super-optimal conditions, a kg/kg adsorbents/day (kkd) throughput can be achieved with a preparative SFC instrument that can deliver a total flow of 400 ml/min. The reduction of solvent consumption and collection in relatively small volume of volatile organic solvents lead to significant savings on operation cost. However, the majority of the preparative SFC applications are still

жений препаративной СФХ до сих пор ограничено очисткой хиральных соединений, в которых общий расход определяет производительность и минимальные требования к автоматизации. Исследователи, работающие с СФХ, застали грандиозный успех препаративной ВЭЖХ с управлением от МС, после чего вполне очевидно, что их силы направлены на разработку препаративной СФХ с управлением от МС. Berger Instruments (сейчас входит в Thar Instruments, Inc.), работая совместно с учеными из Аланекс (в настоящий момент входит в Pfizer, La Jolla), разработали первые препаративные СФХ для очистки веществ для комбинаторных библиотек [5]. Схема работы обычно включает предварительные измерения нужных веществ с помощью аналитической СФХ МС и полуавтоматическое масштабирование на препаративном хроматографе СФХ с управлением от УФ детектора с помощью роботизированной установки. Несмотря на свою громоздкость и трудоемкость в использовании, Berger AutoPrep SFC стал первым коммерческим прибором, который включает МС в препаративный СФХ хроматограф. За прошедшие годы множество организаций с переменным успехом предпринимали попытки разработки препаративных СФХ с настоящим управлением от МС. Ванг и др. [32] разработали полупрепаративный СФХ хроматограф, который состоял из одного квадрупольного МС, бинарного СФХ и сборника фракций, приводимого в действие от масс-спектрометра. Позднее Жанг и др. [33] из ArQule докладывали о своей разработке в области препаративной СФХ с управлением от МС, которая обеспечивает выделение более 85 % фракции при расходе до 30 мл/мин.

До настоящего времени Thar Instruments, Inc. остается единственным на рынке поставщиком препаративных систем СФХ с управлением от МС. Последняя разработка компании, SFC-MS Prep 30, имеет открытый модуль сбора фракций, основанный на использовании модуля управления образцами Waters модели 2757, и позволяет работать с расходами до 30 г/мин. Система базируется на программной платформе Masslynx/Fractionlynx, поставляемой Waters Corporation.

limited in chiral purifications, in which total flow rate determines the throughput and minimal automation is required. After witnessing the great success of MS directed preparative HPLC, it is only fitting that SFC practitioners are in quest for a MS directed preparative SFC. Berger Instruments (now part of the Thar Instruments, Inc.), working with scientists from Alanex (now part of the Pfizer, La Jolla), developed the first preparative SFC instruments to be employed for the purification of combinatorial libraries [5]. The required work flow typically involves an analytical SFC MS run on the target plate and a semi-automatic scale-up to the UV-triggered preparative SFC with a robotic work station. Albeit cumbersome and labor intensive, Berger AutoPrep SFC is the first commercial SFC instrument that incorporates MS into preparative SFC. Over the years, many groups have attempted to customer-design a true mass-triggered preparative SFC, with varying degrees of success. Wang et al. [32] have developed a semi-preparative SFC that consisted of a single quadrupole MS, a binary SFC, and a mass-triggered fraction collection. More recently, Zhang et al. [33] at ArQule reported their development of a MS directed preparative SFC that boasts a recovery of > 85 % at flow rates up to 30 ml/min.

Thus far, Thar Instruments, Inc. remains the only vendor on the market that offers commercial MS directed preparative SFC. Its current offering, SFC-MS Prep 30, can provide users with a total flow rate up to 30 g/min and an open-bed faction collection based on the Waters 2757 sample managing module. The system is operated on the Masslynx/Fractionlynx software platform from Waters Corporation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Berger T.A.* In Packed Column SFC / Ed. by R.M. Smith. Royal Society of Chemistry, 1995.
2. *Zhao Y., Sandra P., Woo G., Thomas S., Gahm K., Semin D.* LC GC Europe. 2004. Vol. 17. P. 224—238.
3. *Combs M.T., Ashraf-Khorassani M., Taylor L.T.* J. Chromatogr. A. 1997. Vol. 785. P. 85—100.
4. *Chester T.L., Pinkston J.D.* Anal. Chem. 2002. Vol. 74. P. 2801—2812.
5. *Cheng X., Hochlowski J.* Anal. Chem. 2002. Vol. 74. P. 2670—2690.
6. *Henry M.C., Yonker C.R.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 3909—3915.
7. *Bolanos B., Greig M., Ventura M., Farrell W., Aurigemma C.M., Li H., Quenzer T.L., Tivel K., Bylund J.M.R., Tran P., Pham C., Phillipson D.* Inter. J. Mass. Spectrom. 2004. Vol. 238. P. 85 — 97.
8. *Anacleto J.F., Ramaley L., Boyd R.K., Pleasance S., Quilliam M.A., Sim P.G., Benoid F.M.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 1991. Vol. 5. P. 149—155.
9. *Sjoberg R.J.R., Markides K.E.* The 6th International Symposium on Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. Uppsala, Sweden. 1995.
10. *Dost K., Davidson G.* J. Biochem. Biophys. Methods. 2000. Vol. 43. P. 125—134.
11. *Ventura M.C., Farrell W.P., Aurigemma C.M., Greig M.J.* Anal. Chem. 1999. Vol. 71. P. 4223—4231.
12. *Rossi D.T., Sinz M.W.* Mass Spectrometry in Drug Discovery. Marcel Dekker, Inc. 2002.
13. *Sadoun F., Virelizier H., Arpino P.J.* J. Chromatogr. 1991. Vol. 647. P. 351—359.
14. *Baker T.R., Pinkston J.D.* J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1998. Vol. 9. P. 498—509.
15. *Garzotti M., Hamdan M.* J. Chromatogr. B. 2002. Vol. 770. P. 53—61.
16. *Morgan D.G., Harbol K.L., Kitrinos Jr. N.P.* J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 800. P. 39—49.
17. *Xu X., Roman J.M., Veenstra T.D., Van Anda J., Ziegler R.G., Issaq H.J.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 1553—1558.
18. *Garzotti M., Rovatti L., Hamdan M.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001. Vol. 15. P. 1187—1190.
19. *Coe R.A., Rathe J.O., Lee J.W.* J. Pharma. Biomed. Anal. 2006. Vol. 42. P. 573—580.
20. *Bolanos B.J., Ventura M., Greig M.* J. Comb. Chem. 2003. Vol. 5. P. 451—455.
21. *Alexander A.J., Staab A.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 3835—3838.
22. *Chen R., Van Anda J., Meng M., Bennett P., Brewer E.* Poster for the 54th ASMS Conference. Seattle, WA, USA. 2006.
23. *Hoke II. S.H., Tomlinson II. J.A., Bolden R.D., Morand K.L., Pinkston J.D., Wehmeyer K.R.* Anal. Chem. 2001. Vol. 73. P. 3083—3088.
24. *Zhao Y., Woo G., Thomas S., Semina D., Sandra P.* J. Chromatogr. A. 2003. Vol. 1003. P. 157—166.
25. *Pinkston J.D., Wen D., Morand K.L., Tirey D.A., Stanton D.T.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 7467—7472.
26. *Hoke II S.H., Pinkston J.D., Bailey R.E., Tanguay S.L., Eichhold T.H.* Anal. Chem. 2000. Vol. 72. P. 4235—4242.
27. *Hsieh Y., Favreau L., Cheng K.-C., Chen J.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005. Vol. 19. P. 3037—3041.
28. *Hsieh Y., Favreau L., Schwerdlt J., Cheng K.-C.* J. Pharma. Biomed. Anal. 2006. Vol. 40. P. 799—804.
29. *Chen J., Hsieh Y., Cook J., Morrison R., Korfmacher W.A.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 1212—1217.
30. *Emmett M.R., Kazazic S., Marshall A.G., Chen W., Shi S.D.-H., Bolanos B., Greig M.J.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 7058—7060.
31. *Zheng J., Pinkston J.D., Zoutendam P.H., Taylor L.T.* Anal. Chem. 2006. Vol. 78. P. 1535—1545.
32. *Wang T., Barber M., Hardt I., Kassel D.B.* Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001. Vol. 15. P. 2067—2075.
33. *Zhang X., Towle M.H., Felice C.E., Flament J.H., Goetzinger W.K.* J. Comb. Chem. 2006. Vol. 8. P. 705—714.